



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

FERNANDO LOIOLA NUNES

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO QUEIJO
MUÇARELA PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS

Araguaína/TO

2023

Fernando Loiola Nunes

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO QUEIJO
MUÇARELA PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSAPT) da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Araguaína/TO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- N972a Nunes, Fernando Loiola.
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO
QUEIJO MUÇARELA PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS. /
Fernando Loiola Nunes. – Araguaína, TO, 2023.
77 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2023.
Orientador: José Carlos Ribeiro Júnior

1. Fluxograma de produção. 2. Produtos lácteos. 3. Listeria
monocytogenes. 4. Escherichia coli diarreio gênica. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

FERNANDO LOIOLA NUNES

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO QUEIJO
MUÇARELA PRODUZIDO NO NORTE DO TOCANTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, UFNT

Prof. Dra. Katyane de Sousa Almeida, UFNT



Prof. Dra. Vanerli Beloti, UEL

Dedico este trabalho a minha mãe (Francisca Gonçalves Loiola) pelo incentivo e apoio dado em toda minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me sustentar durante todo esse tempo e me fazer perseverar e chegar até aqui. Ao professor Dr. José Carlos Ribeiro Junior que me deu a oportunidade, me ensinou e orientou com todo profissionalismo e dedicação. O senhor é referência, professor.

A Jeycy Kelle que foi um dos suportes durante todo o mestrado, principalmente durante a execução do projeto e nossa estada em Araguaína.

Aos amigos Hellen Núbia e Leandro Pereira, que me incentivaram a fazer o processo seletivo do mestrado.

Ao amigo Thiago Oliveira, que me auxiliou nas atividades de trabalho da ADAPEC.

A todos os colegas do LABMA, mestrandos, estagiários do laboratório, mas em especial a Cristiane, que me ensinou muito, sempre esteve pronta a esclarecer todas as dúvidas e ajudar no dia-a-dia do laboratório.

Aos professores Bruna Alexandrino, Katyane de Sousa e Vanerli Beloti, por terem aceito o convite para participarem da minha qualificação e defesa e terem contribuído com melhorias no meu trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para o andamento deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

O Brasil figura-se mundialmente entre os 5 maiores produtores de leite e mais de 1/3 desta produção destina-se para fabricação de queijos, sendo o queijo muçarela um dos principais produzidos no país. Considerando a complexidade do fluxograma industrial com intensa manipulação, que podem influenciar na manutenção e multiplicação microbiana, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito das etapas do processo de fabricação do queijo muçarela na qualidade microbiológica, ocorrência de patógenos, segurança ao consumo e vida útil, verificando pontos críticos biológicos em um laticínio no norte do Tocantins, Brasil. Foram avaliados 5 lotes de muçarela, desde o leite cru refrigerado até a embalagem primária e *shelf life* de 120 dias a 4°C (07 pontos de coleta), totalizando 35 amostras. Foram quantificados grupos de micro-organismos indicadores e, por abordagens microbiológicas e biomoleculares, identificados *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, patótipos de *E. coli* diarreio gênica e caracterização do potencial toxigênico de estafilococos coagulase positiva (ECP). Foi verificado que o leite cru utilizado para a produção de muçarela apresentava baixa qualidade microbiológica, com contagens totais superiores a 10^8 UFC/mL, não atendendo ao padrão legal. A pasteurização do leite cru foi suficiente para eliminar todos os patógenos identificados no leite cru e reduzir significativamente as contagens de indicadores. A partir da coagulação do leite e dessoragem da massa foi possível verificar expressivo aumento das contagens ($>10^4$ UFC/g) e recontaminação com *Salmonella* spp., EPEC, EAEC e ECP, potencialmente produtores de enterotoxina estafilocócica B e toxina do choque tóxico. A filagem da massa fermentada ($<5,4$ pH) a temperatura de 58°C, foi suficiente para reduzir aeróbios mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* em 99,97%, 55,86%, 99,99%, 99,99% e 98,92%, respectivamente, assim como a salmoura das peças por imersão foi capaz de reduzir as quantificações desses grupos em 55,21%, 85,71%, 99,95%, 99,95% e 71,42%. Apesar de no produto recém acabado ter sido identificada *Salmonella* spp. e ausência de *L. monocytogenes*, após o período de *shelf life* houve presença de *L. monocytogenes* e ausência de *Salmonella* spp., potencialmente influenciado pela recuperação desses micro-organismos durante o fluxograma de produção, armazenamento sob refrigeração e ação antagonista dos fermentos lácticos especificamente aos Gram negativos. Considerando a eficiência do processo de pasteurização no controle microbiológico, houve enumeração de micro-organismos indicadores e patogênicos nas diversas etapas do processo produtivo chegando até o produto final, configurando-se assim como perda de qualidade do produto e perigo à saúde do consumidor. Neste sentido, o sistema de gestão da qualidade e segurança dos alimentos deve reavaliar os processos que apresentaram desvio para implantação de medidas corretivas eficientes, com base em BPA, BPF e APPCC.

Palavras-chave: Fluxograma de produção, *Escherichia coli* diarreio gênica, *Listeria monocytogenes*, Produtos lácteos, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Brazil is among the 5 largest milk producers in the world and more than 1/3 of this production is used to manufacture cheese, with mozzarella cheese being one of the main ones produced in the country. Considering the complexity of the industrial flowchart with intense manipulation, which can influence the maintenance and microbial multiplication, the present work should aim to determine the effect of the stages of the mozzarella cheese manufacturing process on the microbiological quality, occurrence of pathogens, consumer safety and life useful, checking biological critical points in a dairy in northern Tocantins, Brazil. Five batches of mozzarella were evaluated, from refrigerated raw milk to primary packaging and shelf life of 120 days at 4°C (07 collection points), totaling 35 samples. Groups of indicator microorganisms were quantified and, through microbiological and biomolecular approaches, identified *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, pathotypes of diarrheagenic *E. coli* and characterization of the toxigenic potential of coagulase positive *Staphylococci* (ecp). It was verified that the raw milk used for the production of mozzarella had low microbiological quality, with total counts greater than 108 cfu/ml, not meeting the legal standard. Pasteurization of raw milk was sufficient to eliminate all identified pathogens in raw milk and significantly reduce indicator counts. From milk coagulation and mass draining, it was possible to verify a significant increase in counts (>104 cfu/g) and recontamination with *Salmonella* spp., epec, eaec and ecp, potentially producers of staphylococcal enterotoxin b and toxic shock toxin. The straining of the fermented mass (<5.4 ph) at a temperature of 58°C was sufficient to reduce mesophilic, psychrotrophic, enterobacteria, total coliforms and *E. coli* aerobes by 99.97%, 55.86%, 99.99%, 99.99% and 98.92%, respectively, as well as the brine of the pieces by immersion was able to reduce the quantifications of these groups by 55.21%, 85.71%, 99.95%, 99.95% and 71.42%. Despite the fact that *Salmonella* spp. Was identified in the freshly finished product. And absence of *L. monocytogenes*, after the shelf life period there was presence of *L. monocytogenes* and absence of *Salmonella* spp., potentially influenced by the recovery of these microorganisms during the production flowchart, storage under refrigeration and antagonistic action of lactic ferments specifically to gram negatives. Considering the efficiency of the pasteurization process in microbiological control, there was an enumeration of indicator and pathogenic microorganisms in the various stages of the production process, reaching the final product, thus configuring a loss of product quality and a danger to the health of the consumer. In this sense, the food quality and safety management system must reassess the processes that showed a deviation for the implementation of efficient corrective medications, based on GAP, GMP and HACCP.

Keywords: Dairy products, Production flowchart, diarrheagenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Produção de leite de vaca no estado do Tocantins em 2021	15
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros mínimos para leite cru refrigerado definido na Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, do MAPA.	22
Quadro 2. Requisitos sensoriais e físico-químicos para queijo muçarela definido na portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997, do MAPA	30
Quadro 3. Critérios microbiológicos para queijo muçarela Critérios microbiológicos para queijo muçarela.....	31
Quadro 4. Perigos microbiológicos à saúde pública encontrados em produtos lácteos verificados por trabalhos disponíveis na literatura	32
Quadro 5. Principais patótipos de E. coli diarreiogênica e seus fatores de virulência específicos.	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers e referencias utilizadas para identificação e caracterização molecular isolados sugestivos de patógenos isolados de queijos muçarela em diferentes etapas de fabricação..... 71
- Tabela 2.** Contagens médias de micro-organismos indicadores da qualidade de cinco lotes de queijos muçarela produzidos no norte do Tocantins no período de setembro a novembro de 2021 ao longo de cada etapa do processamento industrial e após 120 dias de *shelf life* 72
- Tabela 3.** Resultados de reações de PCR para identificação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* e caracterização biomolecular de fatores de virulência de *Escherichia coli* diarreiogênica de isolados sugestivos recuperados de cinco lotes de leite durante o fluxograma de produção e *shelf life* de muçarela produzida por laticínio da região norte do Tocantins, Brasil, no período de novembro de 2021 a março de 2022. 73
- Tabela 4.** Caracterização molecular do potencial de produção de enterotoxinas estafilocócicas A a E (gene *seA* a *seE*), toxina do choque tóxico (*tst*), toxinas esfoliativas A e B (*etA* e *etB*) e resistência à meticilina (*mecA*) de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de cinco lotes de queijo muçarela ao longo de cada etapa do fluxograma de produção e *shelf life* em um laticínio da região norte do Tocantins, Brasil, no período novembro de 2021 a março de 2022. 74

LISTA DE SIGLAS

a.c	Antes de Cristo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Amd	Amendment
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AW	Tropical quente e úmido
a_w	Atividade de água
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BHI	Brain Heart Infusion Broth
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
c	Número de unidades amostrais toleradas com qualidade intermediária
CCS	Contagem de Células Somáticas
cm	Centímetros
CPP	Contagem Padrão em Placas
DTA	Doença Transmitida por Alimento
DVS	<i>Direct Vat Starters</i>
EAEC	<i>E. coli Enteroagregativa</i>
ECP	Estafilococos Coagulase Positiva
EHEC	<i>E. coli enterohemorrhagic</i>
EIEC	<i>E. coli enteroinvasiva</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	<i>E. coli Enteropatogênica</i>
ETEC	<i>E. coli enterotoxigênica</i>
et al.	E outros
ETB	Enterobactérias
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	International Organization for Standardization
LTDA	Limitada
m	Limite microbiológico inferior
M	Limite microbiológico superior

MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
ME	Microempresa
mL	Mililitro
m/v	Massa por volume
n	Número de unidades amostrais
n°	Número
NaCL	Cloreto de Sódio
NSLAB	Bactérias láctica não iniciadoras
OCDE	Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico
PCC	Ponto Crítico de Controle
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SIF	Serviço de Inspeção Federal
STEC	<i>E. coli Shiga toxin-producing</i>
UHT	Ultra High Temperature
UFC	Unidade Formadora de Colônia
°C	Graus Célsius
°H	Graus Hortvet
v/v	Volume por volume

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
%	Percentual
§	Parágrafo
<	Menor que
~	Aproximadamente
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Produção de leite no brasil e no tocantins	19
3.2 Consumo e tecnologia de produção de queijo muçarela	20
3.2.1 Seleção da matéria-prima – Leite.....	21
3.2.2 Pasteurização e padronização do leite	22
3.2.3 Adição de coadjuvantes de processamento.....	24
3.2.4 Fermentação	24
3.2.5 Coagulação	25
3.2.6 Dessoragem, pré-prensagem, fermentação da massa	26
3.2.7 Filagem e moldagem	26
3.2.8 Salga e secagem.....	27
3.2.9 Embalagem primária e secundária	28
3.2.10 Estocagem.....	28
3.2.11 Shelf-life	28
3.3 TIPOS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO MUÇARELA....	29
3.4 PADRÕES DE QUALIDADE, SEGURANÇA E IDENTIDADE.....	29
3.4.1 Padrões sensoriais e físico-químicos para queijo muçarela	29
3.4.2 Padrões microbiológicos.....	30
3.4.3 Perigos microbiológicos à saúde pública relacionados a produtos lácteos	31
3.5 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE	33
3.5.1 Aeróbios mesófilos	33
3.5.2 Bactérias psicrotróficas	34
3.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.5.4 Enterobactérias.....	35
3.5.5 Coliformes totais	35
3.5.6 Coliformes termotolerantes	35
3.5.7 <i>Escherichia coli</i>	36
3.6 MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	36

3.6.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	36
3.6.2 <i>Salmonella</i> spp.....	37
3.6.3 <i>Escherichia coli</i> diarreio gênica	37
3.6.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	38
3.7 FERRAMENTAS DE GESTÃO DA QUALIDADE	39
REFERÊNCIAS	41
4 CAPÍTULO II - ARTIGO	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
3 CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PONTOS DE COLETA.....	77

1 INTRODUÇÃO

O leite é consumido mundialmente sob várias formas de produto, como leite pasteurizado, leite em pó, queijo, iogurtes, manteiga entre outros (SHEN et al., 2021). Segundo a FAO/OCDE (2022b), a produção global de leite atingiu cerca de 902 milhões de toneladas em 2022 com projeção de que, em 2023, essa quantidade seja acrescida de 1,02%. A Índia lidera o ranking de maiores produtores de leite do mundo, com 195 milhões de toneladas, seguida da União Europeia e dos Estados Unidos da América. De acordo com os dados mais recentes disponíveis, o Brasil é o quarto maior produtor de leite (aproximadamente 36 milhões de toneladas) o que equivale a um crescimento de 673% quando comparado com o primeiro censo brasileiro oficial, de 1961 (5,2 milhões de toneladas) e apresenta o terceiro maior rebanho leiteiro do mundo (FAO, 2022a; LEITE, STOCK, RUBACK, 2022).

Entre os anos de 2006 e 2017 a produção nacional de leite cresceu expressivos 47%, mesmo com a redução no número de produtores e de vacas ordenhadas, denotando um ganho de produtividade (EMBRAPA, 2020), devido a melhorias no bem-estar do rebanho, manejo, genética e práticas de ordenha e processamento do leite (ANDRETTA, CALL e NERO, 2023). O estado de Minas Gerais contém a maior concentração de estabelecimentos produtores de leite do Brasil (18,4%), seguido do Rio Grande do Sul (11,0%) e Bahia (9,2%), nesse cenário, o estado do Tocantins apresenta 0,02% (22.498 estabelecimentos produtores de leite), com produção estimada em 113 mil toneladas de leite em 2022 (EMBRAPA 2022; IBGE, 2022).

O leite é comercializado, principalmente, em forma de produtos lácteos processados, sendo o queijo o segundo produto mais consumido em termos de sólidos lácteos (FAO, 2022c). Em 2021, a produção brasileira de queijos absorveu cerca de 9 bilhões de litros e o consumo aparente *per capita* de leite e derivados foi de 170 litros por habitante (EMBRAPA, 2022). No entanto, não há dados disponíveis sobre a produção de queijos discriminados por tipos de queijos e por estados federativos, com ênfase na ausência dessas informações para o estado do Tocantins.

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2020), 35% da produção de leite do Brasil destinam-se exclusivamente à fabricação industrial de queijo. O Brasil, em termos de produção, fica entre os cinco maiores do mundo, com média anual de 1,2 milhão de toneladas de queijos. Minas Gerais é o principal estado produtor, com 25% da produção total do país. Em 2019, cerca de R\$ 23 bilhões foram movimentados com a

atividade, sendo 8.510 milhões de litros de leite com algum serviço de inspeção destinados a produção de queijos (EMBRAPA, 2020).

O processo de pasteurização da matéria prima, obrigatório para produção de derivados lácteos (BRASIL, 2017), é uma etapa do processamento tecnológico do leite que visa a eliminação da microbiota patogênica e deteriorante, tornando o produto e seus derivados seguros para o consumo (FOX e GUINEE, 2013). Entretanto, várias etapas do processo produtivo pós pasteurização podem atuar como pontos de contaminação dos alimentos, podendo comprometer tanto a sua qualidade, como a segurança e vida útil (JOHNSON, 2017). Dessa forma, as empresas constantemente devem monitorar e controlar o seu processamento, minimizando problemas e garantindo alimentos de qualidade para os consumidores.

Queijo muçarela é um dos principais derivados lácteos produzidos e consumidos no Brasil (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2020) e seu processo de fabricação compreende etapas como coagulação, mexedura, fermentação, filagem, moldagem, salga, secagem e embalagem (FUSCO, CHIEFFI e ANGELIS, 2022).

