

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS
GERAIS - *CAMPUS* BAMBUÍ
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GEOVANA ANDRADE MACEDO

**AVALIAÇÃO DE PONTOS DE CONTAMINAÇÃO DOS AMBIENTES DE
PRODUÇÃO DO QUEIJO CANASTRA POR ESTAFILOCOCOS COAGULASE-
NEGATIVOS**

**BAMBUÍ-MG
2025**

GEOVANA ANDRADE MACEDO

**AVALIAÇÃO DE PONTOS DE CONTAMINAÇÃO DOS AMBIENTES DE
PRODUÇÃO DO QUEIJO CANASTRA POR ESTAFILOCOCCOS COAGULASE-
NEGATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como pré-requisito parcial para obtenção do
título de Licenciada em Ciências Biológicas pelo
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Minas Gerais – *Campus Bambuí*.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte

Coorientadora: Pesquisadora-convidada Talita
Gomes da Costa

**BAMBUÍ-MG
2025**

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - *Campus Bambuí*

M141a Macedo, Geovana Andrade.

Avaliação de pontos de contaminação dos ambientes
produção do Queijo Canastra por *Estafilococos Coagulase-*
Negativos [manuscrito] / Geovana Andrade Macedo – 2026.
65 f. :il. ; color.

Orientador: Gustavo Augusto Lacorte.

Coorientadora: Talita Gomes da Costa.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências
Biológicas) – Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus Bambuí*

1. Queijo Minas Artesanal. 2. *Estafilococos Coagulase-*
Negativos. I. Lacorte, Gustavo Augusto. II. Costa, Talita Gomes
da. III. Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus Bambuí*. IV.
Título.

CDD 637.3

Catálogo: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022

ATA DE DEFESA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS
Campus Bambuí
Diretoria de Ensino
Departamento de Ciências e Linguagens
Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05 - Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG
37.3431-4900 - www.ifmg.edu.br

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos nove dias do mês de janeiro do ano de 2026, às nove horas, nas dependências do IFMG – *Campus*, reuniu-se a banca examinadora presidida por mim, Gustavo Augusto Lacorte e demais membros: Talita Gomes da Costa (coorientadora), Amanda Soriano Araújo Barezani, Sonia de Oliveira Duque Paciulli. Nesta ocasião a discente Geovana Andrade de Macedo, do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, com registro acadêmico de número 0034083 do IFMG – *Campus* Bambuí, defendeu seu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “AVALIAÇÃO DE PONTOS DE CONTAMINAÇÃO DOS AMBIENTES DE PRODUÇÃO DO QUEIJO CANASTRA POR ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVOS” e foi **APROVADO**, com nota 91,5 **noventa e um pontos e meio**.

Este resultado reflete o cumprimento parcial dos critérios de avaliação estabelecidos pelo curso e reconhece os esforços e a dedicação do discente e seus orientadores no desenvolvimento do seu TCC. O lançamento da nota e o consequente encerramento do respectivo processo está condicionado ao cumprimento dos procedimentos pós-defesa conforme previstos nos regulamentos vigentes. Tais procedimentos pós-defesa devem ser finalizados dentro do prazo limite de 20 dias, a contar da data desta ata. O descumprimento destes procedimentos até a data estipulada implicará em atribuição de nota 0 (zero) e consequente reprovação.

A sessão foi encerrada às dezessete horas. Para constar, eu, Gustavo Augusto Lacorte, redigi a presente ata que após lida publicamente, foi aprovada e assinada pelo discente e membros da banca examinadora.

Bambuí, 09 de janeiro de 2026



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Augusto Lacorte, Professor**, em 09/01/2026, às 13:21, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Soriano Araújo Barezani, Professora**, em 09/01/2026, às 14:24, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Talita Gomes da Costa, Usuário Externo**, em 13/01/2026, às 11:10, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Sonia de Oliveira Duque Paciulli, Professor**, em 20/01/2026, às 09:02, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **2568382** e o código CRC **4FF61492**.

23209.005025/2025-25

2568382v1

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, à minha mãe, minha maior incentivadora, pelo apoio incondicional, pela força constante e por nunca deixar que eu desistisse dos meus objetivos, mesmo nos momentos mais desafiadores dessa trajetória.

À Talita Gomes da Costa, por todo o incentivo, orientação e apoio ao longo deste percurso, especialmente por nunca me deixar desistir e por acreditar no desenvolvimento deste trabalho desde o início.

Ao professor Gustavo Augusto Lacorte, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança depositada e pela contribuição fundamental para minha formação acadêmica, científica e também como professora.

Agradeço, ainda, a todos os envolvidos no projeto ao longo dos anos, cujas colaborações, apoio e dedicação tornaram possível a realização deste trabalho.

"Não se sabe como uma pessoa aprende; mas, de qualquer forma que aprenda, é sempre por intermédio de signos, perdendo tempo, e não pela assimilação de conteúdos objetivos".

- Gilles Deleuze

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Municípios produtores de Queijo Canastra.	17
Figura 2 - Esquema do delineamento amostral.	30
Figura 3 - Fluxograma de trabalho.	32
Figura 4 - Heatmap da distribuição de ECN por ponto amostral considerando as 16 réplicas (4 propriedades $\times$ 2 estações $\times$ 2 coletas).	42
Figura 5 - Heatmap da frequência média de detecção de ECN nos três grupos funcionais.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização geral das quatro fazendas produtoras de QMAC.	36
Tabela 2 - Teste de Fisher comparando a presença de ECN entre estação seca e estação chuvosa para cada ponto amostral (n=8 por estação).	40
Tabela 3 - Teste do qui-quadrado comparando a prevalência de ECN entre as quatro propriedades para cada ponto amostral.	43
Tabela 4 - Testes do qui-quadrado comparando os três grupos funcionais par-a-par.	46

RESUMO

MACEDO, Geovana Andrade. **Avaliação de pontos de contaminação dos ambientes de produção do Queijo Canastra por Estafilococos Coagulase-Negativos**. Bambuí: IFMG campus Bambuí, 2025.

Este estudo avaliou a ocorrência de Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN) em diferentes microambientes envolvidos na produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra (QMAC), com o objetivo de identificar potenciais pontos críticos de contaminação. As amostragens foram realizadas em quatro propriedades regularizadas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), contemplando 29 pontos de coleta distribuídos entre sala de ordenha, queijaria, utensílios, epitélios de manipuladores, matérias-primas e produtos em diferentes estágios. As coletas ocorreram em duas estações climáticas, resultando em 16 observações por ponto amostral. A identificação presuntiva de estafilococos envolveu plaqueamento em meio Baird-Parker, purificação em ágar nutriente e aplicação dos testes de catalase, coloração de Gram e coagulase lenta. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as estações seca e chuvosa em nenhum dos 29 pontos analisados. Verificou-se elevada frequência de ECN em epitélios humanos e animais, superfícies de contato e queijos com 3 e 14 dias de maturação, indicando que esses locais constituem reservatórios persistentes. A água utilizada no processamento apresentou ausência total de ECN, refletindo adequação sanitária. A variabilidade observada entre amostras individuais de leite evidenciou que a contaminação não é homogênea entre animais. Os dados sugerem que a origem dos ECN está associada tanto ao contato direto com manipuladores e animais quanto à possível persistência ambiental em superfícies estruturais e utensílios, possivelmente relacionada à formação de biofilmes. Conclui-se que os ECN apresentam ampla distribuição ao longo da cadeia produtiva do QMAC e que sua presença consistente em pontos críticos destaca a importância do monitoramento higiênico-sanitário contínuo, da manutenção de boas práticas de fabricação e da revisão de estruturas e fluxos de trabalho nas propriedades avaliadas. Os achados contribuem para a compreensão da ecologia microbiana do QMAC e oferecem subsídios para estratégias de controle que assegurem a qualidade e a segurança do produto artesanal.

Palavras-chave: Queijo Minas Artesanal; Estafilococos Coagulase-Negativos.

ABSTRACT

MACEDO, Geovana Andrade. **Evaluation of contamination points in Canastra cheese production environments by coagulase-negative staphylococci.** Bambuí: IFMG *campus* Bambuí, 2025.

This study evaluated the occurrence of Coagulase-Negative Staphylococci (ECN) in different microenvironments involved in the production of Minas Artesanal Canastra Cheese (QMAC), with the aim of identifying potential critical contamination points. Sampling was carried out on four properties regulated by the Minas Gerais Institute of Agriculture (IMA), encompassing 29 collection points distributed among milking parlors, cheese factories, utensils, handlers' epithelia, raw materials, and products at different stages. Collections occurred in two climatic seasons, resulting in 16 observations per sampling point. Presumptive identification of staphylococci involved plating on Baird-Parker medium, purification on nutrient agar, and application of catalase, Gram staining, and slow coagulase tests. The results showed no statistically significant difference between the dry and rainy seasons at any of the 29 points analyzed. High frequencies of ECN were found in human and animal epithelia, contact surfaces, and cheeses aged 3 and 14 days, indicating that these locations constitute persistent reservoirs. The water used in processing showed a total absence of ECN, reflecting sanitary adequacy. The variability observed between individual milk samples showed that contamination is not homogeneous among animals. The data suggest that the origin of ECN is associated both with direct contact with handlers and animals and with possible environmental persistence on structural surfaces and utensils, possibly related to biofilm formation. It is concluded that ECN are widely distributed throughout the production chain of artisanal Minas cheese and that their consistent presence at critical points highlights the importance of continuous hygienic-sanitary monitoring, the maintenance of good manufacturing practices, and the review of structures and workflows on the evaluated properties. The findings contribute to the understanding of the microbial ecology of artisanal Minas cheese and offer support for control strategies that ensure the quality and safety of the artisanal product.

Keywords: Artisanal Minas Cheese; Coagulase-Negative Staphylococci.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Justificativa	13
1.2. OBJETIVOS	14
1.2.1. <i>Objetivo geral</i>	14
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. Pecuária leiteira e o Queijo Minas Artesanal da Canastra.....	16
2.1.1. <i>Características e importância regional</i>	17
2.1.2. <i>Etapas da produção artesanal</i>	18
2.1.3. <i>Aspectos legais e sanitários</i>	19
2.2. Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN)	20
2.2.1. <i>Características gerais e habitat</i>	20
2.2.2. <i>Importância sanitária e tecnológica</i>	22
2.2.3. <i>Potencial patogênico: biofilmes, resistência e toxinas</i>	23
2.2.4. <i>Qualidade higiênico-sanitária nos ambientes de produção do QMAC</i>	25
2.2.5. <i>Fontes comuns de contaminação</i>	26
2.2.6. <i>Práticas de higiene e segurança do alimento</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Local do estudo e descrição das propriedades	30
3.2. Estratégia de amostragem e pontos analisados.....	31
3.3. Meios de cultura e testes utilizados	32
3.3.1. <i>Plaqueamento em Baird-Parker</i>	32
3.3.2. <i>Estria em ágar nutriente</i>	33
3.3.3. <i>Teste da catalase e Coloração de Gram</i>	33
3.3.4. <i>Teste de coagulase</i>	34
3.4. Análise e interpretação dos dados	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Caracterização das Propriedades.....	36
4.2. Presença e distribuição de ECN nos diferentes pontos de amostragem	39
4.2.1. <i>Distribuição de ECN por ponto amostral: análise descritiva</i>	41
4.3. Análise comparativa entre as propriedades	43
4.3.1. <i>Análise após remoção dos pontos com variação entre propriedades</i>	45
4.3.2. <i>Análise de contingência ponto-a-ponto</i>	47
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra (QMAC) representa um dos mais importantes patrimônios culturais, econômicos e alimentares de Minas Gerais. Elaborado tradicionalmente a partir de leite cru, fermento endógeno (“pingo”) e técnicas transmitidas entre gerações, o QMAC constitui não apenas uma fonte de renda fundamental para famílias produtoras, mas também um alimento de forte identidade territorial. Entretanto, o uso de leite cru, aliado às características próprias das instalações artesanais, torna indispensável a compreensão detalhada dos microrganismos presentes ao longo de seu processo de fabricação, tanto sob a perspectiva tecnológica quanto sanitária.

A microbiota envolvida na elaboração do QMAC é complexa e exerce papel central na textura, no sabor, na maturação e na segurança do produto. Espécies de bactérias lácticas, como *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, contribuem para a acidificação, produção de compostos aromáticos e inibição de patógenos (FOX *et al.*, 2017). Contudo, o leite cru e o ambiente de produção também podem abrigar microrganismos indesejáveis, entre eles espécies do gênero *Staphylococcus*, grupo que apresenta importância tanto na saúde animal quanto na segurança dos alimentos (GETAHUN *et al.*, 2024). O foco histórico das pesquisas recai sobre os Estafilococos Coagulase-Positivos (ECP), especialmente *Staphylococcus aureus*, reconhecido pela capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis e por sua associação a surtos de intoxicação alimentar.

Ainda assim, cresce o interesse científico sobre um conjunto de microrganismos menos investigado, porém altamente prevalente na cadeia leiteira: os Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN). Estes microrganismos compõem a microbiota natural da pele e do canal mamário de vacas e, por esse motivo, são frequentemente isolados do leite cru utilizado na fabricação de queijos artesanais.

Os ECN apresentam uma dualidade que desafia categorizações simplistas. Por um lado, são reconhecidos por seu papel tecnológico positivo em queijos artesanais: contribuem para o desenvolvimento de aromas e sabores característicos através da proteólise e lipólise, participando ativamente da degradação de proteínas e lipídios durante a maturação (DELCENSERIE *et al.*, 2014; AQUILANTI *et al.*, 2016). Espécies como *Staphylococcus equorum*, *S. xylosus* e *S. carnosus* produzem compostos voláteis responsáveis por notas frutadas e adocicadas, além de apresentarem atividade de redutase de nitrato que contribui para a estabilização da cor do produto (IRLINGER *et al.*, 2012; BERTUZZI *et al.*, 2018).