A escala de produção mundial e nacional do produto, a difusão de sua utilização na alimentação humana, gera a necessidade de compreensão dos fatores que afetam sua qualidade e inocuidade durante o processo produtivo. Tal medida visa conhecer a influência dessas etapas na qualidade do produto, atendimento aos padrões legais estabelecidos, estimar a vida útil, bem como estabelecer os pontos do fluxograma onde falhas podem comprometer a qualidade e segurança para o consumidor.

Ainda, é preciso conhecimento técnico e científico para a fundamentação desses programas em conformidade com características particulares de umidade e temperatura de determinadas regiões, como o norte do Tocantins, caracterizado por alta temperatura e umidade (ROLDÃO e FERREIRA, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar, por abordagem microbiológica e biotecnológica, o efeito das etapas do processo de fabricação do queijo muçarela na sua qualidade, segurança ao consumo e vida útil, verificando pontos críticos biológicos na indústria regularmente em operação na região norte do Tocantins, fundamentando e subsidiando procedimentos de higiene operacional específicos e estratégicos para sustentabilidade da bovinocultura leiteira no estado.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar indicadores e patógenos em leite cru refrigerado previamente ao processamento industrial em laticínio do norte do Tocantins;
- Verificar o efeito da pasteurização nas contagens e diversidade genética de indicadores microbiológicos;
- Verificar o efeito da inoculação de culturas *starter* de bactérias ácido lácticas antagonistas à patógenos nas contagens microbiológicas e ocorrência de patógenos na massa láctea fermentada;
- Determinar o efeito da filagem térmica da massa ácida fermentada nas contagens de indicadores microbiológicos e na ocorrência de patógenos;
- Verificar o impacto da salmoura na peça de muçarela nas contagens de micro-organismos indicadores e na ocorrência de patógenos;
- Determinar a qualidade e segurança microbiológica de queijos muçarela produzido por laticínio do norte do Tocantins durante e ao final da vida útil; e,
- Verificar, durante o processamento do leite e produção do queijo muçarela, os principais pontos de contaminação microbiológica que podem comprometer a sua vida útil e determinar procedimentos padrão de higiene operacional de forma estratégica para aumento da produtividade do setor lácteo no norte do Tocantins.

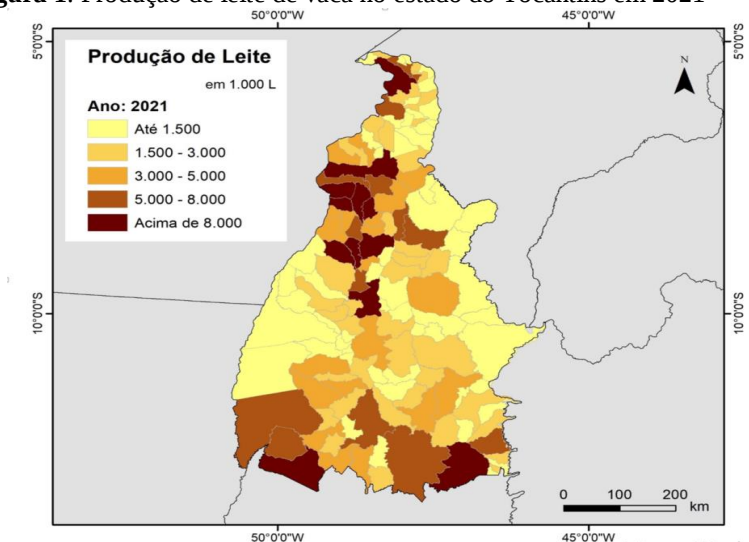
3 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de leite no Brasil e no Tocantins

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

Os estados de Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul concentram 51% do volume de produção de leite, já o estado do Tocantins responde por 1,15% da produção nacional (EMBRAPA, 2022). No Tocantins a pecuária leiteira é concentrada, majoritariamente, entre pequenos produtores com baixo nível de tecnificação da produção, o que conhecidamente implica em problemas de qualidade da matéria-prima (leite cru) para o setor de laticínios (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2015). Contando com 22.498 estabelecimentos produtores de leite (EMBRAPA, 2021) e com volume de 437.625 mil litros em 2021 (IBGE, 2022), o estado do Tocantins não figura-se entre os principais produtores nacionais, entretanto, a atividade é importante fonte de renda nas regiões norte e sul do estado (Figura 1). Tais regiões concentram diversas empresas de laticínios que produzem, em sua maioria, queijo muçarela, abastecendo principalmente mercados regionais (norte e nordeste) além de estados do centro-oeste (Goiás) e sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo). Essas empresas geram empregos e desenvolvimento regional, em especial na região norte do estado, conhecida como Bico do Papagaio, a qual abriga 12 indústrias de pequeno e médio porte sob registro de inspeção oficial.

Figura 1. Produção de leite de vaca no estado do Tocantins em 2021



Fonte: EMBRAPA (2021)

3.2 Consumo e tecnologia de produção de queijo muçarela

Muitos especialistas consideram a Idade Média como o marco inicial da fabricação de queijos, entretanto, há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos que revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C. (PERRY, 2004). É um produto mundialmente difundido e que apresenta variadas formas, sabores e texturas (FUSCO, CHIEFFI e ANGELIS, 2022). No Brasil o consumo *per capita* de queijos é ainda baixo, cerca de 5,6 quilos por ano, contra 12 quilos consumidos na Argentina, sendo o queijo muçarela o produto mais consumido nessa categoria (ABIQ, 2022).

Sua composição é fortemente influenciada pela composição do leite, principalmente pelo teor de gordura, proteína, cálcio e valor de pH (FOX e GUINEE, 2013), sendo um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B (PERRY, 2004). O consumo regular de leite e derivados favorece o metabolismo humano de várias maneiras, fornecendo aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos, ou afetando a absorção de nutrientes (HÁUG, HOSTMARK e HARSTAD, 2007).

Queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído - integral, parcial ou totalmente desnatado - ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por micro-organismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos (BRASIL, 2017).

O queijo muçarela compreende uma ampla gama de tipologias de produtos obtidos com diferentes tecnologias (TIRLONI et al., 2019), podendo enquadrar-se como um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo e semigordo (BRASIL, 1997) e é considerado um queijo fresco já que está pronto para o consumo logo após a sua fabricação (BRASIL, 2017), não havendo, dessa forma, processo de maturação. É considerado uma *commodity*, na qual são usados fermentos selecionados para obter padronização e uma identidade de produto altamente reproduzível (JANY, BARBIER, 2008).

Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida – mais de 1.000 tipos, sendo que só na França fabricam-se 400 deles (PERRY, 2004).

O processo de fabricação da maior parte dos diferentes tipos de queijos envolve a combinação de quatro ingredientes: leite, coalho, micro-organismos e sal, os quais são processados através de uma série de etapas comuns, como formação de gel, expulsão de soro, produção de ácido e adição de sal, seguido ou não por um período de maturação (BERESFORD et al., 2001).

Nas últimas décadas os avanços tecnológicos nos equipamentos de fabricação de queijos e no manuseio da coalhada permitiram a mecanização e a automação necessárias para o aumento expressivo na produção e resultaram em um produto uniforme, com redução da contaminação bacteriológica e redução dos custos de fabricação (JOHNSON, 2017). Todavia, há ainda a necessidade de assistência técnica continuada aos produtores da matéria-prima com o intuito de contribuir para a produção de um leite com menor contaminação, tendo em vista que a carga bacteriana inicial e a contagem de células somáticas influenciam diretamente no rendimento e na qualidade do produto final (GASPAROTTO et al., 2019).

Neste processo há a concentração do leite no qual parte dos componentes sólidos, principalmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada enquanto as proteínas do soro, lactose e sólidos solúveis, são removidos no soro (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009). Para ser eficiente, a fabricação industrial de queijo requer processos de tempo fixo, que por sua vez exigem uma matéria-prima de alta qualidade (JOHNSON, 2017).

3.2.1 Seleção da matéria-prima – Leite

A qualidade do leite beneficiado é determinada principalmente pela integridade da matéria-prima, o leite cru (FERNANDES, PEREIRA e PINHO, 2013). Neste sentido, as características e composição intrínsecas do leite, bem como fatores extrínsecos, como a contaminação microbiana, são determinantes na qualidade do leite cru e, conseqüentemente, na vida de prateleira do produto processado (RIBEIRO JUNIOR et al., 2019). Fatores relacionados a deficiências de boas práticas de higiene no processo de ordenha, refrigeração e transporte, além de altas contagens de bactérias totais e contagem de células somáticas, geram baixo potencial tecnológico da matéria-prima e conseqüente diminuição do *shelf life* dos produtos fabricados (BELOTI, 2015). Além disso, o leite para produção de queijo deve estar livre de contaminantes químicos e ácidos graxos livres, que causam sabores desagradáveis no produto final, e antibióticos, que inibem as culturas bacterianas (FOX e GUINEE, 2013).

A seleção do leite cru refrigerado ou leite cru em temperatura ambiente (latões), é realizada na plataforma de recepção da indústria, onde uma amostra do leite é encaminhada ao

laboratório físico-químico e submetidos às análises de rotina pelo controle de qualidade descritas no Quadro 1, segundo metodologia oficial (BRASIL, 2022a), sendo considerado de boa qualidade é direcionado ao tanque de recepção e submetido a filtração para retirada de impurezas macroscópicas, sendo refrigerado à 4 a 7°C (FURTADO, 2016).

Para a produção de derivados e leite fluido, o leite cru como matéria-prima deve atender ainda a padrões mínimos na sua composição centesimal. Para gordura e proteínas, as de maior importância tecnológica para a produção de queijos, deve-se atender o mínimo de 3 e 2,9%, respectivamente (BRASIL, 2018b). Outros parâmetros de qualidade devem ser atingidos pelos produtores, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros mínimos para leite cru refrigerado definido na Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, do MAPA.

ANÁLISE	PARÂMETRO
Teor de lactose anidra	Mín. 4,3g/100g
Teor de sólidos não gordurosos	Mín. 8,4g/100g
Teor de sólidos totais	Mín. 11,4g/100g
Acidez titulável	0,14 – 0, 18g de ác. láctico/100mL
Teste de alizarol conc. mín. 72% v/v	Estável
Densidade relativa a 15°C/ 15°C	1,028 - 1,034
Índice crioscópico	(-0,530°H) – (-0,555°H) (-0,512°C) – (-0,536°C)
Inibidores do crescimento microbiano	Ausência
Neutralizantes da acidez	Ausência
Reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico	Ausência
Substâncias estranhas (pus, sangue, urina)	Ausência
Contagem Padrão em Placas (CPP)	Máx. 300.000 UFC/mL
Contagem de Células Somáticas (CCS)	Máx. 500.000 CCS/mL

Fonte: Adaptado de BRASIL (2018b).

3.2.2 Pasteurização e padronização do leite

Para fabricação do queijo muçarela deve-se realizar a pasteurização que é um processo térmico que visa destruir os patógenos e reduzir o número de micro-organismos em geral presentes no leite e derivados (PERRY, 2004). Segundo o Regulamento da Inspeção

Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017) em seu Art. 255, §1º, são permitidos os seguintes processos de pasteurização do leite:

I - pasteurização lenta, que consiste no aquecimento indireto do leite entre 63°C (sessenta e três graus Celsius) e 65°C (sessenta e cinco graus Celsius) pelo período de trinta minutos, mantendo-se o leite sob agitação mecânica, lenta, em aparelhagem própria; e,

II - pasteurização rápida, que consiste no aquecimento do leite em camada laminar entre 72°C (setenta e dois graus Celsius) e 75°C (setenta e cinco graus Celsius) pelo período de quinze a vinte segundos, em aparelhagem própria.

O mesmo regulamento dispõe ainda que são permitidos outros binômios de tempo e temperatura, desde que comprovada a equivalência aos processos estabelecidos no § 1º (BRASIL, 2017).

Permite-se ainda a fabricação de queijos artesanais curados, a partir de leite cru, desde que haja certificação do estabelecimento rural livre de tuberculose e brucelose, controle de mastite, boas práticas agropecuárias (BPA) na produção leiteira, controle de potabilidade da água de abastecimento e rastreabilidade dos produtos (BRASIL, 2019). Entretanto, o dispositivo legal não abrange queijo muçarela, devido à ausência de período de cura no mesmo, podendo após secagem de aproximadamente 20h e embalagem ser destinado ao mercado consumidor (FURTADO, 2016).

Tendo em vista a otimização das etapas de produção, com processamento rápido de grandes volumes de leite, as fábricas de laticínios optam pela pasteurização rápida (JOHNSON, 2017), realizada em pasteurizador a placas, provido de controle de temperatura (termógrafo, termômetros de coluna na linha de distribuição e termômetros digitais) e válvula de desvio de fluxo automática. Sendo este, portanto, um Ponto Crítico de Controle (PCC) biológico obrigatório controlado pelo sistema de Análise e Perigos de Pontos Críticos de Controle (APPCC) das indústrias. O processo térmico descrito elimina bactérias patogênicas, no entanto, falhas no processo e contaminações pós-pasteurização podem ocorrer (FORSYTHE, 2013).

O teor final de gordura do queijo muçarela (~40% a 42% de gordura no extrato seco) exige que o leite possua gordura variando entre 2,8% a 3,1%, entretanto a média nacional é muito variável e geralmente superior aos valores citados (FURTADO, 2016), sendo utilizadas centrífugas desnatadeiras para padronização da matéria-prima, gerando um resíduo gorduroso de alto valor agregado (creme de leite de uso industrial) destinado ao fabrico de outros produtos lácteos, como manteigas e outros tipos de queijos gordos (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

3.2.3 Adição de coadjuvantes de processamento

O cálcio desempenha um papel fundamental na coagulação do leite pelo coalho e no posterior processamento do coágulo (FOX e GUINEE, 2013). Utiliza-se adição de cloreto de cálcio (0,02%) no leite pasteurizado para a fabricação de queijos para reposição do cálcio insolubilizado durante a pasteurização, pois este produto aumenta a firmeza da coalhada e reduz o tempo de coagulação (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

Muitas proteinases possuem efeito na coagulação do leite (FUSCO, CHIEFFI e ANGELIS, 2022), sendo a quimosina, uma enzima proveniente de estômagos de bezerros, mais amplamente difundida devido a proteólise moderada, melhor rendimento e não gerar sabores indesejados no produto final (FURTADO, 2016). Devido a demanda industrial crescente o gene da quimosina de bezerro foi clonado em *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* e a quimosina produzida por fermentação é agora amplamente utilizada (FOX e GUINEE, 2013).

3.2.4 Fermentação

O leite pasteurizado é depositado em tanques de aço inox próprios para fabricação de massas, onde recebe adição dos ingredientes como fermento, coalho e cloreto de cálcio. Na produção de queijo muçarela utiliza-se acidificação por adição de cultura microbiana termofílica ou ácidos orgânicos de qualidade alimentar (TIRLONI et al., 2019), sendo o primeiro mais difundido nacionalmente através de produtos liofilizados ou congelados.

Tradicionalmente, a tecnologia de fabricação de queijos era dependente da microbiota endógena do leite para produção de ácido, o que acarretava extensão lenta e variável da acidificação e vida útil do produto final indeterminada (FOX e GUINEE, 2013).

A pasteurização obrigatória elimina a maioria das bactérias capazes de fermentar a lactose sendo portando necessário o uso de cultura iniciadora (*starter*) adicionada para uma fermentação adequada (JOHNSON, 2017). Utiliza-se fermentos liofilizados DVS (*direct vat starters*) que são culturas superconcentradas, com alta atividade, para inoculação direta no tanque de fabricação, o que elimina o preparo e a manipulação que podem gerar contaminações (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

Atualmente utiliza-se culturas termofílicas como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, que é o grande responsável pela aceleração do abaixamento do pH necessário para a etapa de filagem, entretanto, outras culturas podem ser utilizadas em substituição

parcial (<20%), como *Lactobacillus helveticus* ou cultivos mesófilos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (FURTADO, 2022).

Segundo Beresford et al. (2001), a microbiota presente nos queijos pode ser dividida em dois grupos:

I - Bactérias lácticas iniciadoras (*starters*) – BAL – São isolados que produzem ácido suficiente para reduzir o pH do leite para <5,3 em 6 horas a 30-37°C, sendo adicionadas deliberadamente no início da fabricação ou podem ser contaminantes naturais do leite, como é o caso de muitas variedades de queijos artesanais feitos de leite cru.

II - Bactérias lácticas não iniciadoras – NSLAB - são lactobacilos e pediococos mesófilos, que formam uma porção significativa da microbiota da maioria das variedades de queijo durante a maturação.

A produção de ácido pelas BALs desempenha vários papéis na fabricação de queijos tais como: controla e previne a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas; afeta retenção e a atividade do coagulante durante a coagulação; solubiliza fosfato de cálcio afetando, portanto, a textura do queijo; promove sinérese e consequentemente influencia a composição do queijo; e, também a atividade de enzimas durante a maturação (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

A acidificação devida aos micro-organismos ácido-láticos resulta na precipitação da caseína e formação de coágulo, que é separado da fração líquida (FORSYTHE, 2013).

3.2.5 Coagulação

Além da temperatura de cozimento e manuseio da coalhada que desempenham um papel importante na determinação das características de cada tipo de queijo, a microbiota (autóctone ou adicionada) desempenha um papel crítico e fundamental no desenvolvimento das características únicas de cada variedade de queijo (BERESFORD et al., 2001).

Quando uma quantidade suficiente de ácido é produzida, a principal proteína do leite (caseína) coagula no seu ponto isoelétrico (pH 4,6), dando origem a um gel que prende a gordura e a fase aquosa (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009). Utiliza-se temperaturas entre 36° a 38°, ideal para a multiplicação da cultura adicionada (FURTADO, 2022).

A etapa da coagulação da massa pode ser um importante ponto de incorporação de contaminação ambiental e fecal na massa, principalmente através de utensílios, que em contato com o piso, ou por deficiência na higienização, transportam e/ou incorporaram micro-organismos indesejáveis para a massa da muçarela (FOX e GUINEE, 2013).

O gel de coalhada formado é bastante estável, mas apresenta sinérese (saída do soro) quando é cortada ou quebrada (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009). Tal procedimento de corte promove a quebra do gel, permitindo que o soro flua (SMITH et al., 2018). O procedimento é realizado no tanque de fabricação através de liras de forma manual ou através de sistema automatizado, formando cubos grandes de 1,5 x 1,5 x 1,5 cm de lado e posterior repouso para promoção da sinérese (FURTADO, 2022).

A massa então é aquecida a temperatura de 40 a 43°C (FURTADO, 2022), aplicando-se agitação constante para cozimento da mesma até a formação de grãos firmes e consistentes. Nessa condição, o excesso de soro é removido do interior dos grânulos da coalhada, retirando-se a maioria das proteínas solúveis, gordura não aderida ao grânulo e a lactose (FUSCO, CHIEFFI e ANGELIS, 2022).

3.2.6 Dessoragem, pré-prensagem, fermentação da massa

Quando o grau desejado de sinérese ocorre, conforme julgado subjetivamente pelo queijeiro, a coalhada é separada do soro (FOX e GUINEE, 2013), a dessoragem pode ser realizada de forma total, prensando-se a massa manualmente ou através de equipamentos dotados de sistema pneumático de pressão (drenoprensa) e retirando-se o soro residual ou de forma parcial deixando-se a massa mergulhada em soro para manutenção da temperatura e aceleração da fermentação (FURTADO, 2022).

Durante o processo de fermentação, a massa então dessorada é mantida em mesas de fermentação nas quais a microbiota inoculada permanece promovendo alterações organolépticas no produto e reduzindo o pH, importante para a etapa posterior na fabricação de muçarela (FUSCO, CHIEFFI & ANGELIS, 2022). Esse procedimento é necessário porque grande parte do ácido láctico gerado durante a fermentação é removido com o soro (BERESFORD, 2001).

3.2.7 Filagem e moldagem

Nos queijos de massa filada a acidez provocada pela fermentação leva a uma progressiva desmineralização da coalhada, a qual atinge pH entre 4,8 a 5,2 sendo aquecida em água quente ou a vapor, esticada e moldada no formato desejado (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009; FURTADO, 2022).

O processo de filagem, necessário para realização do estiramento da massa conferindo a esticabilidade característica do produto, utiliza água quente ($\sim 70\text{--}80^\circ\text{C}$) e a massa atinge entre 58 a 60°C , que no pH ideal, alinha as moléculas de caseína, conferindo uma característica fibrosa, oleosa e brilhante à massa (FOX e GUINEE, 2013). Além de um processo tecnológico, a filagem é um ponto de controle para micro-organismos termossensíveis, devido ao binômio tempo/temperatura utilizado, sendo esperado que, mesmo havendo contaminação introduzida pós pasteurização, haja a diminuição de células viáveis nesta etapa (OLIVEIRA et al., 2017).

A massa quente e elástica que sai do equipamento monobloco, responsável pelo processo de picagem, filagem e moldagem de forma contínua, é recolhida em formas retangulares já no tamanho adequado a mesma (FURTADO, 2022).

Após a introdução da massa nas formas, é recomendado o resfriamento da massa filada em água gelada entre 5 a 10°C por 15 a 20 minutos para resfriamento da mesma abaixo de 25°C antes da imersão em salmoura para manutenção da forma, evitar excessiva absorção de sal com consequente perda de gordura para o meio e aquecimento da salmoura (FURTADO, 2022; FUSCO, CHIEFFI e ANGELIS, 2022).

3.2.8 Salga e secagem

Dentre as várias etapas da fabricação de queijos, a salga destaca-se por sua grande importância, uma vez que o sal (NaCl) possui várias funções nos queijos, tais como: conferir sabor, controle do desenvolvimento microbiano, regulação dos processos bioquímicos (enzimas) e físico-químicos, durabilidade, entre outros (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

A multiplicação e a sobrevivência das bactérias são fortemente afetadas pela atividade de água (a_w) (FOX e GUINEE, 2013), havendo uma relação entre a quantidade de sal adicionada ao produto e a inibição de bactérias iniciadoras e deteriorantes pelo efeito deste na redução de a_w (BERESFORD et al., 2001).

A salga é feita em salmoura com 19° a 22° Baumé (Bé), pH de $5,0$ a $5,3$ e temperatura entre 7 a 10°C , por 24 horas para peças de aproximadamente quatro quilos (FURTADO, 2022).

O processo de secagem dá-se com as peças expostas em prateleiras por cerca de 24 horas, em câmara fria a 10-12°C, com aproximadamente 85% de umidade relativa do ar (FURTADO, 2022).

3.2.9 Embalagem primária e secundária

A embalagem primária tem como função proteger o produto contra contaminações do meio ambiente, perda de umidade e como meio de identificação e publicidade do produto (FOX e GUINEE, 2013).

Para queijo muçarela é utilizado embalagem primária plástica de polietileno bromatologicamente apta para contato com alimentos, termosoldável à vácuo e termoencolhível (FURTADO, 2022). A embalagem secundária tem por finalidade envolver e proteger embalagens primárias agrupadas, sendo utilizado papelão ou plástico com capacidades variadas de acordo com a demanda do mercado consumidor (AUGUSTO, 2018).

3.2.10 Estocagem

Embora não seja um queijo maturado, o queijo muçarela fresco, tem suas propriedades funcionais otimizadas por um período de estabilização de aproximadamente 15 dias, necessário para solubilização da caseína e distribuição mais homogênea do sal (SMITH et al., 2018), o qual é realizado com o produto já embalado em câmaras frias a uma temperatura inferior a 10°C, temperatura esta, que deve ser mantida em toda a cadeia de distribuição até o consumo do produto (FURTADO, 2022).

3.2.11 *Shelf-life*

O *shelf life* pode ser definido como o tempo transcorrido desde a produção e a embalagem do produto até o ponto em que ele se torna inaceitável para consumo. (FORSYTHE, 2013). Após a embalagem primária, inicia-se o período de estocagem para a posterior distribuição e exposição a venda. Até o consumo, o produto deve apresentar conformidade com os padrões microbiológicos e físico-químicos previstos em legislação específica (BRASIL, 2022a). O período de vida útil desse produto é considerado enquanto ele atende esses requisitos (FORSYTHE, 2013).

A multiplicação e a sobrevivência de patógenos no queijo como resultado da contaminação durante as diversas etapas de produção ou mesmo em produtos já embalados dependem da atividade da água, competitividade com outras bactérias e pH do queijo (JONHSON, 2017). A embalagem é uma proteção física do produto que permite uma melhor conservação dos alimentos e aumento da vida útil do produto (KAMBOJ et al., 2020).

Uma crescente demanda do mercado consumidor por produtos de alta qualidade, que mantenham suas características, revela a necessidade de análises que garantam a segurança microbiológica na produção e a vida de prateleira do produto (SANTOS, RIBEIRO e FONSECA, 2019).

3.3 Tipos e propriedades funcionais do queijo muçarela

A muçarela brasileira possui a finalidade de ralagem ou fatiamento, dessa forma, possui teor de umidade baixo (45% a 52%) assemelhando-se mais ao *Pizza Cheese* norte-americano que a *Mozzarella* italiana que possui aspecto macio e teor de umidade mais elevado, com finalidade de consumo direto (FURTADO, 2016), utilizada principalmente como cobertura de pizza e difere significativamente do tradicional queijo muçarela fresco, tanto em funcionalidade quanto em aparência (SMITH et al., 2018).

As propriedades funcionais da muçarela (elasticidade, derretimento, fusão, separação de gordura e escurecimento) passaram a ser muito mais importantes do que o sabor em si (FURTADO, 2022). Por ser consumida de forma indireta, principalmente como ingrediente em preparações culinárias com vários outros ingredientes associados a percepção de sabor acaba se tornando um fator de menor relevância, sendo as propriedades funcionais os atributos mais importantes na determinação da qualidade do produto final, que influenciará diretamente na aceitação do mesmo pelos consumidores (LANDIM et al., 2021).

3.4 Padrões de qualidade, segurança e identidade

3.4.1 Padrões sensoriais e físico-químicos para queijo muçarela

O poder público responde à crescente demanda dos consumidores pela segurança alimentar e melhoria da qualidade por meio da regulamentação de normas que visam ao controle das etapas do processamento dos alimentos, com o objetivo de garantir inocuidade,

integridade e aperfeiçoamento dos processos de produção (SANTOS, RIBEIRO e FONSECA, 2019).

Tendo em vista as características distintas do processo de fabricação do queijo muçarela, foram estabelecidos requisitos regulamentados para definição de seus padrões de identidade e qualidade (BRASIL, 1997), descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Requisitos sensoriais e físico-químicos para queijo muçarela definido na portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997, do MAPA

Características Sensoriais	
Consistência	Semidura e semisuaue, suave, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação.
Textura	Fibrosa, elástica e fechada.
Cor	Branco e amarelado, uniforme, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação.
Sabor	Láctico, pouco desenvolvido a ligeiramente picante, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação.
Odor	Láctico pouco perceptível.
Crosta	Não possui.
Olhadura	Não possui. Eventualmente poderá apresentar aberturas irregulares (olhos mecânicos).
Requisitos Físico-Químicos	
Umidade g/100g	Máx. 60,00
Matéria Gorda no Extrato Seco g/100g	Min 35,00

Fonte: Adaptado de BRASIL, (1997).

3.4.2 Padrões microbiológicos

Os critérios microbiológicos são definidos por dois órgãos governamentais que estabelecem critérios diferentes, o MAPA que realiza avaliações diretamente nas indústrias de processamento sob inspeção federal e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que realiza avaliações no âmbito do comércio e serviços alimentares em produtos prontos para oferta ao consumidor (BRASIL, 2018a; 2022a). Os resultados analíticos devem ser avaliados segundo os critérios descritos no Quadro 3 em um plano amostral de 3 classes, aplicando as seguintes interpretações (BRASIL, 2018a; 2022a):

- a) satisfatório com qualidade aceitável, quando o resultado observado em todas as unidades amostrais for menor ou igual a m;
- b) satisfatório com qualidade intermediária, quando o número de unidades amostrais com resultados entre m e M for igual ou menor que c e nenhuma unidade amostral apresentar resultado maior que M; ou
- c) insatisfatório com qualidade inaceitável: quando o número de unidades amostrais com resultados entre m e M for maior que c ou alguma unidade amostral apresentar resultado maior que M.

Quadro 3. Critérios microbiológicos para queijo muçarela Critérios microbiológicos para queijo muçarela

MICRO-ORGANISMOS	MAPA	ANVISA
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=1000 M=5000	Não estabelecido
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=100 M=500	Não estabelecido
<i>Escherichi coli</i>	Não estabelecido	n=5 c=2 m=100 M=500
Estafilococos Coagulase Positiva/g	n=5 c=2 m=100 M=1000	n=5 c=2 m=100 M=1000
Enterotoxinas estafilocócicas	Não estabelecido	n=5 c=0 m=0
<i>Salmonella</i> spp./25g	n=5 c=0 m=0	n=5 c=0 m=0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	n=5 c=0 m=0	n=5 c=0 m=100

Fonte: Adaptado de BRASIL, (2018a; 2022a).

3.4.3 Perigos microbiológicos à saúde pública relacionados a produtos lácteos

Uma doença transmitida por alimento (DTA) é causada pela ingestão de alimento contaminado por micro-organismos patogênicos, toxinas ou seus metabólitos (BRASIL, 2022a). Entretanto, é difícil estimar a proporção de doenças transmitidas pelo leite e seus derivados entre as doenças transmitidas por outros tipos de alimentos devido a fatores relacionados a subnotificação de casos, investigação limitada de surtos registrados, envolvimento de diversos tipos de alimentos e não padronização dos sistemas de vigilância (BUYSER et al., 2000). Dados epidemiológicos de surtos de origem alimentar no país entre

2015 e 2020 demonstram a ocorrência de 3.469 surtos, com 52.629 pessoas doentes, 7.110 hospitalizados e 61 óbitos (BRASIL, 2022b).

Os laticínios, pela própria matéria-prima que utilizam e pelo alto teor de umidade nos locais de produção, são ambientes suscetíveis a contaminação bacteriológica (PERRY, 2004), sobretudo nas etapas do processo de fabricação que compreende, pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, enformagem, salga, secagem, maturação e embalagem, configuram-se como possíveis fatores que contribuem para a contaminação do queijo (CASTRO et al. 2012).

Neste sentido, deve haver um maior cuidado na elaboração e aplicação dos programas de autocontrole das indústrias, em especial no que se relaciona à higiene dos manipuladores e a limpeza e desinfecção de equipamentos e superfícies que entram em contato com o alimento, e maior rigor na fiscalização pelos órgãos de inspeção oficial, com intuito de reduzir a comercialização de produtos contaminados (MARINHEIRO et al., 2015).

Os principais agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil são, *Salmonella* spp, Rotavírus, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp., norovírus, coliformes fecais, Vírus da Hepatite A, *Giardia lamblia* e *Aeromonas* ssp. que representam 53,79% dos casos identificados entre 2000 e 2021 (MARQUES e TRINDADE, 2022). O Quadro 4 descreve identificação de micro-organismos indicadores não conformes com os padrões legais e patógenos identificados em diversos produtos lácteos no Brasil.