Por outro lado, estudos recentes apontam que os ECN possuem características biológicas que merecem atenção do ponto de vista de segurança do alimento: capacidade de formar biofilmes em superfícies de contato com alimentos, resistência a agentes antimicrobianos, persistência ambiental e, em algumas espécies, detecção de genes relacionados a enterotoxinas estafilocócicas (GETAHUN *et al.*, 2024). Tais fatores podem favorecer sua sobrevivência nos ambientes das queijarias e seu transporte para o produto final. No contexto da produção leiteira, os ECN são também descritos como uma das principais causas de mastite subclínica em bovinos. Essa condição, embora não apresente sinais clínicos evidentes, reduz a qualidade do leite, altera sua composição e aumenta a carga microbiana inicial, afetando diretamente a inocuidade do queijo produzido a partir desse leite.

Essa natureza ambivalente dos ECN torna fundamental distinguir entre sua presença como componente desejável da microbiota de maturação e sua ocorrência como indicador de falhas nas Boas Práticas de Fabricação. A origem dos ECN, se provenientes do leite cru de qualidade, do ambiente de processamento, de equipamentos contaminados ou da própria cultura iniciadora natural (pingo), define em grande medida seu impacto sobre o produto (DELCENSERIE *et al.*, 2014; AQUILANTI *et al.*, 2016). Os ECN oriundos de mastite ou de biofilmes persistentes em superfícies podem comprometer a segurança, enquanto aqueles naturalmente presentes no leite de qualidade e no pingo contribuem para a identidade sensorial do QMAC.

1.1. Justificativa

A realização deste estudo se justifica pela necessidade crescente de aprimorar a segurança microbiológica do Queijo Minas Artesanal da Canastra, especialmente diante de sua valorização nacional e internacional. Como o QMAC é elaborado a partir de leite cru, o controle da microbiota ao longo das etapas produtivas é fundamental para prevenir contaminações que possam comprometer a qualidade e a segurança do alimento.

A lacuna científica envolvendo ECN em queijos artesanais, como o QMAC, também reforça a importância do trabalho. Enquanto há vasto conhecimento acumulado sobre *Staphylococcus aureus* e outros patógenos clássicos, o papel dos ECN na cadeia de produção ainda é pouco explorado, apesar de sua ampla ocorrência no leite e em superfícies de contato em laticínios (GETAHUN *et al.*, 2024). Produzir dados sobre esses microrganismos pode subsidiar órgãos reguladores, pesquisadores e produtores na elaboração de diretrizes sanitárias

mais específicas para a produção artesanal. Dada a escassez de estudos voltados à investigação desses microrganismos em ambientes de produção de queijos artesanais, este trabalho justifica-se pela necessidade de identificar possíveis focos de contaminação ao longo do processo produtivo.

Diante da relevância e da natureza dual dos *Estafilococos* Coagulase-Negativos no ambiente de produção de queijos artesanais, este Trabalho de Conclusão de Curso tem como proposta realizar uma avaliação de microambientes envolvidos no processo de produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra, identificando-os como potenciais focos de contaminação por esses microrganismos. Para isso, serão investigadas superfícies, utensílios, equipamentos e matérias-primas utilizados nas salas de ordenha e nas queijarias artesanais de quatro queijarias registradas na Serra da Canastra. Espera-se, com isso, contribuir para estratégias de controle que preservem os atributos tecnológicos desejáveis dos ECN, ao mesmo tempo em que minimizam riscos associados à sua presença inadequada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Investigar a ocorrência e a distribuição de *Estafilococos* Coagulase-Negativos (ECN) em microambientes envolvidos no processo de produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Realizar a coleta sistemática de amostras em diferentes microambientes das etapas de produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra, como superfícies de contato, utensílios, equipamentos, água, pingos, mãos dos manipuladores, sala de ordenha e sala da queijaria, com a finalidade de identificar pontos críticos potenciais para a presença de *Estafilococos* Coagulase-Negativos.
2. Conduzir análises microbiológicas das amostras coletadas, utilizando metodologia de plaqueamento em superfície (*Spread Plate*) em meio Baird-Parker suplementado, para isolamento presuntivo de *Estafilococos*.
3. Realizar a triagem e identificação de *Estafilococos* Coagulase-Negativos por meio de testes fenotípicos e bioquímicos, incluindo coloração de Gram, teste da catalase e coagulase em tubo (coagulase lenta), visando diferenciar ECN de ECP.

4. Avaliar a distribuição e frequência dos isolados confirmados de ECN nos diferentes microambientes e propriedades avaliadas, comparando sua ocorrência entre as estações seca e chuvosa, de modo a identificar padrões de contaminação, rotas prováveis de disseminação e microambiente(s) de maior risco sanitário.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Pecuária leiteira e o Queijo Minas Artesanal da Canastra

O leite acompanha a humanidade desde seus primórdios, desempenhando um papel essencial na dieta das primeiras populações (MCCORMICK, 2012). Na atualidade, consolidou-se não apenas como um alimento de alto valor nutricional, mas também como um produto economicamente relevante e amplamente investigado pela comunidade científica, especialmente em estudos voltados à melhoria de sua qualidade, segurança e desempenho tecnológico (BOJOVIC; MCGREGOR, 2023).

O leite bovino destaca-se pelo potencial de suprir nutrientes fundamentais em diferentes fases da vida, sendo produzido em larga escala no Brasil e desempenhando papel estruturante na economia rural. De acordo com o Anuário Leite 2025, a produção nacional alcançou 35,375 bilhões de litros em 2024, com destaque para Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2025).

A composição do leite é complexa e resulta de uma síntese altamente regulada na glândula mamária, envolvendo componentes essenciais como gorduras, proteínas e carboidratos, que fornecem energia e sustentam o crescimento (TRONCO, 2013; STRADIOTTI JÚNIOR *et al.*, 2012). Elementos como vitaminas, minerais, anticorpos e aminoácidos conferem propriedades fisiológicas importantes, mantendo o pH próximo da neutralidade (QUIGLEY *et al.*, 2013). Em média, o leite contém entre 12 e 13% de sólidos totais e cerca de 87% de água, valores que variam conforme espécie, raça, alimentação, manejo e condições ambientais (EMBRAPA, 2025). Essas variações físico-químicas influenciam diretamente o rendimento e as características sensoriais dos queijos artesanais, determinando atributos como textura, sabor e estrutura da coalhada (COSTA *et al.*, 2024).

A produção de queijos artesanais, predominantemente realizada em propriedades familiares, desempenha papel central na economia rural, contribuindo para a geração de empregos, fixação de mão de obra no campo e valorização da produção local (SILVA *et al.*, 2025). Entretanto, a qualidade do leite utilizado depende de múltiplos fatores. Entre os fatores internos, destacam-se a higienização adequada de equipamentos e superfícies, a limpeza dos tetos e os cuidados adotados por ordenhadores e queijeiros. Entre os fatores externos, influenciam a localização da propriedade, o clima, a sazonalidade, a temperatura do leite e outras variáveis ambientais (SILVA, 2020; CAMPOS, 2023).

2.1.1. Características e importância regional

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um produto tradicional de grande relevância socioeconômica, produzido majoritariamente por pequenos agricultores familiares, sendo uma importante fonte de geração de renda e emprego no estado de Minas Gerais (DORES; FERREIRA, 2012). Dentre as regiões produtoras, destaca-se a microrregião da Canastra (Figura 1), localizada no sudoeste mineiro, reconhecida há mais de dois séculos como uma das principais produtoras desse tipo de queijo (MINAS GERAIS, 2018).

Figura 1 - Municípios produtores de Queijo Canastra.



Fonte: OLIVEIRA (2020).

A designação “Queijo Minas Artesanal da Canastra” é exclusiva para os produtos elaborados de forma artesanal nos municípios de São Roque de Minas, Medeiros, Vargem Bonita e em áreas específicas de Piumhi, Delfinópolis, Bambuí, Tapiraí, São João Batista do Glória e Córrego D'Anta. Essa delimitação territorial está vinculada ao registro de Indicação Geográfica (IG) na modalidade de Denominação de Origem (DO), concedido pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), que reconhece a singularidade do produto em função de seu local de origem e do saber-fazer tradicional (MINAS GERAIS, 2018).

Em 2020, estimava-se que a região abrigava cerca de 800 produtores artesanais, responsáveis por uma produção anual aproximada de 576 toneladas de queijo (FIERN, 2020). O Queijo Canastra, símbolo da tradição e da identidade cultural local, foi declarado patrimônio cultural imaterial brasileiro em maio de 2008, título concedido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), em reconhecimento ao seu processo de fabricação único, transmitido oralmente e praticado há mais de 200 anos, desde o século XVIII (JÚNIOR *et al.*, 2014). Atualmente, em dezembro de 2024, os modos tradicionais de fazer o Queijo Minas Artesanal, incluindo os produzidos na microrregião da Canastra, foram oficialmente inscritos na Lista Representativa do Patrimônio Cultural Imaterial da Humanidade pela UNESCO. (UNESCO, 2024).

A região da Serra da Canastra reúne condições naturais privilegiadas que configuram um verdadeiro *terroir* ideal para a produção do Queijo Minas Artesanal. O conceito de *terroir* refere-se à combinação de fatores físico-ambientais, como clima, altitude, pastagens nativas e qualidade da água, que influenciam diretamente as características sensoriais do produto final (INPI; SEBRAE, 2016), o que reforça a relação entre ambiente, práticas artesanais e qualidade microbiológica.

2.1.2. Etapas da produção artesanal

O processo de fabricação do Queijo Minas Artesanal da Canastra segue técnicas tradicionais transmitidas entre gerações, preservando a identidade local. A produção inicia-se logo após a ordenha, utilizando-se leite cru integral processado em até 90 minutos. Após a filtragem para remoção de impurezas, alguns produtores adicionam sal diretamente ao leite, em proporções entre 100 e 500 g para cada 100L (MINAS GERAIS, 2018).

A etapa de coagulação ocorre com a adição do pingo, e do coalho de origem animal. A quantidade de pingo utilizada varia entre 100 e 250 mL por 100 L de leite, sendo fundamental para o desenvolvimento da acidez e da flora microbiana típica do queijo. O coalho pode ser em pó ou líquido e a quantidade é de acordo com o fabricante (INAES, 2011; PINEDA *et al.*, 2021). Após a formação do coágulo, realiza-se o corte da massa, tradicionalmente em fragmentos de 1 a 2 cm, seguido da mexedura, que auxilia na drenagem do soro e na homogeneização da massa. Em seguida ocorre a enformagem em formas arredondadas próprias da região, a prensagem manual e a salga, etapas fundamentais para a compactação, conservação e desenvolvimento do sabor (CAMPOS, 2019).

Ao final da produção, os queijos são mantidos sobre superfícies levemente inclinadas para drenar o soro remanescente, processo que dura cerca de 12 horas. O soro coletado, após fermentação natural, é reaproveitado como pingo na produção seguinte (GARABAL, 2007; NÓBREGA *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2016). Esse fermento endógeno é essencial para a continuidade da tradição, pois transfere entre os lotes a microbiota característica da região, incorporando microrganismos provenientes do leite cru, das mãos dos manipuladores, do ambiente de ordenha e das superfícies de contato. Dessa forma, o pingo confere ao queijo um conjunto microbiano diversificado e representativo do território, responsável por características sensoriais únicas (GARABAL, 2007; NÓBREGA *et al.*, 2008).

A maturação é a etapa final da produção, possui período mínimo de 14 dias e é essencial para o desenvolvimento da cor, sabor, aroma e textura característicos do QMAC. Durante esse período, ocorrem transformações bioquímicas, como lipólise, proteólise e glicólise, que alteram a estrutura interna do queijo e intensificam suas propriedades sensoriais (FOX, 1993; DORES, 2007; SILVA, 2007; MINAS GERAIS, 2020a).

2.1.3. Aspectos legais e sanitários

De acordo com a Lei nº 13.860/2019 (BRASIL, 2019), o queijo artesanal é definido como o produto elaborado por métodos tradicionais, preservando vínculos territoriais, regionais e culturais. A legislação aplicável à produção do Queijo Minas Artesanal estabelece diretrizes rigorosas para assegurar a qualidade sanitária e a padronização do processo produtivo. O responsável técnico pela queijaria deve ser devidamente capacitado para conduzir o manejo e o controle das etapas de fabricação, garantindo o cumprimento das boas práticas agropecuárias e de fabricação, conforme exigido pelas normas estaduais (MINAS GERAIS, 2018). Além disso, a água utilizada em todas as fases do processamento deve ser comprovadamente potável, submetida a análises físico-químicas e microbiológicas periódicas e receber tratamento adequado quando necessário, de forma a evitar riscos de contaminação.

A legislação também normatiza etapas-chave do processo de maturação e comercialização. A maturação, considerada indispensável para a obtenção das características sensoriais e microbiológicas do queijo artesanal deve ocorrer em temperatura ambiente, sendo proibida a refrigeração. No âmbito da comercialização, somente queijos provenientes de queijarias e entrepostos devidamente habilitados podem ser vendidos no território estadual,

devendo apresentar rotulagem padronizada que assegure rastreabilidade e identificação correta do produto (MINAS GERAIS, 2018).

De forma complementar, as Portarias IMA nº 2051/2021 e nº 2322/2024 estabeleceram tempos mínimos de maturação específicos para cada microrregião produtora, incluindo o período mínimo de 14 dias para a Canastra. Essas medidas buscam conciliar o uso do leite cru com exigências sanitárias contemporâneas, garantindo maior segurança microbiológica ao produto final (IMA, 2021; IMA, 2024b).

Do ponto de vista técnico-operacional, essas portarias introduzem ajustes significativos na rotina das queijarias, como a obrigatoriedade de registro dos estabelecimentos, a padronização de períodos de cura e a definição de parâmetros ambientais para as câmaras de maturação. Tais exigências promovem maior controle higiênico-sanitário e profissionalização das unidades produtoras, sem descaracterizar elementos tradicionais como o uso do pinga e do leite cru da própria propriedade (IMA, 2021; IMA, 2024b).

2.2. Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN)

2.2.1. Características gerais e hábitat

Os Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN) constituem um grupo heterogêneo de bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, caracterizadas como cocos Gram-positivos, catalase-positivos e coagulase-negativos (BECKER *et al.*, 2014). A distinção entre ECN e Estafilococos Coagulase-Positivos (ECP) baseia-se na capacidade de produzir a enzima coagulase, que permite a conversão de fibrinogênio em fibrina. Embora essa classificação seja tradicionalmente utilizada na prática clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* das demais espécies, ela representa uma simplificação, uma vez que não há evidências diretas de que a coagulase seja um fator de virulência per se (FOSTER, 1996; BECKER *et al.*, 2014).

Do ponto de vista taxonômico, os estafilococos constituem um grupo diverso dentro do gênero *Staphylococcus*, no qual os ECN representam a maior parte das espécies descritas. Esses microrganismos apresentam morfologia cocóide, frequentemente organizados em arranjos semelhantes a cachos, e são anaeróbios facultativos capazes de crescer em ampla variedade de condições ambientais, características que favorecem sua persistência em produtos lácteos. Além disso, estudos recentes destacam que diversas espécies de ECN, como *Staphylococcus xylosus*, *S. equorum* e *S. succinus*, exercem funções tecnológicas relevantes durante a maturação de queijos, contribuindo para o desenvolvimento de aroma, sabor e textura,

enquanto outras linhagens podem apresentar genes associados à virulência e risco sanitário, o que reforça a necessidade de monitoramento microbiológico adequado durante a produção (BECKER *et al.*, 2014).

No contexto da pecuária leiteira, as espécies de ECN mais frequentemente isoladas incluem: *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* e *S. hyicus* (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009; PERSSON WALLER *et al.*, 2023). Entre essas, *S. chromogenes* e *S. simulans* destacam-se como as espécies predominantes em casos de mastite subclínica bovina, sendo isoladas com maior frequência em amostras de leite de vacas infectadas (PERSSON WALLER *et al.*, 2023).

Estudo recente envolvendo isolados de mastite clínica bovina demonstrou que os ECN constituem um grupo altamente diverso, abrangendo 15 espécies diferentes, entre as quais *Staphylococcus chromogenes* se destacou com 49,4% dos isolados, seguida por *S. equorum* (13,8%) e *S. simulans* (5,0%). Os autores observaram elevados níveis de resistência antimicrobiana entre os ECN, especialmente à penicilina, além da presença de genes associados à multirresistência, incluindo *blaZ*, *tetK*, *tetM* e *ermC*; em alguns casos, detectou-se também o gene *mecA*, indicativo de resistência à meticilina (FENG *et al.*, 2023).

Os ECN ocupam diversos nichos ecológicos na cadeia produtiva do leite e do queijo artesanal. Naturalmente, essas bactérias colonizam a pele, mucosas e o úbere de bovinos, sendo componentes da microbiota normal desses animais (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). Na glândula mamária, os ECN são frequentemente associados a infecções intramamárias subclínicas, que, embora não apresentem sinais clínicos evidentes, podem alterar a composição do leite e aumentar a carga microbiana inicial da matéria-prima (DE VISSCHER *et al.*, 2016). Além disso, os ECN são capazes de colonizar superfícies abióticas presentes nos ambientes de ordenha e processamento, incluindo equipamentos de ordenha, tanques de resfriamento, formas de queijo, bancadas e prateleiras de maturação (TREMBLAY *et al.*, 2013).

Uma característica marcante dos ECN é sua notável capacidade de adaptação a condições ambientais adversas. Essas bactérias demonstram elevada tolerância a ambientes secos, com atividade de água (aw) inferior a 0,90, e a concentrações extremamente altas de sal, podendo crescer em até 25% de NaCl (w/v). Essa tolerância osmótica é mediada por mecanismos moleculares complexos, incluindo a produção de solutos compatíveis (como glicina betaína, prolina e glutamina), canais iônicos voltagem-dependentes para potássio, e ajustes na composição lipídica da membrana celular. A alta tolerância ao sal explica, em parte,

a prevalência de ECN em produtos fermentados salgados e em ambientes de produção de alimentos com elevada salinidade (IRLINGER, 2008).

No ambiente das queijarias artesanais da Serra da Canastra, os ECN podem estar presentes em múltiplos pontos do processo produtivo. O leite cru constitui a principal fonte de introdução desses microrganismos, seja proveniente de animais com mastite subclínica ou da microbiota cutânea do úbere. Adicionalmente, o pinga pode conter populações significativas de ECN, contribuindo para a microbiota de maturação do queijo (RESENDE *et al.*, 2011). As superfícies de contato (formas de madeira, bancadas, panos, utensílios) e o próprio ambiente da queijaria (ar, paredes, prateleiras) também podem atuar como reservatórios persistentes de ECN, especialmente quando há formação de biofilmes (TREMBLAY *et al.*, 2014).

A compreensão da ecologia dos ECN nos ambientes de produção do QMAC é fundamental para distinguir entre sua presença como componente tecnológico desejável, contribuindo para as características sensoriais do queijo, e sua ocorrência como indicador de falhas higiênico-sanitárias. Essa distinção é particularmente relevante no contexto das exigências regulatórias contemporâneas, que buscam conciliar a preservação da identidade do produto artesanal com a garantia de sua inocuidade.

2.2.2. Importância sanitária e tecnológica

Os Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN) tradicionalmente são reconhecidos como importantes contaminantes de alimentos e agentes de infecções oportunistas em humanos e animais. Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que esses microrganismos também desempenham funções benéficas relevantes, tanto no ponto de vista sanitário quanto tecnológico. Em humanos, diversas espécies de ECN, como *Staphylococcus epidermidis*, integram a microbiota cutânea saudável e exercem funções que modulam a colonização por patógenos. Estudos demonstram que moléculas sinalizadoras produzidas por ECN inibem o sistema de comunicação intercelular das *Staphylococcus aureus*, reduzindo a expressão de fatores de virulência e, conseqüentemente, diminuindo o potencial patogênico dessa espécie, contribuindo para a manutenção da homeostase da pele (NAKATSUJI *et al.*, 2017). Outros trabalhos evidenciam que *S. epidermidis* secreta substâncias capazes de interferir diretamente na via de regulação *SaeRS* (sistema regulatório de dois componentes) de *S. aureus*, reduzindo sua hemólise e agressividade, o que amplia a compreensão do papel protetor dos ECN no ambiente cutâneo (NURXAT *et al.*, 2023). Além disso, pesquisas destacam que a presença de

ECN induz respostas imunes favoráveis ao fortalecimento da barreira epidérmica, modulando citocinas e favorecendo mecanismos de reparo tecidual, o que reforça sua relevância sanitária em processos de defesa do hospedeiro (OCHLICH *et al.*, 2023).

Além de sua importância biológica para a saúde humana, os ECN apresentam valor tecnológico significativo, especialmente na indústria de alimentos de origem animal. Espécies derivadas de alimentos fermentados possuem atividades proteolíticas, lipolíticas e redutoras de nitrato, contribuindo diretamente para o desenvolvimento de textura, coloração e aromas característicos de produtos como embutidos, carnes curadas e queijos (HEO *et al.*, 2020). Essas características metabólicas tornam os ECN candidatos adequados para uso como culturas iniciadoras (*starter cultures*) em processos fermentativos, ainda que sua aplicação exija rigorosa avaliação de segurança microbiológica, especialmente no que se refere à produção de toxinas, perfil de resistência antimicrobiana e formação de aminas biogênicas. Estudos aplicados à produção tradicional de embutidos demonstram que cepas isoladas podem ser selecionadas de acordo com seu potencial tecnológico e baixo risco sanitário, indicando que ECN podem ser empregados de forma segura e eficaz em processos fermentativos (ALFAIA *et al.*, 2018). Análises estratégicas, como a apresentada por Stavropoulou e colaboradores (2018), mostram que o uso de *Estafilococos* Coagulase-Negativos como culturas não convencionais oferece oportunidades importantes para inovação na produção de alimentos, embora também apresente desafios regulatórios, especialmente pela ausência de status de segurança universal, como o QPS (*Qualified Presumption of Safety*). Em conjunto, esses estudos demonstram que os ECN, longe de serem apenas contaminantes, apresentam atributos que os tornam relevantes na proteção da saúde humana, na manutenção da microbiota e no aprimoramento tecnológico de alimentos fermentados.

2.2.3. Potencial patogênico: biofilmes, resistência e toxinas

Em contrapartida às suas funções tecnológicas, os *Estafilococos* Coagulase-Negativos (ECN) também são reconhecidos como contaminantes relevantes na cadeia de produção de leite e derivados devido à sua capacidade de formar biofilmes, acumular resistência antimicrobiana e, em alguns casos, portar genes associados a resistência a desinfetantes e antibióticos. A formação do biofilme inicia-se com a adesão mediada por fatores de superfície e adesinas, seguida pela produção de uma matriz polimérica extracelular (EPS) composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, o que gera uma estrutura tridimensional que

reduz a penetração de sanitizantes e dificulta a remoção por limpeza mecânica. Espécies frequentemente isoladas em ambientes clínicos e alimentares, como *Staphylococcus epidermidis* e *S. haemolyticus*, apresentam elevada capacidade de formação de biofilme e têm sido associadas à persistência em superfícies inertes; além disso, genes de resistência a quaternários de amônio (qac/smr) e outros marcadores de resistência já foram descritos em estafilococos de origem animal e ambiental, o que pode comprometer a eficácia de desinfetantes usados em ordenhadeiras e equipamentos de queijarias, favorecendo reinoculação do leite cru e contaminação recorrente dos lotes (TREMBLAY *et al.*, 2014; FRANCISCO *et al.*, 2021; LIANOUE *et al.*, 2023)

A resistência antimicrobiana configura uma dimensão importante do risco associado aos ECN, em grande parte porque algumas linhagens carregam o gene *mecA*, que codifica a proteína *PBP2a* e confere resistência à meticilina e a diversos β -lactâmicos (FENG *et al.*, 2023; GETAHUN, 2024). Estudos realizados com isolados provenientes de leite bovino e de mastite clínica documentaram a circulação de cepas de ECN portadoras de *mecA* e perfis multirresistentes, incluindo resistência a tetraciclinas e macrolídeos, evidenciando o potencial desses microrganismos como reservatórios de resistência na cadeia láctea (FENG *et al.*, 2023; GETAHUN, 2024). Além disso, investigações em isolados de leite de tanque e em amostras de equipamentos de processamento demonstraram elevada capacidade de formação de biofilme entre Estafilococos Coagulase-Negativo, associada a maior ocorrência de genes relacionados à adesão e formação de biofilme (por exemplo *icaA*, *icaD*) e a maior frequência de resistência fenotípica; esses fatores favorecem a persistência em superfícies e a contaminação contínua do leite cru (FRANCISCO *et al.*, 2021; LEE; LEE, 2022). Estudos epidemiológicos e laboratoriais também detectaram genes de resistência a desinfetantes em estafilococos isolados de rebanhos e tanques de leite, o que pode reduzir a eficácia de sanitizantes e contribuir para a sobrevivência de biofilmes em equipamentos de ordenha e queijarias (BJORLAND *et al.*, 2005; ERGUN, 2017).

Estudos recentes com análise de queijos “coalho”, foram identificadas cepas coagulase-negativas positivas para o gene *sec* com frequência elevada ($\approx 46,8\%$) (COLARES DE ANDRADE *et al.*, 2019;). Em outro estudo com embutido no sul do Brasil, 48,8 % das 82 cepas de *Staphylococcus* analisadas, das quais 75,6 % eram ECN, apresentaram pelo menos um gene de enterotoxina; entre os genes detectados estavam *sea*, *seb*, *sec*, *see* e *sed* (Moura *et al.*, 2012). Outro estudo recente detectou o gene *sec*, que codifica a enterotoxina estafilocócica C,

em isolados de leite cru, sugerindo que esses microrganismos podem atuar como reservatórios silenciosos de fatores de virulência (GETAHUN *et al.*, 2024).

2.2.4. *Qualidade higiênico-sanitária nos ambientes de produção do QMAC*

O leite cru abriga uma comunidade microbiana complexa, cuja composição inicial é fortemente influenciada por diversas fontes externas à glândula mamária, incluindo a pele do teto, os equipamentos de ordenha e o ambiente da fazenda, como solo, cama, água e poeira (QUIGLEY, 2013). Estudos mostram que até 92% das bactérias presentes no leite cru podem derivar da pele do teto, estabelecendo uma rede de troca microbiana entre esses espaços contíguos (YAN *et al.*, 2022). Além disso, a microbiota de diferentes sítios corporais dos bovinos, como úbere, nariz e boca, compartilha um número significativo de microrganismos com o leite ao longo da lactação, o que revela uma transmissão intracorporal persistente e reforça a importância de práticas de manejo para saúde mamária (MARIADASSOU *et al.*, 2023). Durante a ordenha, micro-organismos presentes na pele do teto e resíduos ambientais aderidos podem ser arrastados para o fluxo de leite por contato direto ou pela ação dos copos de ordenha, contribuindo substancialmente para a carga microbiana inicial do leite armazenado.