Quadro 4. Perigos microbiológicos à saúde pública encontrados em produtos lácteos verificados por trabalhos disponíveis na literatura

Produto lácteo	Local de coleta	Tipo de processamento	Perigos microbiológicos/inconformidades encontradas	Referência
Queijo Minas Frescal	Paraná	Pasteurizado e não pasteurizado	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga (STEC) e enteropatogênica (EPEC)	Ribeiro Júnior et al. (2019)
	Tocantins	Não pasteurizado	Coliformes totais, coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> (EPEC, STEC e EHEC) e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.	Oliveira et al. (2021)
Queijo Minas Padrão	Minas Gerais	Pasteurizado	Aeróbios mesófilos Bolores e leveduras <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Sá (2012)
Queijo Muçarela	Rondônia	Pasteurizado	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Gasparotto et al. (2019)
	Bahia	Não identificado	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp.	Castro et al. (2012)

Queijo Muçarela (fatiado)	Rio Grande do Sul	Pasteurizado	Coliformes termotolerantes, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	Marinheiro et al. (2015)
Queijo Muçarela (leite de búfala)	Rio Grande do Sul	Pasteurizado	<i>Staphylococcus aureus</i>	Friedriczewski et al. (2018)
Queijo de Coalho	Pernambuco	Não identificado	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Freitas et al., (2009)
	Rio Grande do Norte	Não pasteurizado	<i>Salmonella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> e presença de coliformes totais e termotolerantes	Medeiros et al. (2017)
	Ceará	Pasteurizado e não pasteurizado	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Borges et al. (2008)
	Alagoas	Pasteurizado e não pasteurizado	<i>Salmonella</i> spp. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Munhoz et al. (2021)
Queijo Canastra	Minas Gerais	Não pasteurizado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , coliformes totais, <i>Staphylococcus</i> spp. Enterotoxinas SEC e SEB	Borelli et al. (2006)
Leite pasteurizado	Rio Grande do Sul	Pasteurizado	Coliformes termotolerantes	Mulinari, Rosolen e Adami, (2017)
Iogurte	Região sul do Brasil	Pasteurizado	Coliformes termotolerantes	Mendes et al., (2020)
Doce de Leite	Minas Gerais	Pasteurizado	Aeróbios mesófilos Bolores e leveduras <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	Sá (2012)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Micro-organismos indicadores da qualidade

Os micro-organismos indicadores são mais utilizados para indicar a segurança e a higiene dos alimentos, na maioria de origem intestinal, ambiental ou da manipulação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.5.1 Aeróbios mesófilos

A utilização da contagem total de aeróbios mesófilos como indicador de qualidade pode indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SANTOS, RIBEIRO e FONSECA, 2019).

A eficiência do processo de pasteurização do leite e a utilização de culturas ácido lácticas selecionadas em produtos fermentados, principalmente mesófilas (com poucas cepas termófilas), produz uma série de fatores de antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, nisinas e outras bacteriocinas, o que configura-se como um fator de

controle para micro-organismos patogênicos e deteriorantes, sendo o aumento da contagem de aeróbios mesófilos esperado após a fase de fermentação (FORSYTHE, 2013).

3.5.2 Bactérias psicrotróficas

Alguns micro-organismos, conhecidos como psicrotróficos, são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e produzir lipases e proteases que alteram a qualidade nutricional dos alimentos, além da integridade dos seus constituintes (PERRY, 2004). Bactérias psicrotróficas possuem baixa resistência ao tratamento térmico, entretanto suas enzimas são termoestáveis, resistindo ao processo de pasteurização o que pode implicar em problemas tecnológicos de qualidade para o leite fluido e derivados (RAATS et al., 2011) como a geleificação e sedimentação do leite UHT (VIDAL-MARTINS et al., 2005), sensoriais como a rancificação pela hidrólise de lipídios (VARGAS et al., 2015) e desenvolvimento de sabor amargo pela proteólise (NÖRNBERG, TONDO e BRANDELLI, 2009).

A legislação brasileira estabelece que a conservação e expedição do leite nas propriedades rurais seja de até 5°C (BRASIL, 2020) com refrigeração em tanques de expansão direta de uso individual ou comunitário e tempo transcorrido entre coletas não superior a 48 horas (BRASIL, 2018c). Entretanto, a refrigeração como ferramenta isolada no controle microbiológico da matéria prima não é suficiente, já que há uma alteração do perfil microbiológico com desenvolvimento de bactérias psicrotróficas demonstrado por vários estudos (ERCOLINI et al., 2008; BELOTI et al., 2015; RIBEIRO JUNIOR et al., 2015; RIBEIRO JUNIOR et al., 2018). Neste sentido, deficiências relativas a boas práticas agropecuárias, mistura de leite com diferentes cargas bacterianas em tanques coletivos, abusos na temperatura de refrigeração e tempo excessivo entre as coletas favorecem a multiplicação de bactérias psicrotróficas e geram baixa qualidade da matéria-prima (ARCURI et al., 2008; ÂNGELO et al., 2014; DIAS et al., 2021).

3.5.3 *Staphylococcus aureus*

São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, que se multiplicam na presença de cloreto de sódio (NaCl), estando presentes na pele e mucosas do ser humano e animais (AUGUSTO, 2018).

A existência do *Staphylococcus* spp. no leite está associada normalmente à contaminação na obtenção da matéria-prima via manipulação de equipamentos e utensílios utilizados durante o transporte, o processamento e o armazenamento (LEMBI et al., 2020), dessa forma, são indicadores da qualidade higiênico-sanitária da manipulação.

A presença de *S. aureus* em leite cru e produtos lácteos crus mostraram que o consumo destes produtos pode ser um risco potencial de intoxicação de origem alimentar (JAMALI, 2015). Dessa forma, medidas de higiene na obtenção do leite devem ser tomadas, tendo em vista uma menor carga bacteriana inicial que deve ser controlada através do processo de pasteurização (ASSUMPÇÃO et al., 2003).

3.5.4 Enterobactérias

Nesse grupo, estão compreendidos todos os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, bactérias entéricas como dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Citrobacter* e *Salmonella*, amplamente dispersos no ambiente. Em alimentos são, portanto, indicadores de contaminação ambiental (TORTARA, FUNKE e CASE, 2017), principalmente incluída após a pasteurização do leite, uma vez que as bactérias dessa família não são termodúricas (BELOTI et al., 2015; RIBEIRO JUNIOR et al., 2020).

3.5.5 Coliformes totais

Coliforme é um termo geral para bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes ou cocobacilos (FORSYTHE, 2013). Pertencem a esse grupo bactérias de diferentes gêneros, e em alimentos são indicadores de contaminação ambiental (FRANCO e LANDGRAF, 1996). São bactérias bastante sensíveis a temperatura e são eliminadas pela pasteurização (OLIVEIRA et al., 2017).

3.5.6 Coliformes termotolerantes

São bastonetes curtos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos que vivem no trato intestinal do ser humano e dos animais e, em alimentos, indicadores higiênico-sanitários e da possível presença de enteropatógenos. É composto dos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, espécies patogênicas do gênero *Salmonella*, *Shigella* e algumas

cepas de *E. coli*, além de deteriorantes como *Proteus vulgaris* e os gêneros *Serratia* e *Erwinia* (AUGUSTO, 2018).

3.5.7 *Escherichia coli*

E. coli é um bastonete curto Gram-negativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, anaeróbio facultativo e muitos isolados fermentam lactose (FORSYTHE, 2013). Muitos dos sorovares de *E. coli* não são patogênicos e fazem parte da microbiota intestinal de humanos e animais (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A recuperação e contagem de *E. coli* é usada em alimentos como indicador confiável de contaminação fecal e indica uma possível presença de micro-organismos enteropatogênicos e/ou toxigênicos que podem constituir um perigo para a saúde pública (ALTAHI, 2009). Alia-se a isso que as toxinas produzidas por *E. coli* patogênicas não são inativadas pelo processo térmico de pasteurização (RASOOLY e DO, 2010).

3.6 Micro-organismos patogênicos

3.6.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Entre os coagulase positiva, destacam-se as espécies *S. aureus*, *S. hycus*, *S. intermedius* e *S. coagulans*, sendo a primeira a mais prevalente em alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

São responsáveis por sérias intoxicações alimentares, devido às toxinas que formam durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos (PERRY, 2004) a qual é responsável pela síndrome do choque tóxico, uma infecção grave caracterizada por febre alta, vômitos e, às vezes, morte (TORTARA, FUNKE e CASE, 2017).

Em um estudo retrospectivo de análises oficiais realizadas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária entre os anos de 2011 e 2015 em diversos produtos lácteos (leite pasteurizado, manteiga, queijo muçarela, iogurte, etc.) identificou-se que, das 1816 amostras de queijo muçarela, 4,40% (80) apresentaram resultado fora dos padrões legais para *Staphylococcus* coagulase positiva (SANTOS, RIBEIRO e FONSECA, 2019). Tal fato denota que, o processo de pasteurização e o aquecimento da massa para realização do processo de filagem não foram suficientes para eliminação do micro-organismo e/ou houve contaminação em fases posteriores do processo (DITTMANN et al., 2017).

Estudos recentes demonstram que cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vaca cru podem ter evoluído para possuir forte capacidade de formação de biofilme na presença de leite, embora o mecanismo permaneça indefinido (SHEN et al., 2021), podendo se desenvolver em diversos tipos de superfícies como aço inoxidável, vidro ou polietileno de alta densidade (FIEDRICZEWSKI, 2018; REGECOVÁ, 2022).

A detecção de *S. aureus* em queijos ocorre tanto no Brasil (DITTMANN et al., 2017; GASPAROTTO et al., 2019; CASTRO et al., 2020) quanto em outros países, inclusive com a detecção de enterotoxinas (VITALE et al., 2015; MANOVSKA et al., 2021) e cepas resistentes a antibióticos (LEMMA et al., 2021; KASEM, AL-ASHMAWY, ABDELKHALEK, 2021; REGECOVÁ et al., 2022).

Estudos anteriores estabeleciam que enterotoxinas estafilocócicas poderiam ser detectáveis nos alimentos a partir de contagens superiores 10^5 UFC/g (ASSUMPÇÃO et al., 2003). Entretanto, têm-se demonstrado a capacidade de produção de enterotoxinas pelo gênero *Staphylococcus* spp., tanto em espécies coagulase-positivas quanto negativas, inclusive na ocorrência de contagens bacterianas inferiores ao limite sobredito (GASPAROTTO et al., 2019).

3.6.2 *Salmonella* spp.

São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos, que habitam o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais (TORTARA, FUNKE e CASE, 2017).

A transmissão ocorre por um ciclo de infecção entre os seres humanos e os animais pelas fezes, água e pelos alimentos, particularmente os de origem animal (GERMANO e GERMANO, 2015). Podem ser classificadas em três grupos, de acordo com a doença gerada: a febre tifoide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

3.6.3 *Escherichia coli* diarreiogênica

As estirpes patogênicas de *E. coli* possuem fatores de adesão específicos que lhes permitem colonizar locais que *E. coli* não patogênica normalmente não habita, como o intestino delgado e a uretra (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). As cepas patogênicas de

E. coli são divididas, de acordo com os sintomas e com os mecanismos de patogenicidade em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). No Quadro 5, estão apresentados os principais patótipos de *E. coli* diarreio gênica e seus fatores de virulência específicos.

Quadro 5. Principais patótipos de *E. coli* diarreio gênica e seus fatores de virulência específicos.

Patótipo de <i>Escherichia coli</i>	Sigla	Fator de virulência	Gene de identificação
Enteropatogênica	EPEC	Proteína intimina	<i>eaeA</i>
Enteroagregativa	EAEC	Aderência localizada e fixando na mucosa	CVD432
Enterotoxigênica	STEC	Shiga toxina	<i>stx1, stx2</i>
Enteroinvasiva	EIEC	Mecanismo enteroinvasivo	<i>ipaH</i>
Enterotoxigênica	ETEC	Toxina termolábil, Toxina termoestável	ST, LT
Enterohemorrágica	EHEC	Aderência localizada e Shiga toxina	<i>eaeA + stx 1 e/ou 2</i>

Fonte: Aranda, Fagundes-Neto e Scaletsky, (2004).

3.6.4 *Listeria monocytogenes*

Micro-organismos do gênero *Listeria* são bastonetes pequenos, regulares, Gram-positivos, não esporogênicos, microaerófilos, capazes de se multiplicar à temperatura de refrigeração (AUGUSTO, 2018). É reconhecida como uma causa de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, que pode permanecer viável ou se multiplicar em amplas faixas de temperatura e pH, além de ter a capacidade de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio (BASTIN et al., 2022).

A listeriose em humanos pode causar meningite, septicemia, encefalite, perda fetal e morte, afetando principalmente grupos de maior risco como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas imunocomprometidas (BASTIN et al., 2022).

Produtos lácteos estão envolvidos em surtos de listeriose já que todos os queijos frescos e macios, incluindo muçarela, podem representar um ambiente de multiplicação adequado para *L. monocytogenes* devido às suas características físico-químicas (TIRLONI et al, 2019). Além disso, a presença de *L. monocytogenes*, agrava-se devido sua capacidade de gerar biofilmes mantendo-se viável em plantas industriais por longos períodos (OXARAN et al., 2017).

Em uma investigação realizada pela prefeitura de Hokkaido, no Japão, identificou-se que cepas de *L. monocytogenes* em queijos, amostras ambientais e paciente eram do mesmo sorotipo e deram padrões por genotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sugerindo a veiculação do patógeno através do consumo de queijos contaminados (MAKINO, 2005).

Tirloni et al. (2019), demonstraram a multiplicação de *L. monocytogenes* em amostras de queijo muçarela aplicando diferentes testes de desafio de temperaturas (4, 9, 15 e 20°C), verificando que a multiplicação não foi inibida nas diferentes temperaturas pesquisadas, tampouco pela microbiota presente ou pelas condições ambientais (ácidos orgânicos, pH) presentes na matriz alimentar.

3.7 Ferramentas de gestão da qualidade

O aumento das expectativas do consumidor e sua preocupação com a qualidade e segurança alimentar e a necessidade de cadeias alimentares diversificadas e economicamente rentáveis forçou as empresas na busca de melhoria da qualidade e a segurança alimentar padrões dos produtos através da implementação de sistemas de gestão (PANGHAL et al., 2018).

Diversas ferramentas são utilizadas para monitorar e controlar os processos produtivos, além de sistematizar a produção com homogeneidade e segurança. São realizadas de forma preventiva para garantir que o processamento não venha a incorporar nenhum tipo de perigo ao consumidor, assegurando o atendimento dos padrões de qualidade e menor risco à ocorrência de patógenos que podem comprometer a segurança.

Ferramentas de autocontrole são aquelas implantadas pelo setor de garantia da qualidade das empresas processadoras de alimentos para prevenir o risco da ocorrência de determinados tipos de perigos (ABNT, 2006). Além disso, tem por objetivo assegurar a higiene dos processos, instalações e manipuladores dos alimentos, resguardando direta e indiretamente a saúde dos consumidores, e resulta no aumento do rendimento e na minimização do custo de produção (KONDAKCI e ZHOU, 2017).

A metodologia de análise de perigos deve seguir da identificação de perigos e determinação de níveis aceitáveis, a seleção e avaliação das medidas de controle, bem como o estabelecimento de programas de pré-requisitos operacionais (ABNT, 2006). Tal avaliação é base para a implantação de sistemas de Análise e Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) que estabelece sistematicamente pontos de monitoramento, em uma linha específica

de produção, a fim de garantir a segurança do produto final (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Neste sentido, foi determinado nacionalmente através do Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) os programas de autocontrole, que são programas desenvolvidos, procedimentos descritos, implantados, monitorados e verificados pelo estabelecimento, com vistas a assegurar a inocuidade, a identidade, a qualidade e a integridade dos seus produtos, que incluam, mas que não se limitem aos programas de pré-requisitos, Boas Práticas de Fabricação - BPF, Procedimento Padrão de Higiene Operacional - PPHO e APPCC ou a programas equivalentes reconhecidos pelo MAPA (BRASIL, 2017).

Higiene em todos os aspectos do manuseio do leite, redução dos tempos de armazenamento, uso de temperaturas de refrigeração efetivas, disponibilidade de métodos para redução da microbiota patogênica e deteriorante e o emprego efetivo de sistemas APPCC são questões primordiais em toda a cadeia produtiva do leite (ERCOLINI, 2009; GASPAROTTO, 2019) e de efetividade comprovada na indústria de laticínios (MURESAN et al., 2020).

Cada etapa que pode eliminar ou reduzir o risco da ocorrência de um perigo físico, químico ou biológico ao consumidor deve ser monitorada, verificando continuamente o atendimento aos limites críticos e aplicando medidas corretivas imediatamente em qualquer caso de desvio (BRASIL, 2017). Dessa forma, a própria indústria consegue monitorar e garantir a produção de alimentos de forma segura.