A higiene pré-ordenha representa um ponto crucial para controlar a carga microbiana no leite cru, pois a desinfecção dos tetos antes da ordenha reduz significativamente a presença de microrganismos na pele, limitando a transferência para o leite. Em propriedades leiteiras brasileiras, estratégias de higienização de teteiras com cloro demonstraram redução relevante na contagem de bactérias (MAIA *et al.*, 2016). Além disso, a tipologia de manejo da ordenha também foi identificada como fator de risco para a mastite subclínica, com ECN sendo um dos agentes prevalentes nos rebanhos analisados. A relevância desta prática sanitária é reforçada quando se considera que ECN são frequentemente isolados em glândulas mamárias subclínicamente infectadas em rebanhos brasileiros e estão ligados à saúde do úbere e à contaminação do leite (VEIGA DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

Contudo, mesmo com uma higiene pré-ordenha rigorosa, a contaminação pode persistir e se agravar se os equipamentos de ordenha não forem limpos e mantidos adequadamente. Resíduos de leite e umidade nas tubulações e coletores favorecem a formação de biofilmes, que permitem a sobrevivência e proliferação de bactérias mesmo após a limpeza rotineira. Em laboratório e em fazendas leiteiras, foi observado que cepas de *Staphylococcus epidermidis* e outros microrganismos aderem fortemente aos componentes do sistema de

ordenha, constituindo biofilmes estáveis e difíceis de remover. Essa colonização representa um reservatório constante, capaz de contaminar sucessivos lotes de leite, independentemente da condição de saúde individual dos animais (CHAGAS *et al.*, 2017). No Brasil, estudos com microrganismos isolados em salas de ordenha mostraram que esses biofilmes apresentam alto grau de resistência a desinfetantes, sendo necessários protocolos rigorosos de limpeza, com uso de agentes eficazes e alternância para prevenir a persistência bacteriana (SANTOS *et al.*, 2023). A remoção desses biofilmes requer não apenas a ação mecânica intensiva, mas também monitoramento ambiental frequente nas superfícies internas das linhas, tanques e coletores, visando à detecção precoce de pontos críticos e à manutenção de condições sanitárias seguras para a qualidade do leite.

Além das práticas de ordenha, fatores ambientais exercem influência marcante sobre a qualidade microbiana do leite cru nas propriedades brasileiras. Um estudo realizado em Minas Gerais verificou correlação entre variações sazonais de temperatura, pluviosidade e umidade relativa com o aumento da Contagem Bacteriana Total (CBT) e da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite de tanques de refrigeração (PICININ *et al.*, 2019). Em outra pesquisa na mesma região (Alto Paranaíba, MG), observou-se que os teores de gordura, proteína e sólidos do leite mudam conforme a estação do ano, e que CCS e CBT também variam entre períodos de águas e seca, indicando que as condições climáticas fortalecem a contaminação ambiental (SILVA, 2019). Além disso, dados de uma fazenda em Patos de Minas mostraram que no verão a CCS alcançou valores mais altos, enquanto no inverno a CBT diminuiu, o que reforça a necessidade de ajustar o manejo sanitário e a ordenha de acordo com a estação para manter a qualidade do leite (GOMES *et al.*, 2023).

2.2.5. Fontes comuns de contaminação

A qualidade higiênico-sanitária na produção de queijos artesanais é diretamente condicionada às fontes de contaminação presentes tanto no leite cru quanto no ambiente de processamento, sendo os ECN um dos grupos mais frequentemente identificados nesse contexto. Esses microrganismos apresentam elevada capacidade de sobrevivência em superfícies utilizadas na produção, sobretudo devido ao potencial de formar biofilmes persistentes que resistem à limpeza e à sanitização inadequadas (PEREIRA *et al.*, 2021). No leite cru, os ECN podem ser introduzidos principalmente a partir do úbere, uma vez que representam importantes agentes de mastite subclínica nos rebanhos brasileiros e podem contaminar o leite mesmo na

ausência de sinais clínicos evidentes, mantendo elevada circulação nas propriedades leiteiras. Além disso, estudos nacionais mostram que falhas no manejo da ordenha e no controle higiênico do ambiente favorecem tanto a presença quanto a persistência desses microrganismos, repercutindo diretamente na qualidade do leite utilizado na fabricação de queijos artesanais (GONÇALVES, 2020).

Além da matéria-prima, pontos estruturais das queijarias podem atuar como reservatórios microbianos. Fissuras em pisos, cantos de difícil higienização, ventilação inadequada e superfícies porosas favorecem a aderência bacteriana e a formação de biofilmes, permitindo a persistência de estafilococos e outros contaminantes mesmo após procedimentos de limpeza (SANTOS *et al.*, 2023). Superfícies porosas como madeira e materiais deteriorados são especialmente críticas, pois acumulam umidade e resíduos orgânicos, o que contribui para a maturação de biofilmes e a recontaminação do ambiente. Estudos realizados em queijarias que produzem queijo artesanal de leite de vaca demonstram que utensílios e áreas estruturais mal higienizadas podem atuar como fontes importantes de contaminação ambiental, interferindo na qualidade microbiológica final (VALENTE, 2022).

O pingó, utilizado como fermento endógeno na produção de queijos artesanais, apresenta composição microbiana variável entre produtores e lotes, o que influencia diretamente a qualidade higiênico-sanitária do processo. Embora seja desejável que essa cultura natural seja dominada por bactérias láticas responsáveis pela fermentação, estudos mostram que o pingó também pode carregar microrganismos indesejáveis, incluindo estafilococos, que podem ser introduzidos a partir do ambiente de ordenha, utensílios ou manejo inadequado. A presença desses contaminantes evidencia que, sem monitoramento microbiológico contínuo, o pingó pode atuar como veículo de disseminação de microrganismos ao longo da produção, afetando tanto a segurança quanto o desempenho fermentativo do queijo (ISIDÓRIO; HOFFMANN, 2019).

Além das vulnerabilidades associadas ao pingó e às estruturas físicas das queijarias, os utensílios utilizados ao longo do processamento, como formas, panos de dessoragem, mesas, baldes e superfícies de contato alimentar, representam um elo igualmente crítico na dinâmica de contaminação. Assim como ocorre nos pisos, cantos e demais áreas de difícil higienização, pequenas fissuras, porosidades e acúmulos de resíduos nesses utensílios criam microambientes favoráveis à adesão e persistência de bactérias. Em indústrias de laticínios brasileiras, já se verificou que espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo cepas coagulase-negativa, são

capazes de formar biofilmes em superfícies como aço inoxidável e plástico, reduzindo significativamente a eficiência dos procedimentos de limpeza e tornando tais locais potenciais reservatórios de contaminação cruzada durante a produção do queijo (SIQUEIRA *et al.*, 2021).

Esse risco se intensifica quando as práticas de manipulação não seguem protocolos rigorosos. O fluxo de trabalho, a sequência das etapas e principalmente a higiene das mãos dos trabalhadores exercem influência direta sobre a carga microbiana do ambiente. Pesquisas brasileiras indicam que manipuladores frequentemente carregam *Staphylococcus* na pele, tornando a higienização insuficiente das mãos um fator determinante para a transferência desses microrganismos para superfícies e utensílios, perpetuando a contaminação ao longo das etapas de processamento (DA SILVA; DOS SANTOS; VIANA, 2020). Assim, a qualidade higiênico-sanitária do queijo artesanal depende não apenas das condições estruturais e da microbiota do pingo, mas também do manejo cuidadoso dos utensílios e da atuação dos manipuladores, que constituem pontos-chave para a interrupção dos ciclos de recontaminação no ambiente produtivo.

2.2.6. Práticas de higiene e segurança do alimento

A adoção de práticas de higiene e segurança ao longo da cadeia produtiva do queijo artesanal é fundamental para reduzir a entrada e a persistência de microrganismos, incluindo ECN. No nível da fazenda, as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) estabelecidas pela Instrução Normativa nº 73/2019 do MAPA, que regulamenta critérios de produção de leite cru refrigerado, reforçam a necessidade de higienização prévia dos tetos, adequada vedação pós-ordenha, manejo efetivo de mastite e descarte obrigatório do leite de vacas com suspeita clínica ou subclínica. A norma também exige o uso de água de qualidade comprovada, reforçando a importância do monitoramento microbiológico desse insumo. Essas diretrizes são complementadas por materiais técnicos da Embrapa, que destacam que falhas na limpeza dos tetos e no manejo de mastite subclínica aumentam significativamente o risco de ECN no leite cru, já que esses microrganismos são comumente isolados de úberes e lesões mamárias (BRASIL, 2019).

No contexto do queijo artesanal, o controle do leite cru e do pingo é determinante para minimizar contaminações acumuladas entre lotes. A realização de testes periódicos do leite, como CCS, CBT e provas rápidas para resíduos ou mastite subclínica, ajuda a identificar precocemente riscos sanitários. Quanto ao pingo, estudos mostram que sua microbiota pode

variar significativamente entre produtores e regiões, o que influencia o perfil sensorial e fermentativo do queijo; essa variabilidade reforça a necessidade de avaliação microbiológica regular e de boas práticas de manuseio do pingo para prevenir alterações indesejadas (PINEDA *et al.*, 2021). Além disso, práticas tradicionais consolidadas na região, como a limitação do intervalo entre ordenha e processamento, idealmente inferior a duas horas, contribuem para evitar multiplicação microbiana excessiva antes da fabricação (EMBRAPA, 2020).

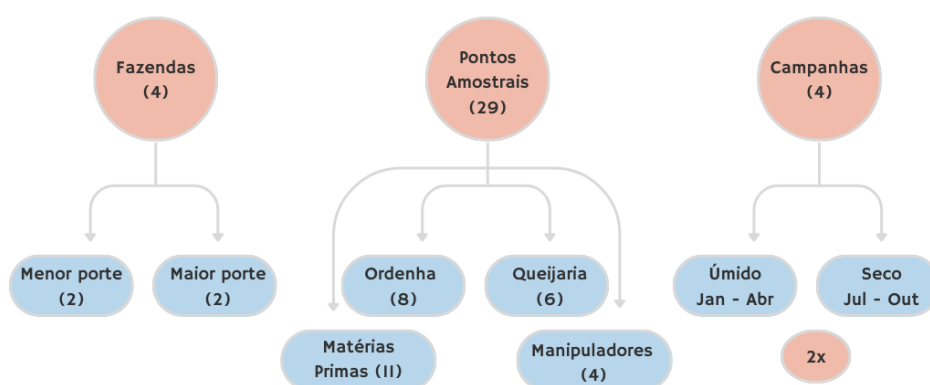
A implementação de estratégias específicas para redução de ECN e biofilmes nas queijarias envolve rotinas robustas de sanitização, combinando ação mecânica eficiente com o uso de sanitizantes adequados. Estudos demonstram que biofilmes formados por estafilococos podem apresentar elevada resistência a agentes químicos isolados, razão pela qual a alternância periódica entre sanitizantes, como clorados, alcalinos e peracéticos, aumenta a eficácia da remoção e evita seleção de cepas mais tolerantes (SIQUEIRA *et al.*, 2021; OLIVEIRA, 2021). A amostragem ambiental rotineira, incluindo superfícies, utensílios, panos, água e mãos de manipuladores, constitui uma ferramenta de verificação essencial, permitindo identificar pontos críticos de persistência e ajustar protocolos de limpeza. Outro componente central é a formação continuada dos trabalhadores, uma vez que a higienização inadequada das mãos e desvios no fluxo de trabalho são fatores reconhecidamente associados à transferência direta de microrganismos durante as etapas de fabricação. Embora os biofilmes representem um desafio tecnológico, sua ocorrência pode ser substancialmente reduzida quando há padronização de procedimentos de limpeza, checagem sistemática da eficácia dos sanitizantes e cultura organizacional voltada à segurança dos alimentos (MIRANDA *et al.*, 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do estudo e descrição das propriedades

O delineamento experimental foi estruturado para contemplar 29 pontos amostrais nos ambientes de ordenha e de produção de queijo de quatro queijarias regularizadas para a fabricação do Queijo Minas Artesanal da Canastra (QMAC), todas aprovadas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). As coletas foram realizadas em quatro campanhas semestrais nos anos de 2024 e 2025, conforme apresentado na Figura 2. Entre os empreendimentos avaliados, dois foram classificados como de pequeno porte, com produção de até 25 peças de queijo por dia, e dois como de grande porte, com produção superior a 40 peças diárias.

Figura 2 - Esquema do delineamento amostral.



Fonte: Autora (2024).

As coletas foram realizadas durante as ordenhas matutinas, entre 5 e 8 horas da manhã, nos meses de fevereiro, março e abril e, posteriormente, em julho, agosto e setembro de 2024 e 2025. Dessa forma, foram contempladas as características sazonais dos períodos Úmido e Seco. Os animais não receberam nenhum tipo de fármaco antimicrobiano por, no mínimo, 30 dias antes das coletas.

As coletas realizadas neste estudo integraram uma ação conjunta com outro projeto de pesquisa desenvolvido pela Universidade de São Paulo (USP), sob responsabilidade da doutoranda Talita Gomes da Costa, que também atuou como coorientadora deste estudo. Essa parceria possibilitou a realização simultânea das amostragens nos mesmos estabelecimentos e períodos, otimizando os procedimentos de campo e assegurando a padronização metodológica entre os estudos, embora cada pesquisa mantenha objetivos analíticos independentes. E, em

razão dessa colaboração, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) adotado fundamentou eticamente o desenvolvimento de ambos os trabalhos.

O estudo foi conduzido sem a realização de intervenções, danos ou eutanásia de animais, não sendo necessária a apreciação por comitê de ética animal. Ainda assim, a coleta ocorreu mediante autorização prévia dos proprietários. A pesquisa atendeu às diretrizes éticas das Resoluções CNS nº 466/2012 e nº 441/2011, respeitando os princípios éticos fundamentais. Os participantes humanos foram informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo e somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram realizadas as coletas de *swabs* nasofaríngeos e das mãos.