REFERÊNCIAS

- ABIQ. Associação brasileira das indústrias de queijo. (2022). Acessado em 26/06/2023. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2448&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=29
- ABNT. NBR ISO 22000:2006. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Sistemas de gestão de segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. 1º ed., 2006.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**. 20. p. 913-917. 2009.
- ANDRETTA, M.; CALL, D.R.; NERO, L.A. (2023) Insights into antibiotic use in Brazilian dairy production. **International Journal of Dairy Technology**. Vol. 76. n 1. DOI: 10.1111/1471-0307.12914
- ÂNGELO, F. F.; RIBEIRO, C. S.; OLIVEIRA, L.; ARAUJO, T. F.; CARDARELLI, H. R. Bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Ano XII, n. 22, jan., 2014.
- ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov., 2008.
- ASSUMPÇÃO, E.G., PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55 n.3 Belo Horizonte jun. 2003.
- AUGUSTO, Pedro Esteves Duarte (ed.). **Princípios de tecnologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, vol. 3, 410p., 2018.
- BASTIN, B.; THOMPSON, W.; BENZINGER JR, M. J.; CROWLEY, E. S.; VANDOROS, E. J.; LEONTE, A. M.; THOMAS, D.; HUGHES, A.; CRABTREE, D.; EVANS, K.; SOHIER, D. Evaluation of the Thermo Scientific™ SureTect™ *Listeria monocytogenes* PCR Assay in a Broad Range of Foods and Selected Environmental Surfaces: Pre-Collaborative and Collaborative Study, First Action 2021.05. **Journal of AOAC International**, v. 105, n. 4, 2022. p. 1069-1091.
- BELOTI, V. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Editora Planta, 417p., 2015.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, 2001. p. 259-274.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enteroxigenic Staphylococcus spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 545- 550, 2006

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por Staphylococcus e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

BRASIL. 2022a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 724, de 1 de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 de julho de 2022, Edição 126, Seção 1, p. 205, 2022.

BRASIL. 2022b. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil Informe 2022. Acessado em: 27/06/2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022/view>

BRASIL. 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 55, de 30 de setembro de 2020. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de outubro de 2020, Edição: 189, Seção 1, pág.9, 2020.

BRASIL 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. LEI Nº13.860, DE 18 DE JUNHO DE 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de julho de 2019, Edição: 138, Seção 1, pág.6, 2018.

BRASIL 2018a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. PORTARIA Nº 837, DE 18 DE JUNHO DE 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de junho de 2018, Edição: 117, Seção 1, pág.1, 2019.

BRASIL. 2018b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de novembro de 2018, Edição: 230, Seção 1, pág.9, 2018.

BRASIL. 2018c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de novembro de 2018, Edição: 230, Seção 1, pág.10, 2018.

BRASIL. 2007. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 de março de 2017 e retificado em 01 de junho de 2017.

BRASIL. 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº364 de 07 de março de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 de setembro de 1997.

BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, p. 1-17, 2001.

CASTRO, et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo mussarela comercializados no Ceasa de Vitória da Conquista - BA. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 3, n. 23, p.407-413, 2012.

CASTRO, R. D.; PEDROSO, S. H. S. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, G. O.; LUIZ, K. C. M.; DIAS, R. S.; FILHO, R. A. T.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SANTOS, S. G.; NUNES, A. C.; SOUZA, M. R. VIRULENCE factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **J. Dairy Sci.** vol. 103, n. 3, p. 2098-2110, 2020.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17138>

DIAS, J. A.; OLIVEIRA, A. M.; MACEDO, S. C. C.; FARIA, G. V.; CONSTANTINO, N. A. S.; SILVA, F. A. C. Microrganismos deteriorantes do leite armazenado em tanques de resfriamento coletivo em Rondônia. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia*, ISSN 1677-8618; 83, 2021.

DITTMANN, K. K.; CHAUL L. T.; LEE S. H. I.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. DE; MARTINIS E. C. P. DE; ALVES, V. F.; GRAM, L.; OXARAN, VIRGINIE. *Staphylococcus aureus* in Some Brazilian Dairy Industries: Changes of Contamination and Diversity. **Frontiers in Microbiology**. vol. 8, article 2049, oct. 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02049

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Anuário Leite 2022: Pecuária leiteira de precisão**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1144110/anuario-leite-2022-pecuaria-leiteira-de-precisao> >. Acesso em: 02 de março de 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). (2021). Leite em Números – **Centro de Inteligência do Leite**. [Internet document] URL: <https://www.cileite.com.br/content/leite-numeros>. Acessado 13/04/2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Anuário Leite: 2020**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124722/anuario-leite-2020-leite-de-vacas-felizes> >. Acesso em: 23 de maio de 2021.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, n. 26, p. 228-231, 2009.

FAO. 2022a. Disponível em https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em 03 de janeiro de 2022a.

FAO. OCDE/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. 2022b., “Laticínios e produtos lácteos”, in: OECD FAO. Agricultural Outlook 2022-2031, **OECD Publishing**, Paris. DOI: <https://doi.org/10.1787/191239cc-en>

FAO. 2022c. FAOSTAT, Crops and Livestock products. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acessado em 10/04/2023.

FERNANDES, R. F.; PEREIRA, A. S. F.; PINHO, L. Influência da sazonalidade em parâmetros físico-químicos do leite cru recebido por um laticínio no norte de Minas Gerais. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 36-41, jul/ago., 2013.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 620 p.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P. (2013). Cheese Science and Technology. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health**. Chapter 17, p. 357-389.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; DUARTE, D. A. M.; VASCONCELOS, A. M. M.; RIBEIRO, A. R.; MOTA, R. A.; BALBINO, T. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 375-379, abr.-jun., 2009.

FRIEDRICZEWSKI, A. B.; GANDRA, E. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; CERESER, N. D.; MOREIRA, L. M.; TIMM, C. D. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo muçarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1528, 2018.

FURTADO, M.M. **Mussarela: Fabricação e Funcionalidades**. 1ª ed. São Paulo: Setembro Editora, 2016. 246p.

FURTADO, M.M. **Receituário brasileiro de queijos**. 1ª ed. São Paulo: Ed. do Autor, 2022. 331p.

FUSCO, V., CHIEFFI, D., DE ANGELIS, M. Resenha convidada: Queijos frescos de massa filada: composição, papel e evolução da microbiota em sua qualidade e segurança. **J. Dairy Sci.** Vol. 105 N° 12. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22254>

GASPAROTTO, P.H.G et al.. **Avaliação microbiológica para detecção de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo muçarela**. Revista Ciência e Saúde Animal. Vol. 1, nº1, 2019.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos. 5 ed. rev. e atual. Barueri: Manole, 2015.

HÁUG, A.; HOSTMARK, A.T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition: review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, p.25, 2007. DOI: 10.1186/1476-511X-6-25.

IBGE (2022). Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. SIDRA - Banco de tabelas estatísticas. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>> Acessado em 10/04/2023

ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species) – Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium, **International Organization for Standardization**, 1999, Amendment 1:2003.

ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* e Part 1: Detection Method. **International Organization for Standardization**, 1996, Amendment 1:2004.

ISO 6579. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for Detection of *Salmonella* spp. 4th ed., **International Organization for Standardization**, 2002, Amendment 1:2007.

JAMALI H.; PAYDAR M.; RADMEHR B.; ISMAIL SALMAH; DADRASNIA A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**. vol. 54, p. 383-388. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.013>

JANY, J.-L.; BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, v. 25, p. 839-848, 2008.

JOHNSON, M. E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, 2017.

KAMBOJ, S.; GUPTA, N.; BRANDAL, J. D.; GANDOTRA, G.; ANJUM, N. Food safety and hygiene: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 8, n. 1, p. 358-368, 2020.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P. e MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews – microbiology*, v. 2, p. 123-140, fev., 2004.

KASEM, N. G.; AL-ASHMAWY M.; ELSHERBINI M. E ABDELKHALEK A. Antimicrobial resistance and molecular genotyping of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from some Egyptian cheeses. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**. Vol. 2, n. 8, p. 246-255. Jun. 2021. <http://doi.org/10.5455/javar.2021.h509>

KONDAKCI, T., ZHOU, W. Aplicações recentes de técnicas avançadas de controle na indústria de alimentos. **Food Bioprocess Technol**. Vol. 10 , 522–542 (2017). <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11947-016-1831-x>

LANDIN, T. B.; COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; DE PAULA, J. C. J.; TEODORO, V. A. M.; MOREIRA, G. M. M. Principais propriedades funcionais do queijo muçarela, queijo prato e requeijão culinário – uma revisão. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 76, n. 2, p. 118-130, abr/jun., 2021.

LEITE, J.L.B.; STOCK, L.A.; RUBACK, B. (2022) Leite no mundo: produção, rebanho e produtividade continuam em crescimento. In: **Anuário Leite**, 2022, p.74–77.

LEMBI, M. K. S.; LIUTTI, J. T.; SABEC, G. Z.; KAWAMOTO, K. T. V. S. Análise microbiológica de queijo industrializado do tipo mussarela e condutas para obtenção de qualidade no seu processamento. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 4951-4964, may./jun., 2020.

LEMMA, FIKIRTE; HAILE ALEMAYEHU; ANDREW STRINGER; TADESSE EGUALE. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus aureus* in Milk and Traditionally Processed Dairy Products in Addis Ababa, Ethiopia. **BioMed Research International**. vol. 2021. Jul., 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5576873>

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 189-196, 2005.

MANOVSKA, M. R.; PRODANOV, M.; ANGELOVSKI, L.; JANKULOSKI, D.; SEKULOVSKI, P. Prevalence of the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese produced in north Macedonia. **Macedonian Veterinary Review**, v. 44, n. 1, p. 71-77, 2021.

MARINHEIRO M. F., GHIZZI L. G., CERESER N. D., DE LIMA H. G.; TIMM C. D. (2015). Microbiological quality of sliced and block mozzarella cheese. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 36, n. 3, p. 1329-1334. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1329

MARQUES, P. R. C.; TRINDADE, R. V. R. Panorama epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 2000 E 2021 No Brasil. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.51161/rem/3477>

MEDEIROS N. C, ROCIENE ABRANTES M, SOARES DE MEDEIROS J. M, DA SILVA CAMPÊLO M. C, DE OLIVEIRA REBOUÇAS M, ALVES COSTA M. G, ALVES DA SILVA J. B. Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses. **Semina: Ciências Agrárias**. 2017;38(4):1955-1962. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445752269025>

MENDES, D. M. S.; BASTOS, B. V.; KOKI, C. R.; BACH, D.; CONTINI, G. K.; MATTOS, L. A.; CUBO, M. F.; WOSIACK, P. A.; SILVA, R. G.; BARBOZA, R. A.; VALÉRIO, T. P.; LACERDA, L. G.; ESMERINO, L. A.; NOGUEIRA, A. Assessment of Microbial Contamination in Products of Animal Origin: Stretched-curd Cheese, Yogurt and Fresh Sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

MULINARI, E. L.; ROSOLEN, M. D.; ADAMI, F. S. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado produzido no Rio Grande do Sul. **Revista Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 14, n. 1, p. 28-35, 2017.

MUNHOZ, I.G.A.; ALCÂNTARA, V.F.; MERGULHÃO, B.C.R.; PEREIRA, W.A.M.B.; BARROS, Y.V.R.; ALMEIDA, R.C. Análise microbiológica comparativa de queijo coalho comercializado em supermercados e feiras livres na Cidade de Maceió – Alagoas. **Research**,

Society and Development, v. 10, n. 5, e9410514582, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14582>

MURESAN, C. C.; MARC, R. A. V.; JIMBOREAN, M.; RUSU, I.; MURESAN, A.; NISTOR, A.; COZMA, A.; SUHAROSCHI, E. Food safety system (HACCP) as Quality checkpoints in a Spin-Off small-scale yogurt processing plant. **Sustainability**, v. 12, n. 9472, 2020. doi:10.3390/su12229472.

NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrótróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, A. M.; KURIHARA, R. Y.; SILVA, F. F.; SILVA, F. G.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V. Condições higiênico-sanitárias da produção de queijos tipo mussarela e minas frescal comercializados no norte do Paraná. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 40-47, jan/mar, 2017.

OLIVEIRA, M. DA S., SANTOS, I. G. C. DOS, DIAS, B. P., NASCIMENTO, C. A., RODRIGUES, ÉZIO M., RIBEIRO JÚNIOR, J. C., ALFIERI, A. A., & ALEXANDRINO, B. (2021). Qualidade higiênico-sanitária e perigos microbiológicos de queijos Minas Frescal clandestinos comercializados no norte do Tocantins. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(2), 679–694. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p679>

OXARAN, V.; LEE, SHI; CHAUL, LT; CORASSIN, CH; BARANCELLI, GV; ALVES, VF; OLIVEIRA, CAF; GRAMA, L.; DE MARTINIS, ECP. Mudanças na incidência e diversidade de *Listeria monocytogenes* em algumas indústrias de laticínios e produtos varejistas brasileiros. **Microbiol Alimentar**. 2017, 68, 16–23.

PANGHAL, A.; CHHIKARA, N.; SINDHU, N.; JAGLAN, S. Role of Food Safety Management Systems in safe food production: A review. **Journal of Food Safety**, v. 38, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfs.12464>.

PAULA, J. C. J. de; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico a salga. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Mar/Jun, n. 367/368, v. 64, p. 19-25, 2009.

PERRY, K. S. P. **Queijos**: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quím. Nova*, 27:293-300, 2004. Disponível em:

RAATS, D.; OFFEK, M.; MINZ, D.; HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 465-471, 2011.

RASOOLY, R.; DO, P. M. Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 290-294, 2010.

REGECOVÁ, I.; VÝROSTKOVÁ, J.; ZIGO, F.; GREGOVÁ, G.; PIPOVÁ, M.; JEVINOVÁ, P.; BECOVÁ, J. Detection of Resistant and Enterotoxigenic Strains of *Staphylococcus warneri* Isolated from Food of Animal Origin. **Foods**, v. 11, n. 1496, 2022.

RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; LIMA, J. B. A.; LEMOS, K. L.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Proteolytic and lipolytic microbiota of refrigerated raw milk from northeast and southern regions of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, suplemento 2, p. 4289-4296, 2015.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., A. M. OLIVEIRA, F. G. SILVA, R. TAMANINI, A. L. M. OLIVEIRA, AND V. BELOTI. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **J. Dairy Sci.** 101(1):75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>

RIBEIRO JÚNIOR, J. C., OLIVEIRA, A. M. D., SILVA, F. D. G., GARCIA, L. N. H., LOBO, C. M. D. O., ALEXANDRINO, B., AND BELOTI, V. (2019). Influência da qualidade microbiológica do leite cru na vida útil do leite pasteurizado. **Semina Ciências Agrárias**, 40(4), 1469-1476. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1469>

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; SANTOS, I. G. C. DOS; DIAS, B. P.; MENDES, L. P.; BARBON, A. P. A. DA C. Perfil Do Consumidor Brasileiro E Hábitos de Consumo de Leite e Derivados. **Archives of Veterinary Science**. v.25, n.2, p.21-30, 2020

ROLDÃO A. DE F. AND FERREIRA V. DE O. (2019). Tocantins State Climatology – Brazil. **Caderno de Geografia**. v.29, n.59, 2019. DOI 10.5752/p.2318-2962.2019v29n59p1161

SÁ, J. F. O. **Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo minas padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em tempo real**. 112 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/1751/1/jaquelineflavianaoliveiradesa.pdf> >. Acesso 01 de março de 2023.

SANTOS, V. C.; RIBEIRO, D. C. S. Z.; FONSECA, L. M. Ocorrência de não conformidades físico-químicas e microbiológicas em leite e derivados no estado de Minas Gerais, no período de 2011 a 2015. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 71, n. 6, p. 2111-2116, 2019.

SHEN, J.; WANG, H.; ZHU, C.; ZHANG, M.; SHANG, F.; XUE, T. Effect of biofilm on the survival of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in high temperature and drying environment. **Food Research International**, v. 149, 2021.

SMITH, J. R.; CARR, A. J.; GOLDING, M.; GOLDING, M; REID, D. Queijo Mussarela – Uma Revisão do Desenvolvimento Estrutural Durante o Processamento. **Food Biophysics**. vol. 13, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9511-6>

TIRLONI, E.; BERNARDI, C.; ROSSHAUG, P. S.; STELLA, S. Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 4913-4924, 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VARGAS, R. B.; LOPES, J. O.; ELAUTÉRIO, M. P.; SIPPERT, M.; MARTINS, C. M. M.; BERMUDEZ, A. O. L.; PEROTTONI, J.; BERMUDEZ, R. F. Análise físico-químico e diferentes concentrações de álcool no alizarol em leite UHT integral comercializados em Palmeira das Missões. **XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Fortaleza – CE, 2015.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, out/dez, 2005.

VITALE, M.; SCATASSA, M. L.; CARDAMONE, C.; OLIVERI, G.; PIRAINO, C.; ALDUINA, R.; NAPOLI, C. Staphylococcal Food Poisoning Case and Molecular Analysis of Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Food in Sicily, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 21-23, 2015. DOI: 10.1089/fpd.2014.1760.

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Dairy Science

4 CAPÍTULO II - ARTIGO

(Formatado conforme as normas do Journal of Dairy Science)

Impacto das etapas do fluxograma de produção e da *shelf life* na qualidade e segurança microbiológica do queijo muçarela

Resumo

O queijo muçarela é um dos principais derivados lácteos produzidos e consumidos no norte do Brasil, a exemplo de todo o país. Considerando a complexidade do fluxograma industrial com intensa manipulação e as altas temperaturas da região norte do Tocantins, que podem influenciar na manutenção e multiplicação microbiana, o presente trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica e a ocorrência de patógenos em muçarela ao longo das etapas de produção em um laticínio no norte do Tocantins, Brasil, verificando pontos críticos biológicos no ambiente industrial em região de clima tropical. Foram avaliados 5 lotes de muçarela, desde o leite cru até a embalagem primária e *shelf life* de 120 dias a 4°C. Foram quantificados grupos de micro-organismos indicadores e, por abordagens microbiológicas e biomoleculares, identificados *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, patótipos de *E. coli* diarreio gênica e caracterização do potencial toxigênico de estafilococos coagulase positiva (ECP). Foi verificado que o leite cru utilizado para a produção de muçarela apresentava baixa qualidade microbiológica e não atendia ao padrão de qualidade do Brasil. A pasteurização do leite cru foi suficiente para eliminar todos os patógenos identificados no leite cru e reduzir significativamente as contagens de indicadores. A partir da coagulação do leite e dessoragem da massa foi possível verificar expressivo aumento das contagens ($>10^4$ UFC/g) e recontaminação com *Salmonella* spp., EPEC, EAEC e ECP potencialmente produtora de enterotoxina estafilocócica B e toxina do choque tóxico. A filagem da massa fermentada ($<5,4$ pH) a temperatura de 58°C, foi suficiente para reduzir aeróbios mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* em 99,97%, 55,86%, 99,99%, 99,99% e 98,92%, respectivamente, assim como a salmoura das peças por imersão foi capaz de reduzir as quantificações desses grupos em 55,21%, 85,71%, 99,95%, 99,95% e 71,42%. Apesar de no produto recém acabado ter sido identificada *Salmonella* spp. e ausência de *L. monocytogenes*, após o período de *shelf life* houve presença de *L. monocytogenes* e ausência

de *Salmonella* spp., potencialmente influenciado pela recuperação desses micro-organismos durante o fluxograma de produção, armazenamento sob refrigeração e ação antagonista dos fermentos lácticos especificamente aos Gram negativos. Considerando as condições ambientais que podem favorecer a multiplicação e manutenção de patógenos e deteriorantes em laticínios na região tropical do Brasil, faz-se necessário revisão dos procedimentos de higiene operacional principalmente nas cubas de coagulação do leite e mesas de fermentação para a produção de muçarela de melhor qualidade e menor risco ao consumo.

Palavras-chave: Fermentação, Filagem, *Escherichia coli* diarreiogênica, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

De acordo com a FAO (2022), o Brasil é, atualmente, o quarto maior produtor mundial de leite de vaca, com aproximadamente 36 milhões de toneladas. Apesar de o número de produtores e de rebanhos de vacas leiteiras ter decrescido, a produção nacional de leite cresceu em 47% entre 2006 e 2017. Este crescimento está relacionado à tecnificação das propriedades que acarretaram o aumento da produtividade leiteira e, consequentemente, no incremento da produção de derivados lácteos (EMBRAPA, 2020).

Os queijos são os mais consumidos, com ênfase para o muçarela, um dos tipos mais produzidos no Brasil (FAO, 2021). Por definição, entende-se por queijo muçarela aquele que se obtém por filagem de uma massa acidificada (obtida por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (Brasil, 1997).

Para a produção de queijo muçarela é obrigatória a pasteurização rápida do leite cru para a eliminação dos riscos de contaminações microbiológicas (Brasil, 1997; 2017), no entanto, várias etapas durante o processamento nas indústrias podem comprometer a sua qualidade e inocuidade e predispor à recontaminação pós-pasteurização (Lembi et al., 2020; Perry, 2004).

A tecnologia dos queijos muçarela compreende a pasteurização do leite cru, coagulação biológica e enzimática, fermentação da massa até atingir o pH de <5,4, filagem, enformagem, salmoura e embalagem primária (Marinheiro et al., 2015). Todas essas etapas podem predispor à recontaminação pós-pasteurização caso sejam verificados desvios ou inconformidades com os limites críticos dos programas de autocontrole dos laticínios (Perry, 2004).

De acordo com a classificação de Köppen-Geiger, o clima predominante na região norte do estado do Tocantins é do tipo AW' (tropical quente e úmido), com média anual de temperatura do ar de 24,9°C, variando entre 23,9°C (janeiro) a 27,7°C (setembro) e clima úmido (Roldão e Ferreira, 2019), que podem predispor a contaminações de multiplicação rápida, manutenção de patógenos e deteriorantes no ambiente industrial, maior disseminação dos micro-organismos e alterações no comportamento dos fermentos lácticos, como a redução do tempo para o caimento do pH (Fox e Guinee, 2013).

Grande parte dos estudos microbiológicos sobre queijos são focados em produtos prontos para o consumo, ao final do processo de produção ou mesmo já expostos à venda (Allaion et al., 2021). Considerando a complexidade de etapas no processo produtivo há, portanto, a necessidade de maiores elucidações sobre os potenciais pontos de contaminação dentro do fluxo industrial ou onde falhas tecnológicas podem comprometer a qualidade e/ou a segurança para o consumo (Fusco, Chieffi e Angelis, 2022), além de estudos em regiões de clima tropical que podem influenciar na microbiota contaminante e autóctone dos queijos (Ribeiro Junior et al., 2019).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade e segurança microbiológica do queijo muçarela em diferentes etapas do processo de fabricação em um laticínio do norte do Brasil, no estado do Tocantins, de modo a identificar os possíveis pontos críticos de incorporação de contaminantes ambientais nas linhas de processamento e posteriormente fundamentar a revisão dos programas de autocontrole para laticínios em regiões de clima tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de agosto a dezembro de 2022 em uma unidade de beneficiamento de produtos lácteos localizada no perímetro periurbano no município de Augustinópolis, região norte de estado do Tocantins, Brasil. A indústria está registrada no Serviço de Inspeção Federal (SIF) vinculado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) com capacidade instalada de recepção de 120.00 litros/dia e produz queijo muçarela, queijo prato, queijo de coalho, manteiga de primeira qualidade, creme de leite de uso industrial e creme de leite de uso industrial.

Foram coletadas sete amostras em cinco repetições (lote 1 a 5) em dias distintos em diferentes pontos da linha de produção: leite cru refrigerado, leite pasteurizado, massa de queijo em início de fermentação, massa de queijo fermentada, massa filada, queijo embalado

(2 amostras). Para manter a correspondência entre as amostras de cada lote, a repetição foi acompanhada durante todo o processo de produção, totalizando 52 horas.

As coletas foram realizadas de forma asséptica e em frascos estéreis. As amostras finais de queijo muçarela pronto para o consumo foram coletadas na embalagem primária do laticínio, seguindo-se o fluxograma normal de produção. Todas as amostras foram encaminhadas sob refrigeração (4 a 7°C) ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Norte do Tocantins, onde foram imediatamente avaliadas.

Uma amostra de queijo de cada lote foi mantida em sua embalagem original e mantida em refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$) por 120 dias para avaliação da *shelf life*, seguindo as especificações indicadas no rotulo do fabricante.

Alíquotas representativas de 25 mL/g de cada amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada (Acumedia, Baltimore, Estados Unidos) e outra alíquota de mesmo volume/peso com caldo Half-Fraser (Acumedia) para pré-enriquecimento de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Os demais procedimentos para a pesquisa desses dois patógenos foram realizados conforme os métodos do *International Organization for Standardization* (ISO) ISO 6579:2002/Amd 1:2007 e 11290-1:1996/Amd 1:2004, respectivamente, ambos modificados com a inclusão de confirmação de gênero e/ou espécie dos isolados sugestivos em placas nas PCRs referenciadas na Tabela 1.

A partir da diluição 10^{-1} descrita anteriormente, foram realizadas diluições decimais e seriadas em solução salina peptonada e inoculadas em placas para quantificação de aeróbios mesófilos por semeadura em profundidade (Morton, 2001), psicrotróficos em superfície (FRANK; YOUSEF, 2004), coliformes a 30°C e *E. coli* em *Compact Dry*® EC e enterobactérias no *Compact Dry*® ETB (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão), conforme as recomendações do fabricante. Os estafilococos totais foram quantificados pelo método recomendado pela ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003. Entre os totais, foram diferenciados os estafilococos coagulase positiva (ECP) pela prova da coagulase realizada conforme Silva et al. (2005).

Os isolados de *E. coli* foram recuperados em caldo BHI (HiMedia, Mumbai, India) e submetidos à extração de DNA conforme Ribeiro Júnior et al. (2016). Foram pesquisados os fatores de virulência codificados pelos genes *eaeA*, *CVD432*, *LT*, *ST*, *stx1*, *stx2* e *ipaH* (Aranda et al., 2004), apresentados na Tabela 1, para confirmação de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), produtora de toxina shiga (STEC) e enteroinvasiva (EIEC). A caracterização de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi

realizada pela positividade simultânea aos genes que codificam STEC e EPEC (Paton e Paton, 1998).

Para realização de todas as PCR, os produtos da extração de DNA foram aplicados ($\approx$ 50ng) em reações de PCRs com volume final de 25 μ L, com constituição previamente descrita no protocolo utilizado por Ribeiro Júnior et al. (2016). As condições de amplificação de cada ensaio foram realizadas integralmente conforme os protocolos citados na Tabela 1.

As análises estatísticas foram realizadas considerando o delineamento em blocos casualizados. Por não seguirem as premissas de normalidade e homoscedasticidade, os dados foram submetidos à análise de variância para dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis (Kruskal e Wallis, 1952) e a diferença entre as médias foi analisada pelo teste de Nemenyi a 5% de probabilidade no software SAS (Nemenyi, 1963).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios das contagens de micro-organismos indicadores da qualidade nos diferentes lotes em cada uma das etapas de fabricação estão apresentados na Tabela 2. Foi possível observar que o leite cru refrigerado avaliado pelo presente trabalho, coletado no silo de armazenamento a granel do laticínio, apresentava baixa qualidade microbiológica, com contagens totais superiores a 10^8 UFC/mL. A legislação brasileira estabelece o limite de 9×10^5 UFC/mL para o leite cru refrigerado de conjunto, em *pool* de armazenamento (Brasil, 2018b). Dessa forma, todos os cinco lotes de leite cru refrigerado avaliados pelo presente trabalho estavam em desconformidade com o padrão legal.

Sabe-se que a qualidade microbiológica do leite cru tem influência direta na *shelf life* e potencial tecnológico do leite pasteurizado (Ribeiro Júnior et al., 2019), principalmente em decorrência do potencial da microbiota contaminante em alterar o metabolismo sacarolítico mesófilo para proteolítico e/ou lipolítico em condição psicrotrófica (Samaržija et al., 2012; Ribeiro Júnior et al., 2018; Yuan et al., 2019). A quantidade de psicrotróficos deteriorantes do leite está diretamente relacionada com a ocorrência de problemas tecnológico no leite fluido (Yuan et al., 2019) e derivados (Barbano et al., 2006; Ho et al., 2016).

No presente trabalho, apesar da pasteurização do leite cru ter reduzido as contagens de psicrotróficos significativamente ($p < 0,05$), em valores próximos a 10^7 UFC/mL, é esperado que problemas tecnológicos decorrentes da proteólise e lipólise, como a ocorrência de sabor amargo e rancificação hidrolítica, respectivamente, venham a comprometer a qualidade do queijo muçarela uma vez que são enzimas microbianas termorresistentes (Gasparini et al., 2020; Santana et al., 2020).

Foi observado também que enterobactérias representavam 11,35% da contaminação total do leite cru (Tabela 2), indicando que outras fontes não ambientais poderiam ter entrado em contato com o leite. Sabe-se que o leite cru pode ser contaminado por água residual de lavagem de utensílios de ordenha, superfície do teto, três primeiros jatos de leite, superfícies de tanques de resfriamento e caminhões de transporte mal higienizados, entre outras, como já levantado no Brasil em condições de produção semelhantes à região norte do Tocantins (Silva et al., 2011).

O efeito significativo da pasteurização do leite cru também foi observado com relação aos contaminantes Gram-negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. As elevadas contagens desses micro-organismos e os seus subgrupos (coliformes totais e *E. coli*) no leite cru foram reduzidos a contagens praticamente indetectáveis no leite pasteurizado. No Brasil, é previsto que o leite pasteurizado deve apresentar contagens indetectáveis imediatamente na saída do pasteurizador (Brasil, 2018a). As baixas contagens de enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* observadas no leite pasteurizado podem estar relacionadas a contaminação ambiental no momento da amostragem, uma vez que a pasteurização como ponto crítico de controle (PPC) biológico é monitorada constantemente pelos instrumentos (termorregulador, válvula de derivação e termorregistrador) e pelo perfil enzimático (fosfatase alcalina e peroxidase), sem nenhum desvio ao limite crítico registrado durante a realização das coletas.

A pasteurização também foi capaz de reduzir em 99,45% a média das contagens totais de micro-organismos ($2,78 \times 10^8$ para $1,52 \times 10^6$ UFC/mL), indicando que termodúricos representavam apenas 0,55% da microbiota do leite cru avaliado (Tabela 2). Apesar do baixo percentual da microbiota resistente à pasteurização, os valores expressivos da contaminação do leite cru levaram a média de $1,52 (\pm 2,05) \times 10^6$ UFC/mL de aeróbios mesófilos no leite pasteurizado, valores superiores à $8,0 \times 10^4$ UFC/mL já previsto no Brasil para leite pasteurizado (Brasil, 2011).

Ao acondicionar os lotes de leite pasteurizado nas cubas de coagulação e adicionar o fermento láctico e coalho enzimático, no entanto, foram observadas elevadas contagens de micro-organismos, sobretudo os indicadores de contaminação ambiental (enterobactérias e coliformes totais) e de contaminação fecal (*E. coli*), conforme pode ser observado na Tabela 2. As médias de enterobactérias elevaram-se de 4,20 no leite pasteurizado para $1,16 \times 10^7$ UFC/mL na massa pré-fermentação, assim como coliformes totais e *E. coli* elevaram-se na ordem de 10^3 UFC/mL. Como a massa láctea ainda não tinha sido fermentada e por enterobactérias representarem 41,4% das contagens microbiológicas totais (Tabela 2), fontes de contaminação ambiental e fecal precisam ser detectadas e controladas nessa etapa para

minimizar a possível presença de enteropatógenos, principalmente pelo fato da contaminação ser no ambiente industrial e o PCC biológico (pasteurização) já ter sido ultrapassado no fluxograma de produção.

A fermentação da massa láctea com os cultivos microbiológicos de bactérias ácido lácticas, nas amostras do presente trabalho compostas de cultura termofílica liofilizada de cepas mistas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* (Elían Comércio de Insumos Para Alimentos LTDA - ME, Vila Velha, ES, Brasil) é fundamental para que ocorra o caimento do pH para níveis inferiores a 5,4. Apesar de sabidamente esses cultivos iniciadores serem produtores de bacteriocinas, peróxidos e ácidos, que podem limitar a multiplicação de outros micro-organismos (Ortolani et al., 2010; Panebianco et al., 2021), no presente trabalho foi observado que apesar da quantificação total de bactérias ter aumentado de $2,8 \times 10^7$ para $7,83 \times 10^{11}$ UFC/g (Tabela 2), também foi observado o aumento de indicadores de contaminação ambiental, principalmente os coliformes totais que aumentaram de $4,53 \times 10^3$ na massa pré-fermentação para 4×10^8 UFC/g após o processo de caimento do pH. Isso reforça o observado em relação a contaminação ambiental incorporada após a pasteurização e anteriormente à fermentação.