3.2. Estratégia de amostragem e pontos analisados

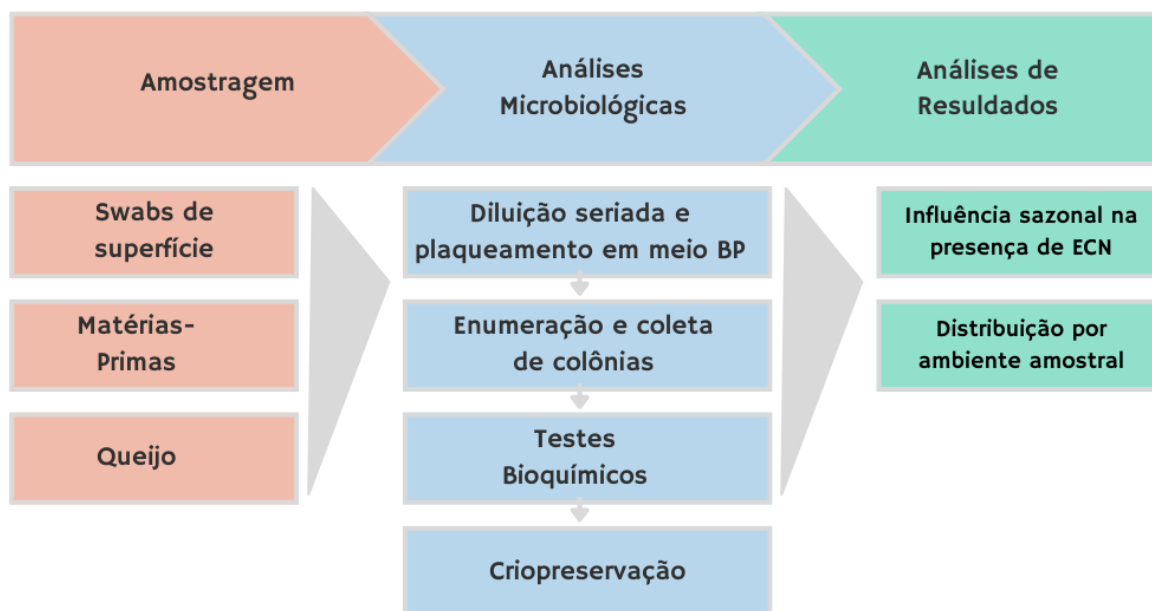
No ambiente de ordenha, utilizou-se *swabs* estéreis para coleta de diferentes superfícies e matrizes, incluindo fossas nasais e mãos do ordenhador antes do contato com os animais, piso do box de ordenha, copos da ordenhadeira e epitélio dos tetos de seis vacas. Para os tetos, primeiramente foram coletados *swabs* da superfície ainda suja. Em seguida, procedeu-se à higienização com álcool 70% aplicado por jatos, seguida de secagem com papel toalha esterilizado, com o intuito de diminuir a carga microbiana. Após essa limpeza, realizou-se o teste da caneca de fundo preto para avaliar a presença de mastite clínica. Animais em tratamento ou com sinais clínicos foram excluídos da seleção. Posteriormente, amostras individuais de leite foram obtidas em tubos estéreis contendo 15 mL provenientes de cada animal.

Na área de processamento, as coletas envolveram *swabs* estéreis aplicados em superfícies críticas ao longo da cadeia produtiva, como o tanque de massa vazio, o ponto de entrada do leite na queijaria, as fossas nasais e as mãos do queijeiro antes do início das atividades, bem como utensílios e estruturas como bancada de produção, faca de corte, tábua de maturação e coletor de pingo. Amostras líquidas de pingo, da água utilizada na higienização dos queijos e do leite integral do tanque foram coletadas em tubos esterilizados com capacidade para 15 mL. Também foram recolhidas peças de queijo com três e quatorze dias de maturação.

As vacas selecionadas pertenciam majoritariamente ao grupo genético Girolando, em variados graus de cruzamento entre Gir e Holandês, além de exemplares da raça Jersey e de animais mestiços. Todas as amostras foram imediatamente acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (gelox), mantidas a aproximadamente 4 °C, e

transportadas ao Laboratório de Pesquisa Multiusuário do IFMG - *Campus Bambuí* para análise. O fluxograma abaixo apresenta as etapas metodológicas (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma de trabalho.



Fonte: Autora (2024).

3.3. Meios de cultura e testes utilizados

O processo iniciou-se com o plaqueamento das amostras, seguido de uma estria de esgotamento a fim de isolar colônias sugestivas de *Staphylococcus*. Após a obtenção das colônias puras, elas foram submetidas ao teste de catalase e posteriormente, elas passaram por uma prova de coloração de Gram para classificação, e, por fim, à prova de coagulase lenta com plasma de coelho para descarte da presença de ECP e detecção de ECN.

3.3.1. Plaqueamento em Baird-Parker

A detecção de colônias sugestivas de *Staphylococcus* foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que recomenda a sementeira em ágar Baird-Parker (Brasil, 2003). Para o plaqueamento, as amostras foram submetidas a diluições seriadas em solução salina 0,85% e plaqueadas em duplicata no meio ágar Baird-Parker (Difco, EUA), enriquecido com emulsão de telurito e gema de ovo. Para a quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) típicas, 0,1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura, incubadas em

aerobiose a 37 °C por 48 a 72 horas, condições consideradas ideais para o crescimento dos microrganismos-alvo. A técnica empregada foi Spread Plate, com diluições seriadas realizadas até 10^{-4} em solução salina 0,85%. As amostras líquidas (leite, pingo e água) foram plaqueadas diretamente utilizando-se 0,1 mL de inóculo. Para as amostras sólidas (queijo com três e quatorze dias de maturação), procedeu-se ao quarteamento e homogeneização: 25 g de amostra foram misturados a 225 mL de água peptonada a 0,1% (Oxoid, Inglaterra), obtendo-se uma diluição inicial de 1:10, a partir da qual foram preparadas as diluições subsequentes para o plaqueamento.

3.3.2. Estria em ágar nutriente

Essa etapa consistiu na seleção de cinco colônias pretas, redondas, com ausência de halo de degradação, na qual cada colônia selecionada foi submetida à técnica de estria de esgotamento em Ágar Nutriente (Difco, EUA), um meio não seletivo utilizado para recuperação e purificação de microrganismos. As placas foram incubadas em condições de aerobiose, a 37 °C por 24 horas, visando gerar colônias bem isoladas a partir de uma única célula ou pequeno agrupamento celular. Para a semeadura, empregou-se uma alça bacteriológica previamente esterilizada, que foi suavemente deslizada sobre a superfície do meio, distribuindo uma quantidade controlada de células.

3.3.3. Teste da catalase e Coloração de Gram

Após 24 horas de crescimento em Ágar Nutriente, as colônias foram submetidas ao teste de catalase. A avaliação foi realizada utilizando uma alça calibrada esterilizada para coletar uma pequena porção da colônia e transferi-la para o reagente. Para o procedimento, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em solução aquosa foi previamente depositada sobre uma lâmina de vidro limpa e seca. Em seguida, a porção da colônia isolada foi cuidadosamente espalhada sobre a gota do reagente. A enzima catalase, quando presente, promove a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sendo a liberação de oxigênio visualizada pela formação imediata de bolhas na superfície da mistura, positivando o teste (IWASE *et al.* 2013).

A técnica para classificação de cocos em cachos Gram-positivo (MACFADDIN, 1976; APHA, 2001) inicia-se com a preparação adequada do esfregaço, em seguida, o esfregaço é coberto com violeta-de-metila, permanecendo em contato com o corante por cerca de 1 minuto.

O excesso é então escoado, e a lâmina lavada suavemente em filete de água destilada corrente para remover o corante não aderido.

A etapa seguinte consiste na aplicação do lugol, que atua como mordente, fixando o complexo cristal violeta-iodo na parede celular. O reagente permanece sobre o esfregão por aproximadamente 1 minuto, sendo novamente escoado e lavado em água corrente. Para a descoloração, aplica-se álcool etílico (99,5° GL) até que cessado o desprendimento do corante. Após nova lavagem em água corrente, procede-se à aplicação da safranina, mantida por cerca de 1 minuto, que funciona como corante de contraste. O esfregão é então lavado mais uma vez e deixado secar ao ar. Após a secagem, realiza-se a análise ao microscópio utilizando objetiva de 100× com óleo de imersão, a fim de confirmar a coloração Gram-positiva e verificar a morfologia típica de cocos dispostos em cachos.

3.3.4. *Teste de coagulase*

Inicialmente, uma colônia isolada foi repicada das placas estriadas, utilizando uma alça calibrada, para um tubo de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco, EUA). O cultivo foi incubado por um período de 18 a 24 horas, a 37 °C, e dentro dessa janela de crescimento, os isolados foram submetidos à prova de coagulase lenta com plasma de coelho, utilizando Coagu-Plasma liofilizado (Interlab, EUA) reidratado com solução salina a 0,85%. O plasma reidratado foi distribuído em tubos de ensaio e sobreposto com a cultura bacteriana. Os tubos foram incubados a 37 °C, e a observação para formação de coágulo foi realizada periodicamente, geralmente às 4 e 24 horas pós-inoculação (MACFADDIN, 1976; APHA, 2001). A reação é considerada positiva quando há formação de um coágulo firme que resiste à inversão do tubo, ou seja, que não se desfaz ao inclinar ou agitar levemente, indicando a produção de coagulase livre e/ou ligada.

Por outro lado, a ausência de coagulação até 24 horas, ou a formação de um coágulo instável (que se desfaz com agitação), é interpretada como reação negativa, sendo o resultado esperado para o grupo *Estafilococos Coagulase-Negativos* (MACFADDIN, 1976; APHA, 2001).

3.4. Análise e interpretação dos dados

Após a confirmação bioquímica das cepas identificadas como *Estafilococos Coagulase-Negativos*, as culturas foram criopreservadas para garantir integridade fenotípica e genotípica durante as análises subsequentes. A partir daí, estruturou-se uma matriz binária

(presença = 1 / ausência = 0) com 29 pontos amostrais por observação, totalizando 16 observações por ponto (4 queijarias x 4 visitas). Essa formatação permitiu a aplicação de métodos de frequência simples (somas e prevalências por ponto), além de testes de independência (qui-quadrado) para comparação entre queijarias e, posteriormente, a construção de um *dataset* sem o efeito de queijaria/estação (remoção dos pontos estatisticamente discrepantes e recodificação das 16 linhas como R1-R16), possibilitando análises de relações ponto-a-ponto e por grupos funcionais (superfícies, epitélios, orgânicos)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das Propriedades

Os estabelecimentos situam-se nas proximidades dos municípios de São Roque de Minas e Medeiros, no estado de Minas Gerais, Brasil, sendo acessados unicamente por vias não pavimentadas. Os produtores habitam as fazendas e têm a fabricação de queijo como uma das principais fontes de renda dos estabelecimentos. Durante as visitas, foram conduzidas entrevistas com os responsáveis pelas fazendas, visando obter informações sobre as características das propriedades, composição do rebanho, sistema de ordenha e demais aspectos relevantes, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização geral das quatro fazendas produtoras de QMAC.

Característica avaliada	Fazenda 1	Fazenda 2	Fazenda 3	Fazenda 4
Município (MG)	São Roque de Minas / Medeiros	São Roque de Minas / Medeiros	São Roque de Minas / Medeiros	São Roque de Minas / Medeiros
Tipo de acesso	Estrada de terra	Estrada de terra	Estrada de terra	Estrada de terra
Sistema de manejo	Semiextensivo	Semiextensivo	Semiextensivo	Semiextensivo
Tipo de ordenha	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica
Nº de conjuntos de teteiras	3-6	3-6	3-6	3-6
Sessões diárias de ordenha	1-2	1-2	1-2	1-2
Sistema de ordenha em fosso	Sim	Sim	Não	Não
Cobertura do curral	Sim	Sim	Sim	Sim
Laterais do curral	Fechadas	Abertas	Abertas	Abertas
Piso do curral	Cimentado	Cimentado	Cimentado	Cimentado
Piso da sala de espera	Não pavimentado	Cimentado	Cimentado	Não pavimentado

Conformidade da sala de espera	Não conforme	Conforme	Conforme	Não conforme
Uso de vestimenta completa na ordenha	Sim	Não	Não	Não
Higienização das mãos	Sim	Sim	Sim	Sim
Diagnóstico de mastite	Caneca de fundo preto	Caneca de fundo preto	Caneca de fundo preto	Caneca de fundo preto
Água clorada	Sim	Sim	Sim	Sim
Material do tanque de produção	Aço inoxidável	-	-	Aço inoxidável
Material da bancada de produção	Madeira	Inox	Inox	Granito
Conformidade da bancada	Não conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Responsável pela produção do queijo	Família	Funcionários	Família	Funcionários
Uso de máscara pelos queijeiros	Não	Sim	Sim	Não

Fonte: Autora (2025)

Legenda: Caracterização das quatro fazendas produtoras de Queijo Minas Artesanal da Canastra quanto à localização, estrutura, manejo, práticas de ordenha e conformidade com as Portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), a partir de entrevistas e observações realizadas durante as visitas técnicas.

As queijarias dos estabelecimentos apresentam características estruturais conformes às regulamentações das Portarias da IMA n.º 818/2006 e n.º 518/2002. Dispõem de paredes e piso revestidos com material cerâmico, telamento nas entradas, iluminação satisfatória, ventilação apropriada, cercamentos que impedem o acesso de animais, e setores específicos com lavatórios para higienização das mãos. As instalações sanitárias localizam-se adjacentes às queijarias, porém sem comunicação direta com elas, e incluem área para higienização e troca de vestimentas (MINAS GERAIS, 2018).

O tempo médio decorrido entre o início da ordenha e o início da fabricação dos queijos é de cerca de 40 minutos, mantendo-se dentro do prazo recomendado de até 90 minutos.

O processamento imediato após a ordenha aproveita a temperatura pós-ejeção do leite (aproximadamente 37 °C), que beneficia a ação das enzimas do coalho e dificulta o desenvolvimento de microrganismos contaminantes. Nas queijarias, o leite é recebido através de tubulação fabricada em material atóxico, não oxidável e de fácil higienização, conforme determinado pela Portaria da IMA n.º 518/2002, permanecendo vedada quando não utilizada (MINAS GERAIS, 2018).