A etapa da filagem, por sua vez, atuou significativamente para a redução das contagens microbiológicas de todos os grupos de micro-organismos indicadores quantificados pelo presente estudo. As reduções foram de 99,97%, 55,86%, 99,99%, 99,99% e 98,92% para aeróbios mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Como etapa mecanicamente executada com aquecimento da massa a $\approx 58-60^\circ\text{C}$ por contato direto com água a $\approx 70-80^\circ\text{C}$ (Fox e Guinee, 2013), foi observado efeito significativo desse aquecimento para a melhoria da qualidade microbiológica do produto. A filagem atuou, portanto, como ponto de controle de contaminantes após a pasteurização do leite, coagulação e fermentação da massa. Apesar de não ser uma etapa com potencial de conferir a segurança microbiológica como é a pasteurização (Nobili et al., 2016), essa etapa apresentou-se como uma importante ferramenta para colaborar na qualidade do produto final.

Assim como na filagem, a salmoura das peças de muçarela por imersão por 20 horas à 8°C em concentração de cloreto de sódio de 20% (m/v), também demonstrou efeito na redução da contaminação para todos os grupos de indicadores pesquisados, sendo as reduções percentuais de 55,21, 85,71, 99,95, 99,95, 71,42, 99,26% para aeróbios mesófilos, psicrotróficos, enterobactérias, coliformes totais, *E. coli* e ECP respectivamente.

Sabidamente, os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* apresentam pouca tolerância a altas concentrações de sal (Spano et al., 2003). Como aditivo ao sal, algumas indústrias utilizam natamicina na salmoura, conforme é permitido pela legislação brasileira (Brasil, 1997). Não era o caso da indústria onde o presente trabalho foi conduzido. Dessa forma, a redução dos indicadores avaliados pelo presente trabalho na salmoura representa somente o efeito da concentração de sal.

Após o período de 120 dias de *shelf life* foi observado aumento das contagens de micro-organismos, esperado pelo armazenamento do produto. Apesar disso, esse aumento não foi significativo em relação ao produto imediatamente após a produção ($p > 0,05$). Como o armazenamento foi realizado de 4 a 7°C, conforme as recomendações do fabricante (até 10°C), era esperado predomínio de psicrófilos, o que não foi observado, provavelmente relacionado à cultura starter ser predominantemente mesófila.

Tanto o produto recém fabricado quanto os mesmos lotes de queijo após o período de *shelf life* apresentam conformidade com os padrões microbiológicos de qualidade para o comércio e para a indústria, previstos na Portaria nº 161 de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2022) e na Portaria nº 364 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 1997).

A legislação que regulamenta a qualidade dos alimentos no comércio, da ANVISA (Brasil, 2022), determina que queijos devem apresentar, no máximo, contagem de ECP e *E. coli* em 10^3 UFC/g, além de outros grupos de micro-organismos não avaliados pelo presente estudo. A legislação do MAPA, em concordância, também determina o máximo de ECP em 10^3 UFC/g e coliformes totais de 5×10^3 UFC/g. Conforme pode ser observado na Tabela 2, as amostras apresentaram-se em conformidade com os padrões quantitativos de micro-organismos indicadores determinados no Brasil.

Ambas as legislações também determinam, qualitativamente, que o queijo muçarela deve apresentar ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Brasil, 1997; 2022). No entanto, conforme pode ser observado na Tabela 3, foi possível confirmar *Salmonella* spp. no ensaio biomolecular gênero-específico em 37,88% dos 66 isolados sugestivos recuperados do produto após a salmoura e imediatamente após a embalagem primária. Os 25 isolados sugestivos confirmados como *Salmonella* spp. nas peças de muçarela após a salmoura foram recuperados de dois dos cinco lotes de queijo avaliados. O isolamento desse patógeno em queijo muçarela também já foi relatado por outros trabalhos (Serrainon et al., 2012; Cunha Neto et al., 2020).

No entanto, nenhum isolado positivo para *Salmonella* spp. foi recuperado do produto após a *shelf life*. Dessa forma, é possível que a atividade antagonista do fermento láctico utilizado na produção tenha tido efeito positivo para tornar esse patógeno indetectável no produto final (Campagnollo et al., 2022).

Em concordância com o observado nas contagens de indicadores microbiológicos, foi possível identificar enteropatógenos como *E. coli* e *Salmonella* spp. durante o fluxograma de produção dos lotes a partir da coagulação do leite após a pasteurização.

O efeito da pasteurização para a eliminação desses patógenos presentes no leite cru também foi observado. No entanto, a contaminação ambiental e de origem fecal após a pasteurização demonstrou-se também como um fator determinante para a inclusão de *E. coli* diarreiogênica, sendo detectadas estirpes enteropatogênicas (EPEC) e enteroagregativa (EAEC). Isolados de *E. coli* patogênica também foram identificados no leite cru, mas não foram recuperados no leite pasteurizado (Tabela 3). Deficiências de higiene operacional, ambiental e dos manipuladores após a pasteurização podem, portanto, comprometer tanto a qualidade quanto a segurança após o processo de pasteurização (Pal et al., 2016).

Após a filagem, por sua vez, nenhuma cepa de *E. coli*, comensal ou patogênica, foi identificada nas peças de muçarela. No entanto, tanto *Salmonella* spp. quanto *L. monocytogenes* foram detectadas após essa etapa, reforçando que a filagem não tem efetividade para proporcionar segurança microbiológica apesar de ter apresentado efeito percentual expressivo nas quantificações microbiológicas. Apesar da não recuperação de *E. coli* nas amostras após a filagem, o estudo de Nobili et al. (2016) verificou que a STEC quando presente no leite cru, que não foi pasteurizado, pode permanecer viável após todo o processo de produção de muçarela, inclusive quando a água da filagem é realizada em temperatura ainda superior ($\approx 95^{\circ}\text{C}$) a utilizada no local de realização desse estudo ($\approx 80^{\circ}\text{C}$).

L. monocytogenes foi detectada somente após a etapa de fermentação da massa. Essa fermentação inicia por 4 horas com a massa imersa em soro, para conservação da temperatura acelerando a multiplicação das bactérias ácido lácticas, e posteriormente transfere-se para mesas de fermentação por 1 hora em temperatura ambiente, que na região e época das coletas chegou 38°C . O procedimento é realizado sobre mesas de aço inoxidável lavadas após cada uso. Sabe-se, no entanto, que *L. monocytogenes* e outros patógenos podem apresentar capacidade de formação de biofilmes, resistindo a procedimentos de higiene operacional de superfícies de equipamentos e instalações de laticínios e outras fábricas de alimentos (Almeida et al., 2013; Gérard et al., 2018; Di Ciccio et al., 2022). Potencialmente a cuba onde a massa fica imersa em soro, bem como as mesas de fermentação podem ter sido os pontos de

contaminação da massa por esse patógeno que, inclusive, permaneceu detectável após a etapa de filagem, assim como *Salmonella* spp.

Após a salmoura, no entanto, nenhum isolado de *L. monocytogenes* ou *E. coli* diarreio gênica foi recuperado, no entanto, ainda foi possível isolar *Salmonella* spp. após a salmoura e isolados não diarreio gênicos de *E. coli*, indicando condições de manutenção da viabilidade de enteropatógenos.

Essa viabilidade, inclusive, foi verificada na recuperação de *L. monocytogenes* em uma das cinco peças de muçarela após 120 dias de armazenamento sob refrigeração. Após a salmoura, as peças eram acondicionadas em câmaras frias para a secagem e posterior embalagem primária. Dessa forma, é possível que as amostras tenham sido contaminadas por *L. monocytogenes* nas estantes de secagem. Pelo fato desse micro-organismo ter a capacidade psicrotrófica, é possível que ocorreu multiplicação do patógeno no produto após o período de armazenamento tornando possível a detecção do patógeno após 120 dias a 4°C.

Após esse período de *shelf life*, no entanto, nenhum isolado de *Salmonella* spp. ou *E. coli* (comensal ou diarreio gênica) foi identificada no produto, podendo ter ocorrido uma ação antagonista específica para Gram-negativos por parte dos fermentos lácticos através da síntese de peptídeos antimicrobianos e seus subprodutos bioquímicos (Volzing et al., 2013), ação a qual não foi observada para *L. monocytogenes*. A ocorrência desse patógeno em queijos foi recentemente descrita como a causa de um surto de doença transmitida por alimentos em diversos estados dos Estados Unidos (Palacios et al., 2022).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da caracterização biomolecular do potencial enterotoxigênico dos ECP. Foi possível verificar que no leite cru avaliado pelo presente trabalho diversos isolados apresentaram o potencial de sintetizar enterotoxinas estafilocócicas (B, C e D), toxina esfoliativa B e toxina do choque tóxico, além da resistência a metilicina (potencialmente um *Staphylococcus aureus* - MRSA).

Apesar do potencial toxigênico ter sido identificado, não é possível afirmar que os queijos e/ou leite cru apresentavam risco ao consumo, uma vez que o potencial genético para a produção de toxinas não determina, por si, a presença desses metabólitos (Babić et al., 2019; Dai et al., 2019). Tanto que, a legislação brasileira mais recente determina a pesquisa e quantificação das toxinas estafilocócicas em substituição às contagens de ECP (Brasil, 2022). Ainda, a ocorrência de surtos de intoxicações por metabólitos de ECP também é frequente (Le et al., 2021).

Apesar dessa limitação analítica para se determinar o risco ao consumo dos queijos muçarela, no presente trabalho foi possível verificar que a pasteurização eliminou todos os

isolados de ECP toxigênicos do leite cru. No entanto, assim como enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*, a recontaminação do produto por ECP já foi observada desde a coagulação da massa anteriormente à fermentação, inclusive com isolados potencialmente produtores de enterotoxina estafilocócica B (*seB*) e do choque tóxico (*tst*). Foi verificado também que esses ECP toxigênicos permaneceram viáveis após a etapa de fermentação, então reduzidos a níveis indetectáveis no queijo após a filagem, havendo posterior detecção no produto final com isolados potencialmente produtores de toxina esfoliativa (*eta*) e de toxina-1 da síndrome do choque tóxico (*tst*). Após a salmoura foi novamente identificada a presença de um isolado de ECP toxigênico, potencialmente produtor de toxina esfoliativa A e simultaneamente a toxina do choque tóxico (Tabela 4), isolado já não identificado nas peças de muçarela após a *shelf life*.

Dessa forma, como micro-organismos indicadores da qualidade higiênico sanitária da manipulação (Bencardino et al., 2021) os ECP tanto nas contagens (Tabela 2) quanto no potencial toxigênico (Tabela 4) apresentaram etapas críticas para a recontaminação durante o fluxograma de produção, como na coagulação/separação do soro e na salmoura por imersão.

CONCLUSÃO

A pasteurização foi suficiente para eliminar todos perigos microbiológicos do leite cru para a produção de queijos, mesmo com leite cru de alta contaminação. A filagem da massa acidificada também pode atuar significativamente para a redução de micro-organismos no fluxograma de produção da muçarela, mas, por si só, não é capaz de tornar o produto seguro para consumo. Outras etapas do processo tecnológico de produção, como a coagulação/dessoragem e a salmoura por imersão, podem apresentar potencial de recontaminar o queijo muçarela por contaminantes ambientais, da manipulação, por enteropatógenos e psicrotóxicos patogênicos.

É fundamental que laticínios que atuam na região de clima tropical do Brasil atuem de forma incisiva na promoção da melhoria da qualidade do leite cru refrigerado dos seus produtores e revisem seus planos de autocontrole no ambiente industrial, principalmente os procedimentos de higiene operacional das instalações e equipamentos para aumento da qualidade dos queijos e para minimizar o risco da ocorrência de perigos microbiológicos para a saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- Allaion J. R., Barrionuevo K. G. and Franco B. D. G. de M. (2021). Assessing the Microbiological Safety Parameters of Minas Artisanal Cheese Samples in Retail Environments in São Paulo, Brazil. *Appl. Sci.* (11). <https://doi.org/10.3390/app11199331>
- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., and Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.006>
- Aranda, K. R. S., Fagundes-Neto U., and Scaletsky I. C. A. (2004). Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *American Society for Microbiology*, 42(12), 5849-5853. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5849–5853.2004
- Babić, M., Pajić, M., Radinović, M., Boboš, S., Bulajić, S., Nikolić, A., and Velebit, B. (2019). Effects of temperature abuse on the growth and staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression of *Staphylococcus aureus* in milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(4), 282-289. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1089/fpd.2018.2544>
- Barbano, D. M., Ma, Y., and Santos, M. V. D. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Sci.* 89, E15-E19. [https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72360-8](https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.3168/jds.S0022-0302(06)72360-8)

Bencardino, D., Amagliani, G., and Brandi, G. (2021). Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: An ongoing challenge in public health. *Food control*, 130, 108362.

<https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodcont.2021.108362>

Brasil. 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). Diário Oficial da União.

Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União.

Brasil. 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União.

Brasil. 2018a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, na forma desta Instrução Normativa Diário Oficial da União.

Brasil. 2018b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial Diário Oficial da União.

Brasil. 2022. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 724, de 01 de julho de 2022. dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Diário Oficial da União.

Campagnollo, F.B., Pedrosa, G.T.S., Kamimura, B.A., Furtado, M.M., Baptista R.C., Nascimento, H.M., Alvarenga, V.O., Magnani M., Sant'Ana A.S.. (2022) Growth potential of three strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in Frescal and semi-hard artisanal Minas microcheeses: Impact of the addition of lactic acid bacteria with antimicrobial activity. LWT, 158. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113169>.

Cunha-Neto, A. da, Carvalho, L. A., Castro, V. S., Barcelos, F. G., Carvalho, R. C. T., Rodrigues, D. D. P., and Figueiredo, E. E. D. S. (2020). *Salmonella* Anatum, *S. Infantis* and *S. Schwarzengrund* in Brazilian Cheeses: occurrence and antibiotic resistance profiles. International Journal of Dairy Technology, 73(1), 296-300. [https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1471-0307.12636](https://doi.org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1471-0307.12636)

Dai, J., Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., and Wu, H. (2019). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China. Frontiers in microbiology, 10, 641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00641>

Di Ciccio, P., Rubiola, S., Panebianco, F., Lomonaco, S., Allard, M., Bianchi, D. M., and Chiesa, F. (2022). Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 378, 109784. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109784>

EMBRAPA. (2020). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Anuário Leite: 2020. Disponível em: <ANUÁRIO leite 2020: leite de vacas felizes. - Portal Embrapa>. Acesso em: 23 de maio de 2021.

FAO. (2021). Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QP>. Acessado em 20 de maio de 202.

FAO (2022) FAOSTAT, Crops and Livestok products. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acessado em 10/04/2023.

Fox, P. F., and Guinee, T. P. (2013). Cheese Science and Technology. Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. Chapter 17, p. 357-389.

Frank, J.F., and Yousef, A.E. (2004). Test for groups of microorganisms. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.K (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, Section 8.090 an 8.100, p. 239-242.

- Fusco, V., Chieffi, D., and de Angelis, M (2022). Resenha convidada: Queijos frescos de massa filada: composição, papel e evolução da microbiota em sua qualidade e segurança. J. Dairy Sci. Vol. 105 N° 12. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22254>
- Gasparini, G. B., Amorim, F. R., de Souza Correa, S., Bruzaroski, S. R., Fagnani, R., de Souza, C. H., and de Santana, E. H. (2020). Psychrotrophs in raw milk: effect on texture, proteolysis index, and sensory evaluation of smoked provolone cheese. Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(8), 3291-3296. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10329>
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., and Sindic, M. (2018). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. International Journal of Dairy Technology, 71(4), 825-843. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1471-0307.12552>
- Ho, T. M., Howes, T., and Bhandari, B. R. (2016). Methods to extend the shelf-life of cottage cheese—a review. International Journal of Dairy Technology, 69(3), 313-327. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1471-0307.12552>
- ISO 6888-1. (2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species) – Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium, International Organization for Standardization, 1999, Amendment 1:2003.

ISO 11290-1. (2004). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* e Part 1: Detection Method. International Organization for Standardization, 1996, Amendment 1:2004.

ISO 6579. (2007). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for Detection of *Salmonella* spp. 4th ed., International Organization for Standardization, 2002, Amendment 1:2007.

KRUSKAL, W. H., WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Am. Stat. Assoc., v.47, n.260, p.583-621, 1952.

Le, H. H. T., Dalsgaard, A., Andersen, P. S., Nguyen, H. M., Ta, Y. T., and Nguyen, T. T. (2021). Large-scale *Staphylococcus aureus* foodborne disease poisoning outbreak among primary school children. Microbiology Research, 12(1), 43-52.
<https://doi.org/10.3390/microbiolres12010005>

Lembi M. K. dos S., Liutti J. T., Sabec G. Z. and Kawamoto K. T. V. dos S. (2020). Microbiological analysis of industrialized mozzarella cheese and conduits to obtain quality in its processing. Braz. J. Hea. Rev., Curitiba, v. 3, n. 3, p.4951-4964. DOI:10.34119/bjhrv3n3-078.