Nessas fazendas, o manejo do gado segue o modelo semiextensivo, tendo como base alimentar silagem, braquiária e capim-Mombaça. O processo de ordenha é mecanizado, contando com três a seis conjuntos de teteiras, sendo realizado em uma ou duas etapas diárias, com tempo médio de duas horas. A higienização diária dos conjuntos de teteiras é feita com água aquecida e detergentes ácidos ou alcalino-clorados. Previamente à ordenha, os ordenhadores procedem com a limpeza dos tetos utilizando solução de *pré-dipping* (de diferentes procedências) e papel-toalha para enxugar; posteriormente à ordenha, aplicam soluções de *pós-dipping*. A água empregada nas fazendas passa por processo de cloração, com análises executadas em períodos semestrais ou trimestrais.

Entretanto, constataram-se variações nos materiais das bancadas e tanques de fabricação de massa entre os estabelecimentos. Os tanques dos estabelecimentos 1 e 4 são fabricados em aço inoxidável, ao passo que os dos estabelecimentos 2 e 3 são de material poroso, similar a reservatórios de água, constituindo irregularidade segundo a Portaria IMA n.º 518/2002, que determina superfícies lisas, isentas de frestas ou imperfeições e não porosas. Em relação às bancadas de fabricação, o estabelecimento 1 emprega madeira, enquanto os estabelecimentos 2 e 3 utilizam inox e o estabelecimento 4, granito. Embora a madeira seja autorizada para maturação e o granito polido seja aceitável para a bancada de fabricação, as bancadas de madeira para produção não satisfazem as exigências regulamentares, tornando o estabelecimento 1 irregular nesse quesito (MINAS GERAIS, 2018).

Os currais destinados à ordenha apresentam configurações diversificadas. O estabelecimento 2 possui sistema em fosso, coberto, porém com laterais abertas e pavimentação de concreto tanto no curral quanto na área de espera. No estabelecimento 3, o sistema não inclui fosso, sendo coberto e com laterais abertas, tendo pisos de concreto tanto no curral quanto na área de espera. O estabelecimento 1 dispõe de sistema em fosso, com cobertura, paredes laterais de alvenaria e pavimentação cimentada, porém a área de espera encontra-se descoberta e sem

pavimentação. O estabelecimento 4 apresenta sistema sem fosso, com cobertura, laterais abertas e pavimentação cimentada no curral, área de espera permanece descoberta e não pavimentada.

Todos os estabelecimentos cumprem o estabelecido no artigo 2.º da Portaria IMA n.º 518/2002, que determina pavimento impermeável e revestido de cimento áspero com inclinação para drenagem de água no curral de ordenha. Contudo, os estabelecimentos 1 e 4 mostram inadequações nas salas de espera, que, conforme a mesma Portaria, devem apresentar bom acabamento e pavimento concretado ou revestido com pedras rejuntadas ou blocos de cimento, também com declividade para escoamento (MINAS GERAIS, 2018).

4.2. Presença e distribuição de ECN nos diferentes pontos de amostragem

A investigação da ocorrência de *Estafilococos* Coagulase-Negativos (ECN) foi conduzida em 29 pontos amostrais distribuídos ao longo da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra, abrangendo quatro propriedades registradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). As coletas foram realizadas em dois períodos distintos: estação seca e estação chuvosa, totalizando oito observações por propriedade em cada período por ano, o que resultou em 16 observações por ponto amostral considerando ambas as estações.

Os pontos amostrais investigados incluíram superfícies de contato (bancada de produção do queijo, bocal de saída do leite na queijaria, faca de corte da massa, coletor de pingo (CPG) e tábua de maturação, chão do box de ordenha), epitélios humanos e animais (fossas nasais de ordenhador e queijeiro, mãos do ordenhador e queijeiro, e seis vacas individualmente identificadas), equipamentos (superfície do tanque de produção de massa) e utensílios (copo da teteira mecânica), matérias-primas e produtos intermediários (seis amostras individuais de leite, leite de todos os animais do tanque, pingo e água), além dos produtos finais (queijo com três dias de maturação e queijo com 14 dias de maturação).

A primeira etapa analítica consistiu em avaliar se a sazonalidade climática exercia influência sobre a prevalência de ECN nos diferentes pontos amostrais (Tabela 2). Para tanto, aplicou-se o teste de Fisher para cada um dos 29 pontos, comparando a frequência de presença e ausência de ECN entre a estação seca e a estação chuvosa.

Tabela 2 - Teste de Fisher comparando a presença de ECN entre estação seca e estação chuvosa para cada ponto amostral (n=8 por estação).

Ponto Amostral	Presença Seca	Ausência Seca	Presença Chuva	Ausência Chuva	p-valor
ÁGUA	0	8	0	8	1.000
BANCADA	5	3	7	1	0.582
BOCAL	2	6	4	4	0.628
BOX	4	4	6	2	0.628
COPO ORDENHA	2	6	5	3	0.315
COLETOR DO PINGO	4	4	3	5	1.000
FACA	4	4	8	0	0.087
FOSSA NASAL ORDENHADOR	8	0	8	0	1.000
FOSSA NASAL QUEIJEIRO	7	1	7	1	1.000
LEITE 1	4	4	4	4	1.000
LEITE 2	3	5	3	5	1.000
LEITE 3	4	4	5	3	1.000
LEITE 4	3	5	4	4	1.000
LEITE 5	1	7	5	3	0.119
LEITE 6	4	4	4	4	1.000
PINGO	1	7	3	5	0.582
MÃO ORDENHADOR	8	0	8	0	1.000
MÃO QUEIJEIRO	5	3	6	2	1.000
LEITE TANQUE	8	0	8	0	1.000
TÁBUA MATURAÇÃO	8	0	8	0	1.000
TANQUE PRODUÇÃO	3	5	6	2	0.077
VACA 1	8	0	8	0	1.000
VACA 2	3	5	6	2	0.315
VACA 3	6	2	7	1	1.000
VACA 4	6	2	7	1	1.000
VACA 5	8	0	8	0	1.000
VACA 6	8	0	8	0	1.000
QUEIJO 3 DIAS	8	0	8	0	1.000
QUEIJO 14 DIAS	8	0	8	0	1.000

Fonte: Autora (2025).

Legenda: Teste de Fisher comparando a prevalência de *Estafilococos* Coagulase-Negativos entre estação seca e estação chuvosa para cada ponto amostral da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra. Valores de

$p > 0,05$ indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre as estações. $n = 8$ observações por estação, totalizando 16 observações por ponto amostral.

Os resultados demonstraram que nenhum dos 29 pontos amostrais apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na prevalência de ECN entre as estações Úmida e Seca. Alguns pontos apresentaram valores de p próximos ao limiar de significância, como a faca ($p = 0,087$), o tanque de produção ($p = 0,077$) e o leite individual 5 ($p = 0,119$), sugerindo uma tendência que poderia se tornar significativa com aumento do tamanho amostral. Porém, com o número de observações disponíveis, não foi possível detectar diferenças estatísticas consistentes.

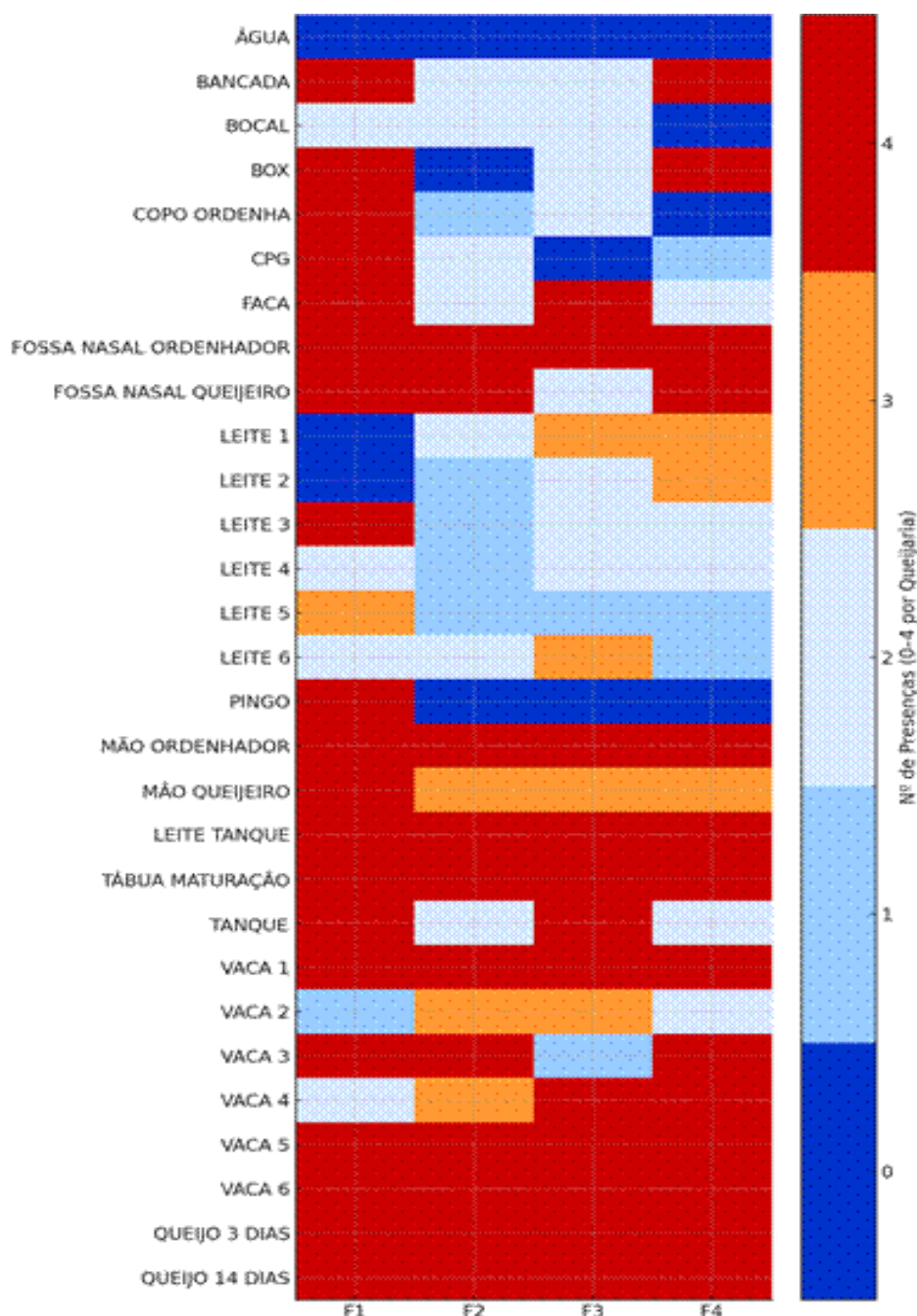
Observou-se que diversos pontos apresentaram prevalência máxima (100% de positividade) em ambas as estações, incluindo fossas nasais de ordenhador e queijeiro, mãos do ordenhador, leite do tanque, tábua de maturação, epitélio dos tetos das vacas, além dos queijos com 3 e 14 dias de maturação. Por outro lado, a água utilizada no processo apresentou ausência total de ECN em todas as amostras coletadas (0/8 em ambas as estações), indicando adequação da qualidade microbiológica da água em relação a este grupo bacteriano.

Em função da ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as estações seca e chuvosa, os dados foram agregados para as análises subsequentes, totalizando 16 observações por ponto amostral. Esta consolidação permitiu aumentar o poder estatístico das análises posteriores e investigar padrões de distribuição de ECN independentemente da sazonalidade.

4.2.1. Distribuição de ECN por ponto amostral: análise descritiva

A Figura 4 apresenta um mapa de calor (*heatmap*) ilustrando a frequência de detecção de ECN em cada ponto amostral ao longo das 16 réplicas consolidadas. A escala cromática varia do azul escuro (ausência total, valor 0) ao vermelho intenso (presença em todas as observações, valor 4 quando consideradas quatro propriedades), passando por tons intermediários de azul claro e laranja.

Figura 4 - *Heatmap* da distribuição de ECN por ponto amostral considerando as 16 réplicas (4 propriedades × 2 estações × 2 coletas).



Fonte: Autora (2025)

Legenda: Mapa de calor (*heatmap*) representando a distribuição de *Estafilococos* Coagulase-Negativos em 29 pontos amostrais da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra ao longo de 16 réplicas independentes (4 propriedades × 2 estações × 2 coletas). A escala cromática varia de azul escuro (0 = ausência em todas as observações) a vermelho intenso (4 = presença máxima quando consideradas as quatro propriedades), passando por azul claro (1), azul muito claro (2) e laranja (3). Cada linha representa um ponto amostral e cada coluna representa uma réplica. Tonalidades mais quentes indicam maior frequência de detecção de ECN.

A análise visual do *heatmap* revela que determinados pontos apresentam positividade consistente e elevada ao longo de todas as observações, enquanto outros demonstram maior variabilidade. Os epitélios humanos (mãos e fossas nasais) e produtos finais (queijos) destacam-se pela tonalidade mais intensa, indicando presença frequente de ECN. As amostras de água mantiveram-se consistentemente negativas, representadas pela coloração azul escuro uniforme. As amostras de leite individual apresentaram padrão heterogêneo, com variação entre as observações, sugerindo que a contaminação do leite não é uniforme entre animais ou momentos de ordenha. Essa constância sugere que tanto a colonização de manipuladores e animais quanto a manutenção de biofilmes ou contaminação ambiental estruturada podem sustentar a presença da ECN na cadeia de produção, independentemente de variações de manejo superficial (FRANÇA, 2023).