Marinheiro M. F., Ghizzi L. G., Cereser N. D., de Lima H. G.; Timm C. D. (2015). Microbiological quality of sliced and block mozzarella cheese. Semina: Ciências Agrárias. v. 36, n. 3, p. 1329-1334. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1329

Morton, R.D. Aerobic plate count. In: Downes, F.P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 7, p. 63-67.

Nemenyi, P. Distribution-free multiple comparisons. In: PhD thesis, Princeton University. [S.l.:s.n.], 1963.

Nobili G., Franconieri I., Basanisi M., G. La Bella, Tozzoli G. R., Caprioli A., and La Salandra G. Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *J. Dairy Sci.*, 99(10), 7877-7880. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11613>

Ortolani, M. B. T., Moraes, P. M., Perin, L. M., Viçosa, G. N., Carvalho, K. G. D., Júnior, A. S., and Nero, L. A. (2010). Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 93(7), 2880-2886. [https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.3168/jds.2009-3000](https://doi.org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.3168/jds.2009-3000)

Pal, M., Mulu, S., Tekle, M., Pintoo, S. V., and Prajapati, J. (2016). Bacterial contamination of dairy products. *Beverage and food world*, 43(9), 40-43. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.3168/jds.2015-9886>

Palacios, A., Otto, M., Flaherty, E., Boyle, M. M., Malec, L., Holloman, K., and Conrad, A. (2022). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to fresh, soft

hispanic-style cheese—United States, 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 71(21), 709. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7139a6>

Panebianco, F., Giarratana, F., Caridi, A., Sidari, R., De Bruno, A., and Giuffrida, A. (2021).

Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: Activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese. *LWT*, 137, 110446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110446>

Paton, A. W. and Paton, J. C. (1998). Detecção e caracterização de *Escherichia coli* toxigênica

Shiga usando ensaios de PCR multiplex para *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *E. coli* enterohemorrágica *hlyA*, *rfbO111* e *rfbO157*. *Jornal de Microbiologia Clínica*. Vol. 36, nº 2 p. 598–602.

Perry K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quím. Nova*, 27:293-300.

Ribeiro Júnior, J.C., Tamanini, R., Soares, B.F., Oliveira, A.M., Silva, F.G., Silva, F.F., Augusto, N.A., and Beloti, V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina Ciências Agrárias*, v. 7, p. 3069–3078.

Ribeiro Júnior, J. C., A. M. Oliveira, F. G. Silva, R. Tamanini, A. L. M. Oliveira, and V. Beloti. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J. Dairy Sci.* 101(1):75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>

- Ribeiro Júnior, J. C., Oliveira, A. M. D., Silva, F. D. G., Garcia, L. N. H., Lobo, C. M. D. O., Alexandrino, B., and Beloti, V. (2019). Influência da qualidade microbiológica do leite cru na vida útil do leite pasteurizado. *Semina Ciências Agrárias*, 40(4), 1469-1476. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1469>
- Roldão A. de F. and Ferreira V. de O. (2019). Tocantins State Climatology – Brazil. *Caderno de Geografia*. v.29, n.59, 2019. DOI: 10.5752/p.2318-2962.2019v29n59p1161.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š., and Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 62(2), 77-95.
- Santana, E. H. W. de, Luiz, L. L., da Silva Pasquim, P., Pinto, L. D. F. B., Pereira, F. D. A. B., Gasparini, G. B. F. B., and Eleodoro, J. I. (2020). Psychrotrophic microorganisms in raw milk and the cheese quality. *Research, Society and Development*, 9(9), e127997217-e127997217. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7217>
- Serraino, A., Finazzi, G., Marchetti, G., Daminelli, P., Riu, R., Giacometti, F., and Rosmini, R. (2012). Behaviour of Salmonella Typhimurium during production and storage of artisan water buffalo mozzarella cheese. *Italian Journal of Animal Science*, 11(3), e53. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.4081/ijas.2012.e53>
- Silva, L. H. C.; Monteiro, A. A.; Beloti, V.; Barros, M. D. A. F.; Nero, L. A.; De Santana, E. H. W.; Moraes, L. B. (2005). Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em *Estafilococos* isolados de leite cru. *Semina: Ciências Agrárias*, 26(3), 381-385,

Silva, L. C. C. da, Beloti, V., Tamanini, R., d'Ovidio, L., de Mattos, M. R., de Arruda, A. M. C. T., and Pires, E. M. F. (2011). Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(1), 267-275.
<https://doi.org/10.3390/ani12212902>

Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino, D., Dupuy A., and Massa S. (2003). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 73-76.

Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N. I., and He, G. (2019). Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *J. Food Prot.*, 82(7), 1148-1159. G.
<https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>

Volzing K., Borrero J., Sadowsky M. J., and Kaznessis Y. N. (2013). Antimicrobial Peptides Targeting Gram-negative Pathogens, Produced and Delivered by Lactic Acid Bacteria. *ACS Synth. Biol.* (2), 643-650. <https://doi.org/10.1021/sb4000367>

Tabela 1. Primers e referencias utilizadas para identificação e caracterização molecular isolados sugestivos de patógenos isolados de queijos muçarela em diferentes etapas de fabricação.

Micro-organismo	Gene	Primers (5'-3')	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCG	Shanmugasamy et al. (2011)
		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	<i>mecA</i>	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	Mehrotra et al. (2000)
		CTGGTGAAGTTGTAAT	
	<i>tst</i>	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	
		TTTTCAGTATTTGTAACGCC	
	<i>eta</i>	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	
		AGATGTCCCTATTTTTGCTG	
	<i>etb</i>	ACAAGCAAAAGAATACAGCG	
		GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	
	<i>sea</i>	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	
		TTTTCAGTATTTGTAACGCC	
	<i>seb</i>	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	
		AGATGTCCCTATTTTTGCTG	
	<i>sec</i>	ACAAGCAAAAGAATACAGCG	
		GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	
<i>Escherichia coli</i>	<i>eaeA</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	Paton e Paton (1998)
		CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
	<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC	
		AGAACGCCCCTGAGATCATC	
	<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Aranda et al. (2004)
		TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
	<i>CVD</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	
		CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	
	<i>LT</i>	GGCGACAGATTATAACCGTGC	
		CGGTCTCTATATCCCTGTT	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>ST</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	Liu et al. (2004)
		CACCCGGTACARGCAGGATT	
	<i>ipaH</i>	GTTCCCTGACCGCCTTTCCGATA	
		GCCGGTCAGCCACCCTCTGA	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>lmo0733</i>	CGCAAGAAGAAATTGCCATC	Liu et al. (2004)
		TCCGCGTTAGAAAAATTCCA	

Tabela 2. Contagens médias de micro-organismos indicadores da qualidade de cinco lotes de queijos muçarela produzidos no norte do Tocantins no período de setembro a novembro de 2021 ao longo de cada etapa do processamento industrial e após 120 dias de *shelf life*

Amostra	Aeróbios mesófilos (UFC/g/mL)	Psicrotróficos (UFC/g/mL)	Enterobactérias (UFC/g/mL)	Coliformes a 30°C (UFC/g/mL)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g/mL)	<i>Staphylococcus</i> totais (UFC/g/mL)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g/mL)
Leite cru	$2,78 \times 10^{8ns}$	$1,19 \times 10^{7a}$	$3,16 \times 10^{7ns}$	$3,46 \times 10^{7ns}$	$2,08 \times 10^{6ns}$	$1,19 \times 10^{7a}$	$3,26 \times 10^{6a}$
Leite pasteurizado	$1,52 \times 10^{6ns}$	5 ^b	4,2 ^{ns}	5 ^{ns}	1 ^{ns}	$2,29 \times 10^{3b}$	< 10 ^b
Massa pré-fermentação	$2,80 \times 10^{7ns}$	5×10^{2b}	$1,16 \times 10^{7ns}$	$5,11 \times 10^{3ns}$	$8,74 \times 10^{3ns}$	$6,79 \times 10^{4b}$	$2,03 \times 10^{4b}$
Massa fermentada	$7,83 \times 10^{11ns}$	$1,11 \times 10^{3b}$	$2,02 \times 10^{8ns}$	2×10^{8ns}	$5,60 \times 10^{3ns}$	$4,32 \times 10^{4b}$	$1,36 \times 10^{4b}$
Massa filada	$2,30 \times 10^{8ns}$	$4,9 \times 10^{2b}$	$2,03 \times 10^{4ns}$	$2,01 \times 10^{4ns}$	7×10^{1ns}	$1,66 \times 10^{4b}$	< 10 ^b
Produto Final pós salga	$1,03 \times 10^{8ns}$	7×10^{1b}	8,20 ^{ns}	1×10^{1ns}	2×10^{1ns}	$5,85 \times 10^{4b}$	$7,44 \times 10^{1b}$
<i>Shelf life</i>	2×10^{10ns}	$1,88 \times 10^{2b}$	$2,4 \times 10^{1ns}$	$2,06 \times 10^{2ns}$	1×10^{1ns}	$2,52 \times 10^{5b}$	$5,86 \times 10^{2b}$

Valores seguidos por ^{ns} não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Nemenyi a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Resultados de reações de PCR para identificação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* e caracterização biomolecular de fatores de virulência de *Escherichia coli* diarregiogênica de isolados sugestivos recuperados de cinco lotes de leite durante o fluxograma de produção e *shelf life* de muçarela produzida por laticínio da região norte do Tocantins, Brasil, no período de novembro de 2021 a março de 2022.

Etapa	<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i> diarregiogênica*						
					EPEC		STEC	EHEC	EAEC	EIEC	ETEC
	n	n (%) positivos	n	n (%) positivos	n	n (%) positivos	n (%) positivos	n (%) positivos	n (%) positivos	n (%) positivos	n (%) positivos
Leite cru	142	77 (54,23) ^a	75	0 ^{ns}	58	9 (15,52) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	5 (8,62) ^{ns}	2 (3,35) ^{ns}	0 ^{ns}
Leite pasteurizado	0	0 ^b	40	0 ^{ns}	0	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Massa pré-fermentação	44	7 (15,91) ^b	60	0 ^{ns}	18	6 (33,33) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	4 (22,22) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Massa fermentada	54	7 (12,96) ^b	61	4 (6,56) ^{ns}	16	5 (31,25) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	2 (12,5) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Massa filada	39	9 (23,08) ^{ab}	38	3 (7,89) ^{ns}	13	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Produto Final (pós salga)	66	25 (37,88) ^b	30	0 ^{ns}	6	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
<i>Shelf life</i>	60	0 ^b	62	8 (12,90) ^{ns}	0	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Total	405	125 (30,87) ^b	366	15 (1,37) ^{ns}	111	20 (18,01) ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	11 (9,9) ^{ns}	2 (1,8) ^{ns}	0 ^{ns}

* *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC); produtora de toxina shiga (STEC); enterohemorrágica (EHEC); enteroagregativa (EAEC); enteroinvasiva (EIEC); e, enterotoxigênica (ETEC). Valores seguidos por ^{ns} não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Porcentagens seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Nemenyi a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Caracterização molecular do potencial de produção de enterotoxinas estafilocócicas A a E (gene *seA* a *seE*), toxina do choque tóxico (*tst*), toxinas esfoliativas A e B (*etA* e *etB*) e resistência à meticilina (*mecA*) de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de cinco lotes de queijo muçarela ao longo de cada etapa do fluxograma de produção e *shelf life* em um laticínio da região norte do Tocantins, Brasil, no período novembro de 2021 a março de 2022.

Etapa	Nº isolados	Nº (%) positivos	<i>seA</i>	<i>seB</i>	<i>seC</i>	<i>seD</i>	<i>seE</i>	<i>tst</i>	<i>etA</i>	<i>etB</i>	<i>mecA</i>
			<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Leite cru	35	20 (57,14) ^a	0	4 (11,43)	2 (5,71)	1 (2,86)	0	9 (25,71)	0	1 (2,85)	3 (8,57)
Leite pasteurizado	0	0 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Massa pré-fermentação	3	3 (100,00) ^b	0	1 (33,3)	0	0	0	2 (66,67)	0	0	0
Massa fermentada	6	6 (100,00) ^{ab}	0	1 (16,67)	0	0	0	5 (83,33)	0	0	0
Massa filada	0	0 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Produto Final (pós salga)	1	2 (100,00) ^b	0	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	0	0
<i>Shelf life</i>	0	0 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	45	31 (68,89)	0	6 (13,33)	2 (4,44)	1 (2,22)	0	17 (37,77)	1 (2,22)	1 (2,22)	3 (6,66)

Valores seguidos por ^{ns} não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Porcentagens seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Nemenyi a 5% de probabilidade.

3 CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite cru refrigerado recepcionado pela indústria não atendeu ao critério microbiológico legal em nenhum dos lotes amostrados. A enumeração de micro-organismos potencialmente proteolíticos ou lipolíticos (psicrotróficos), além de bactérias toxigênicas, possui o potencial de comprometer a qualidade do leite mesmo que este seja eficientemente pasteurizado. Neste sentido, há de se considerar medidas de mitigação da contaminação da matéria-prima tendo em vista que a qualidade microbiológica do leite cru afeta diretamente o rendimento, o processo de produção bem como o produto final.

É imperativo que haja educação continuada aos fornecedores de leite para boas práticas agropecuárias, principalmente relativas à higiene de ordenha bem como dos equipamentos e utensílios, controle da saúde de manipuladores e animais e controle temperatura de refrigeração. O tempo transcorrido entre as coletas de leite cru refrigerado nas propriedades leiteiras deve ser reavaliado para otimização das rotas e diminuição. Tais medidas visam a produção de uma matéria-prima de qualidade e que atenda os parâmetros legais gerando maior rentabilidade para a cadeia produtiva como um todo.

O processo de pasteurização foi eficiente para eliminação dos perigos microbiológicos, entretanto houve recontaminação durante as etapas de produção do queijo. Coagulação, fermentação, secagem/embalagem (analisadas conjuntamente) são pontos de incorporação de bactérias deteriorantes e patogênicas, todavia, o processo de filagem, que utiliza um binômio tempo/temperatura elevado, demonstrou expressiva capacidade de controle microbiológico.

A enumeração de micro-organismos indicadores e patogênicos no produto final logo após processamento bem como nas amostras do *shelf life*, além da detecção por ensaio de PCR de *Salmonella* spp. (dois lotes no produtos final), *Staphylococcus* coagulase positiva (um lote no produto final), *Listeria monocytogenes* (um lote no *shelf life*) configura-se como perda de qualidade do produto e perigo à saúde do consumidor.

Atuam como pontos críticos de controle para contaminação biológica no processo de produção de queijo muçarela, o controle de temperatura (pasteurização, fermentação, filagem, salga, secagem e estocagem), a higiene de equipamentos, utensílios e ambiente industrial, o monitoramento da saúde dos colaboradores e os procedimentos sanitários operacionais. Neste sentido, o sistema de gestão da qualidade e segurança dos alimentos deve reavaliar os processos que apresentaram desvio para implantação de medidas corretivas eficientes, com base em BPA, BPF e APPCC.

Diante dos resultados encontrados foram indicadas as seguintes medidas corretivas a serem implantadas na indústria: intensificar a implantação do Plano de Qualificação dos produtores de Leite (PQFL); otimizar rotas de transporte de leite cru refrigerado para diminuição do tempo entre ordenhas e coletas; verificar permanentemente a limpeza e sanitização de equipamentos de ordenha, tanques de resfriamento e caminhões de transporte; treinar periodicamente todos os colaboradores sobre BPF; não utilizar diaristas sem vínculo com a empresa nas áreas de produção (fato constatado durante as coletas); determinar paradas obrigatórias para limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios entre os turnos de produção; monitorar a limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios entre os lotes de produção (não conformidade constatada durante as coletas), bem como o uso correto de produtos de químicos destinados a essa finalidade; monitorar, via laboratório externo a efetividade dos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e mãos de colaboradores através de análise microbiológica por amostragem mensal; monitorar trimestralmente, via análise físico-química e microbiológica, a conformidade do *shelf life* com o RTIQ do respectivo produto.

APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PONTOS DE COLETA