4.3. Análise comparativa entre as propriedades

Após a consolidação dos dados das duas estações, procedeu-se à avaliação de diferenças na prevalência de ECN entre as quatro propriedades produtoras (F1, F2, F3 e F4). Para cada um dos 29 pontos amostrais, aplicou-se o teste do qui-quadrado de Pearson para verificar se a distribuição de presença e ausência de ECN diferia significativamente entre as queijarias (Tabela 3).

Tabela 3 - Teste do qui-quadrado comparando a prevalência de ECN entre as quatro propriedades para cada ponto amostral.

Ponto Amostral	p-valor	Interpretação
ÁGUA	1.000	Sem diferença
BANCADA	0.157	Sem diferença
BOCAL	0.421	Sem diferença
BOX	0.026	Diferença significativa
COPO ORDENHA	0.013	Diferença significativa
COLETOR DO PINGO	0.017	Diferença significativa
FACA	0.157	Sem diferença
FOSSA NASAL ORDENHADOR	1.000	Sem diferença
FOSSA NASAL QUEIJEIRO	0.157	Sem diferença
LEITE 1	0.082	Tendência
LEITE 2	0.157	Sem diferença
LEITE 3	0.421	Sem diferença
LEITE 4	0.816	Sem diferença
LEITE 5	0.227	Sem diferença
LEITE 6	0.816	Sem diferença

Ponto Amostral	p-valor	Interpretação
ÁGUA	1.000	Sem diferença
BANCADA	0.157	Sem diferença
BOCAL	0.421	Sem diferença
BOX	0.026	Diferença significativa
PINGO	0.001	Diferença significativa
MÃO ORDENHADOR	1.000	Sem diferença
MÃO QUEIJEIRO	0.816	Sem diferença
LEITE TANQUE	1.000	Sem diferença
TÁBUA MATURAÇÃO	1.000	Sem diferença
TANQUE DE PRODUÇÃO	0.157	Sem diferença
VACA 1	1.000	Sem diferença
VACA 2	0.421	Sem diferença
VACA 3	0.017	Diferença significativa
VACA 4	0.082	Tendência
VACA 5	1.000	Sem diferença
VACA 6	1.000	Sem diferença
QUEIJO 3 DIAS	1.000	Sem diferença
QUEIJO 14 DIAS	1.000	Sem diferença

Fonte: Autora (2025)

Legenda: Teste do qui-quadrado de Pearson comparando a prevalência de *Estafilococos* Coagulase-Negativos entre as quatro propriedades produtoras (F1, F2, F3 e F4) para cada ponto amostral da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra. Valores de $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre propriedades. Valores de p entre 0,05 e 0,10 indicam tendência não significativa estatisticamente. $n = 16$ observações por ponto amostral ($4 \text{ propriedades} \times 2 \text{ estações} \times 2 \text{ coletas}$).

Dos 29 pontos avaliados, apenas cinco apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as propriedades: chão do box de ordenha ($p = 0,026$), copo da teteira mecânica ($p = 0,013$), coletor do pingo ($p = 0,017$), pingo ($p = 0,001$) e o epitélio de uma vaca ($p = 0,017$). Estes pontos demonstraram variabilidade real na prevalência de ECN entre as queijarias, indicando que práticas de manejo específicas, características individuais dos animais ou condições particulares de cada propriedade influenciam a presença deste grupo bacteriano nestes elos da cadeia produtiva.

Dois pontos adicionais apresentaram valores de p entre 0,05 e 0,10 (um leite individual = 0,082 e o epitélio de uma vaca = 0,082), caracterizando uma tendência não significativa estatisticamente, mas biologicamente relevante. Esses resultados sugerem que, com aumento do tamanho amostral, diferenças entre propriedades poderiam emergir também para estes pontos. A maioria dos pontos (24 de 29) não apresentou diferenças significativas

entre as propriedades, indicando que a prevalência de ECN é relativamente homogênea entre as queijarias para a maior parte da cadeia produtiva. Pontos como água, fossas nasais, mãos dos manipuladores, leite do tanque, tábua de maturação e produtos finais (queijos) demonstraram comportamento consistente entre as quatro propriedades avaliadas.

4.3.1. Análise após remoção dos pontos com variação entre propriedades

Considerando que cinco pontos apresentaram diferenças significativas entre propriedades, estes foram removidos das análises subsequentes para permitir a investigação de padrões estruturais de distribuição de ECN independentes do efeito “propriedade”. Permaneceram 24 pontos amostrais considerados homogêneos entre as queijarias, possibilitando a reorganização dos dados em 16 réplicas independentes (R1 a R16), onde cada réplica representa uma observação única sem sazonalidade ou efeito específico de produtor.

Os 24 pontos foram categorizados em três grupos para análises de contingência:

- **Grupo 1 - Superfícies (5 pontos):** bancada, bocal, faca, coletor de pingo e tábua de maturação.
- **Grupo 2 - Epitélios animais e humanos (9 pontos):** fossa nasal do ordenhador, mão do ordenhador, fossa nasal do queijeiro, mão do queijeiro, vaca 1, vaca 2, vaca 4, vaca 5 e vaca 6.
- **Grupo 3 - Pontos orgânicos (10 pontos):** leite 1, leite 2, leite 3, leite 4, leite 5, leite 6, leite do tanque, queijos com 3 dias e 14 dias de maturação.

Para investigar se a prevalência de ECN diferia entre os três grupos funcionais (superfícies, epitélios e pontos orgânicos), aplicou-se o teste do qui-quadrado de independência considerando as 16 réplicas. A análise avaliou se existia relação sistemática entre as réplicas e a distribuição de positividade nos três grupos.

O teste resultou em um valor de $p = 0,99984$, indicando ausência total de associação estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado demonstra que as frequências relativas de detecção de ECN nos três grupos são consistentes e proporcionais ao longo das 16 observações, sem que nenhum grupo apresente padrão sistematicamente distinto dos demais.

Para confirmar este achado, realizaram-se testes do qui-quadrado par-a-par comparando os três grupos dois a dois. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Testes do qui-quadrado comparando os três grupos funcionais par-a-par.

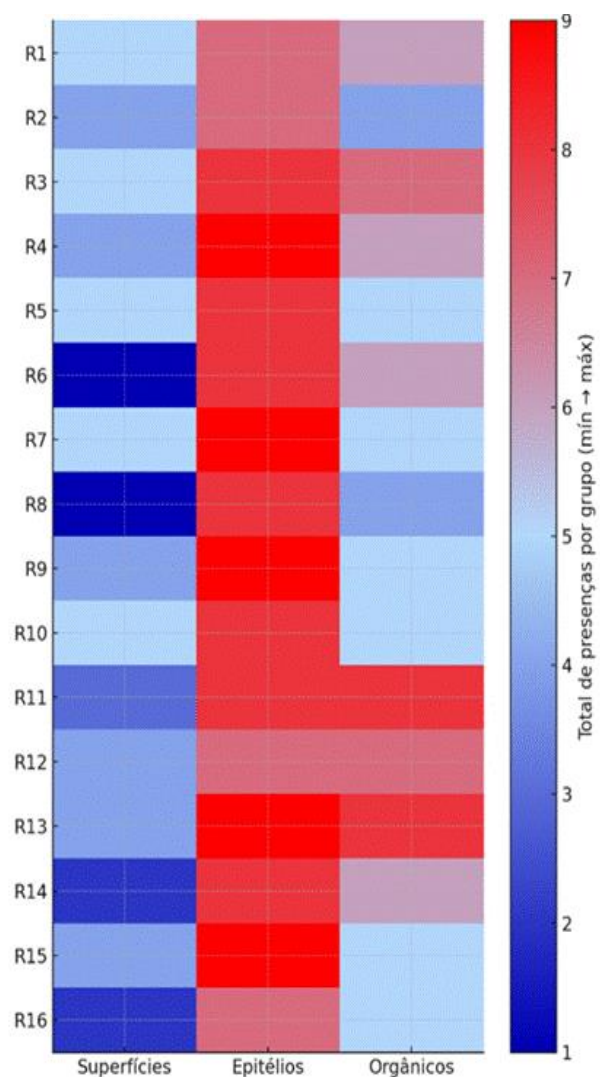
Comparação	p-valor	Interpretação
Superfícies × Epitélios	0.973	Sem diferença
Superfícies × Orgânicos	0.964	Sem diferença
Epitélios × Orgânicos	1.000	Sem diferença

Fonte: Autora (2025)

Legenda: Testes do qui-quadrado comparando a prevalência de *Estafilococos* Coagulase-Negativos entre os três grupos funcionais de pontos amostrais: superfícies (bancada, bocal, faca, coletor de pingo e tábua de maturação), epitélios animais e humanos (fossas nasais e mãos de ordenhador e queijeiro, e vacas 1, 2, 4, 5 e 6), e pontos orgânicos (leites 1 a 6, leite do tanque, queijos com 3 e 14 dias). Análises par-a-par demonstram ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). $n = 16$ réplicas independentes.

Nenhuma das três comparações par-a-par apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), confirmando que a distribuição de ECN é estatisticamente equivalente entre superfícies, epitélios e pontos orgânicos. Este resultado indica que a contaminação por ECN não está concentrada preferencialmente em nenhum tipo específico de matriz ou superfície, mas distribui-se de forma relativamente homogênea ao longo de toda a cadeia produtiva. A Figura 5 apresenta um *heatmap* comparando a frequência média de detecção de ECN nos três grupos funcionais, evidenciando visualmente a similaridade entre eles.

Figura 5 - *Heatmap* da frequência média de detecção de ECN nos três grupos funcionais.



Fonte: Autora (2025)

Legenda: Azul forte = menor, azul caro = intermediário, vermelho = maior. Comparação da frequência média de detecção de *Estafilococos* Coagulase-Negativos entre os três grupos funcionais de pontos amostrais na cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra. Superfícies incluem bancada, bocal, faca, coletor de pingo e tábua de maturação. Epitélios incluem fossas nasais e mãos de ordenhador e queijeiro, além de vacas 1, 2, 4, 5 e 6. Pontos orgânicos incluem leites 1 a 6, leite do tanque, e queijos com 3 e 14 dias de maturação. As barras representam a frequência relativa de positividade em cada grupo. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste do qui-quadrado, $p = 0,99984$).

4.3.2. *Análise de contingência ponto-a-ponto*

Para investigar possíveis relações de coocorrência entre pontos amostrais individuais, construiu-se uma matriz de contingência 24 x 24, totalizando 276 pares possíveis. Para cada par de pontos, aplicou-se o teste do qui-quadrado de independência em tabelas 2x2

(presença x ausência), com o objetivo de identificar se dois pontos tendem a apresentar ECN simultaneamente (coocorrência) ou se comportam-se de forma estatisticamente independente. Da análise de 276 pares de pontos, apenas dois apresentaram associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$):

- **LEITE 1 x LEITE 2 ($p = 0,0098$):** Este par representa amostras consecutivas de leite coletadas durante o mesmo processo de ordenha, de vacas diferentes ou do mesmo conjunto de animais. A associação significativa é biologicamente coerente, uma vez que estas amostras compartilham o mesmo ambiente de coleta, os mesmos equipamentos, o mesmo manipulador e, frequentemente, contaminação cruzada durante a ordenha.
- **COLETOR DE PINGO x FACA ($p = 0,00086$):** Ambos são utensílios utilizados durante a manipulação da massa de queijo, frequentemente manuseados pelo mesmo operador (queijeiro) de forma sequencial. A coocorrência de ECN nestes dois pontos sugere transferência cruzada via mãos do manipulador ou proximidade física durante o processo de fabricação.

Os demais 274 pares de pontos (99,3% do total) apresentaram p-valores $\geq 0,05$, indicando independência estatística entre si. Este resultado demonstra que a maioria dos pontos amostrais não apresenta relação estrutural detectável na presença de ECN, reforçando a interpretação de que a contaminação é difusa e não segue rotas específicas de transferência ao longo da cadeia produtiva.

Diversos pares envolvendo pontos com prevalência invariante (sempre positivos ou sempre negativos) apresentaram p-valores muito elevados ($p \approx 1,0$), o que é esperado quando não há variabilidade nos dados para permitir a detecção de associação. Exemplos incluem pares envolvendo água (sempre negativa), mãos do ordenhador (sempre positivas), leite do tanque (sempre positivo) e queijos (sempre positivos).

5. DISCUSSÃO

A ausência de diferenças estatisticamente significativas na prevalência de *Estafilococos* Coagulase-Negativos (ECN) entre as estações seca e chuvosa em 29 pontos avaliados representa um achado relevante que contrasta com estudos que relatam variações sazonais na microbiota láctica, ao menos no que diz respeito ao grupo de interesse. Oliveira *et al.* (2015) observaram que variações climáticas podem influenciar contagens microbianas em leite bovino, porém evidências em queijos artesanais sugerem que microambientes internos das queijarias podem exercer maior influência sobre a microbiota do que as condições climáticas externas.

No contexto da Serra da Canastra, Campos e colaboradores (2021) mostraram que Boas Práticas de Fabricação (BPF) têm papel mais determinante na qualidade microbiológica de queijos artesanais do que fatores climáticos, reforçando interpretações de que condições internas de produção mitigam variações externas. A regulamentação estadual (MINAS GERAIS, 2002) e a adoção de BPF pelas propriedades registradas no IMA provavelmente contribuem para a estabilidade observada na prevalência de ECN (RESENDE *et al.*, 2010).

A natureza comensal dos ECN, comum em pele e mucosas de humanos e animais, associada à sua capacidade de formar biofilmes e resistir a estresses ambientais (GAJEWSKA; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, 2020) também sustenta sua presença persistente e homogênea ao longo da cadeia produtiva. A identificação de apenas cinco pontos com diferenças significativas entre as quatro propriedades (box, copo de ordenha, CPG, pingo e vaca 3) fornece percepções sobre os elos da cadeia produtiva onde práticas individuais de manejo exercem maior influência sobre a prevalência de ECN.

O chão do box de ordenha representa um ambiente de alta carga microbiana devido ao contato direto com os animais, suas excreções e o acúmulo de matéria orgânica. Brant e colaboradores (2007) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos Minas Artesanal do Serro e identificaram que práticas inadequadas de higienização de instalações de ordenha estavam entre os principais fatores contributivos para altas contagens de microrganismos do gênero *Staphylococcus*. O copo de ordenha, de forma semelhante, constitui ser um utensílio de contato direto com o leite recém-ordenhado, funcionando como interface entre o teto do animal e o recipiente de coleta. Diferenças na prevalência de ECN neste ponto entre propriedades podem estar associadas a variações nos procedimentos de higienização pré e pós-ordenha (DE FILIPPIS *et al.*, 2024).

A ausência de bactérias *Staphylococcus* no pingo, mesmo após sua detecção no coletor, pode sugerir que o próprio ambiente fermentativo do pingo favoreça microrganismos mais adaptados, dificultando sua permanência. A acidificação, a alta densidade de bactérias lácticas e a competição por nutrientes presentes no pingo podem ter contribuído para reduzir esses microrganismos a níveis indetectáveis (CASTRO *et al.*, 2018).

A presença de diferenças significativas para a vaca 3 especificamente, mas não para as demais vacas avaliadas, sugere que características individuais do animal, como saúde do úbere, idade, histórico de mastite subclínica, práticas de higienização pré-ordenha e microbiota cutânea individual, podem influenciar a prevalência de ECN. De Vlieghe e pesquisadores (2012) revisaram extensivamente os fatores associados à mastite bovina por estafilococos e identificaram que variações individuais entre animais, incluindo resposta imunológica, conformação do úbere e microbiota cutânea específica, são determinantes significativos da carga bacteriana transferida ao leite.

Ressalta-se que a maioria dos pontos (24 de 29) não apresentaram diferenças entre propriedades, indicando que, apesar de variações específicas em alguns elos críticos, as queijarias registradas operam sob padrões microbiológicos relativamente similares para a maior parte da cadeia produtiva (RESENDE *et al.*, 2021).

A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos funcionais avaliados (superfícies, epitélios e pontos orgânicos) constitui um dos achados mais relevantes deste estudo, pois indica que a contaminação por ECN não está preferencialmente concentrada em determinados tipos de matriz. Do ponto de vista microbiológico, este padrão de distribuição homogênea é compatível com a natureza ubíqua e oportunista dos *Estafilococos* Coagulase-Negativos, visto que essas bactérias tem a capacidade de formar biofilmes sobre superfícies inertes, de resistir a condições de estresse moderado e de colonizar nichos ecológicos diversos, o que explica sua presença generalizada em toda a cadeia produtiva (GAGLIO *et al.*, 2018; HAMMER *et al.*, 2022).

Reuben e colaboradores (2023) conduziram a primeira síntese global de microbiomas de queijos, analisando dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de 824 amostras de queijos abrangendo 58 tipos de queijos de 16 países. Os autores identificaram que, embora bactérias lácticas predominem nos queijos maturados, ECN e outros microrganismos não-iniciadores distribuem-se amplamente em superfícies, ambientes de produção e produtos finais, compondo o que denominaram “microbioma basal” da produção de queijos. Esse

microbioma basal caracteriza-se por estabilidade temporal e distribuição relativamente homogênea entre diferentes compartimentos da cadeia produtiva (REUBEN *et al.*, 2023).

A similaridade na prevalência entre epitélios e superfícies sugere transferência bidirecional contínua entre manipuladores, animais e equipamentos. As mãos dos ordenhadores e queijeiros, consistentemente positivas para ECN em praticamente todas as observações do presente estudo, funcionam como vetores de dispersão microbiana ao longo do processo produtivo, transferindo microrganismos de sua própria microbiota cutânea para utensílios, superfícies e matérias-primas (LOPES *et al.*, 2023).

A presença de ECN em níveis comparáveis entre pontos orgânicos (leites e queijos) e os demais grupos indica que a incorporação destes microrganismos nas matrizes alimentares é inevitável no contexto da produção artesanal. O leite cru naturalmente contém ECN provenientes da microbiota do úbere, da pele do animal e do ambiente de ordenha. Calasso e colaboradores (2016) estudaram as relações entre microbiota de instalações, cascas e núcleos de queijos durante a fabricação de queijos italianos tradicionais e demonstraram que microrganismos presentes nas superfícies de produção, incluindo ECN, são continuamente transferidos para os produtos em todas as etapas de fabricação e maturação.

A análise de contingência ponto-a-ponto revelou que 274 dos 276 pares avaliados (99,3%) não apresentam associação estatisticamente significativa, indicando que a maioria dos pontos amostrais se comporta de forma independente quanto à presença de ECN. Este achado contrasta com modelos clássicos de transmissão microbiana em cadeias produtivas de alimentos, nos quais frequentemente identificam-se rotas específicas de contaminação a partir de fontes pontuais. A independência estatística entre a maioria dos pares de pontos sugere que a contaminação por ECN não segue trajetórias lineares ou sequenciais ao longo da cadeia produtiva. Em outras palavras, a presença de ECN em um ponto não prediz significativamente sua presença em outro ponto, mesmo quando há proximidade física ou sequência temporal entre eles. Este padrão é compatível com um modelo de contaminação difusa e multifatorial, no qual múltiplas fontes contribuem simultaneamente para a carga microbiana de cada ponto, e não existe um “ponto mestre” que determina a contaminação dos demais.

Johnson e colaboradores (2021) investigaram a variabilidade temporal e espacial do microbioma em instalações de produção de queijos Cheddar e identificaram, de forma semelhante, que a diversidade microbiana varia significativamente entre dias de produção e entre diferentes superfícies, mas sem padrões consistentes de transmissão linear.

A baixa conectividade observada na análise de rede (apenas dois pares significativos) indica ausência de clusters ou agrupamentos microbianos complexos ao longo da cadeia. Este resultado tem implicações práticas importantes: sugere que a eliminação ou redução de ECN em um ponto específico provavelmente não resultará em redução proporcional em outros pontos da cadeia, pois estes não estão fortemente acoplados (LORTAL, 2014) CALASSO et al., 2016).

A associação entre o coletor de pingo e a faca evidencia um microambiente específico: a manipulação da massa de queijo pelo queijeiro. Ambos os utensílios são manuseados simultaneamente ou sequencialmente pelo mesmo operador durante a etapa de corte, mexedura e enformagem da massa. A coocorrência de ECN nestes dois pontos sugere transferência cruzada via mãos contaminadas do manipulador. Galinari e colaboradores (2014) investigaram aspectos microbiológicos de biofilmes em utensílios de madeira utilizados na fabricação de queijos artesanais brasileiros e demonstraram que utensílios manuseados sequencialmente pelo mesmo operador frequentemente compartilham perfis microbianos similares devido à transferência via mãos.

A ausência de associações entre outros pares logicamente esperados, como entre mãos de manipuladores e superfícies que eles tocam, ou entre leite cru e queijo final, reforça a interpretação de que o ecossistema de ECN nas queijarias é resiliente e multidirecional. Ademais, um padrão notável observado foi a presença de pontos com prevalência invariante ou quase invariante ao longo de todas as observações. Diversos pontos apresentaram positividade de 100% (16/16 observações), incluindo fossas nasais de ordenhador e queijeiro, mãos do ordenhador, leite do tanque, tábua de maturação, algumas vacas e produtos finais (queijos com 3 e 14 dias). Em contrapartida, a água apresentou ausência total de ECN em todas as amostras. A positividade universal em epitélios humanos e animais é biologicamente esperada e reflete o fato de que os ECN são componentes normais e permanentes da microbiota da pele e mucosas de mamíferos (OTTO, 2009).

A presença invariável de ECN no leite do tanque indica que a contaminação do leite cru por estes microrganismos é inevitável no contexto da produção artesanal. O leite, ao ser ordenhado manualmente e armazenado em recipientes não estéreis, incorpora naturalmente microrganismos da microbiota do úbere, da pele do animal, das mãos do ordenhador e dos utensílios. De Vlieghe e colaboradores (2012) demonstraram que *Estafilococos Coagulase-Negativos* são os microrganismos mais frequentemente isolados de casos de mastite subclínica

bovina, estando presentes em níveis variáveis na maioria das amostras de leite cru, mesmo provenientes de animais clinicamente saudáveis.

A positividade universal nos produtos finais (queijos com 3 e 14 dias de maturação) indica que os ECN sobrevivem e possivelmente se multiplicam durante o processo de fabricação e maturação inicial. Este achado é compatível com a natureza halotolerante e acidotolerante deste grupo bacteriano, que resiste às condições de pH reduzido (em torno de 4,8-5,2) e concentração salina moderadas características dos queijos (PLACE *et al.*, 2003; PINEDA *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos neste estudo têm implicações diretas para o controle de qualidade e segurança do alimento na produção de Queijo Minas Artesanal da Canastra. A primeira e mais relevante implicação é a constatação de que não existe um único ponto crítico de controle (PCC) claramente identificável como determinante da presença de ECN na cadeia produtiva (BARBOSA *et al.*, 2012). A distribuição difusa e homogênea destes microrganismos, a ausência de rotas estruturadas de transmissão e a presença em níveis comparáveis em diferentes tipos de matriz indicam que estratégias de controle devem ser amplas, sistêmicas e contínuas, e não focalizadas em pontos isolados.

A ausência de diferenças sazonais sugere que protocolos de controle microbiológico não necessitam ser ajustados conforme a estação do ano, simplificando o gerenciamento da qualidade. No entanto, vigilância contínua é recomendada para detectar eventuais flutuações não capturadas neste estudo. Kamimura e colaboradores (2019) avaliaram características microbiológicas de queijos Canastra durante fabricação e maturação e identificaram que, embora parâmetros microbiológicos regulamentares possam ser atingidos antes de 22 dias de maturação, a implementação consistente de Boas Práticas de Fabricação ao longo do ano é essencial para garantir segurança microbiológica.

A presença universal de ECN em epitélios humanos e animais indica que a eliminação completa destes microrganismos é impraticável e provavelmente indesejável no contexto da produção artesanal. A estratégia de controle, portanto, não deve visar a ausência absoluta de ECN, mas sim a manutenção de níveis compatíveis com a segurança do produto e a minimização de espécies potencialmente toxigênicas (COTON *et al.*, 2010).

Este estudo fornece um panorama abrangente da distribuição de ECN na cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra, baseado em amostragem sistemática de 29

pontos ao longo de dois períodos sazonais em quatro propriedades registradas. No entanto, algumas limitações devem ser reconhecidas e consideradas na interpretação dos resultados.

Primeiramente, o tamanho amostral ($n=8$ por estação, totalizando 16 observações consolidadas) é adequado para detectar diferenças moderadas a grandes, mas pode não ter poder estatístico suficiente para identificar variações sutis. Em segundo lugar, este estudo focou na presença/ausência de ECN como grupo taxonômico amplo, sem caracterização em nível de espécie ou avaliação de propriedades funcionais das cepas. Os *Estafilococos Coagulase-Negativos* compreendem diversas espécies com características ecológicas, tecnológicas e de segurança distintas (DOGAN *et al.*, 2016).

Terceiro, este estudo foi conduzido exclusivamente em propriedades registradas no IMA, que operam sob regulamentação específica e implementam boas práticas de fabricação. Os resultados podem não ser generalizáveis para produtores não registrados ou para outras regiões produtoras de queijos artesanais com práticas de manejo distintas. Resende (2010) comparou características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Artesanal da Serra da Canastra de propriedades registradas e não registradas, identificando diferenças significativas na qualidade microbiológica entre os dois grupos. E, por fim, a interpretação funcional da presença de ECN na cadeia produtiva requer estudos adicionais integrando microbiologia, bioquímica, análise sensorial, metagenômicas e metabolômicas. É fundamental compreender se e como as cepas de ECN presentes contribuem para características desejáveis do queijo (sabor, aroma, textura), para a inibição de patógenos por competição ou produção de bacteriocinas, ou se representam riscos à segurança do alimento pela eventual produção de toxinas.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação da ocorrência e distribuição de *Estafilococos* Coagulase-Negativos em microambientes da produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra revelou um padrão de contaminação difusa, estável e amplamente distribuída ao longo de toda a cadeia produtiva. A ausência de diferenças sazonais, a homogeneidade entre a maioria dos pontos amostrais nas diferentes propriedades, a distribuição equivalente entre superfícies, epitélios e pontos orgânicos, e a baixa conectividade na análise de rede indicam que os ECN constituem um microbioma basal e resiliente do sistema produtivo artesanal, e não contaminantes pontuais ou transitórios.

Este padrão de distribuição tem implicações importantes para estratégias de controle de qualidade, indicando que intervenções devem ser amplas, sistêmicas e baseadas em boas práticas de fabricação continuamente aplicadas, em vez de focalizadas em pontos críticos isolados. Os cinco pontos que apresentaram variação entre propriedades (box, copo de ordenha, CPG, pingo e vaca 3) representam áreas de oportunidade para melhorias específicas de manejo.

A presença consistente de ECN em epitélios humanos e animais, produtos finais e equipamentos de madeira sugere que estes microrganismos são elementos estruturais do ecossistema de produção de queijos artesanais. Os resultados contribuem para a compreensão do ecossistema microbiano dos queijos artesanais tradicionais e fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle que equilibrem segurança do alimento e preservação das características sensoriais e culturais destes produtos.

Estudos futuros focando na caracterização funcional das cepas de ECN presentes, em seu papel tecnológico na maturação do queijo, e na avaliação de risco microbiológico são necessários para aprofundar o conhecimento sobre este importante componente do microbioma do Queijo Minas Artesanal da Canastra. A conservação do patrimônio cultural imaterial representado pela produção artesanal de queijos mineiros deve ser fundamentada em evidências científicas sólidas que demonstrem a segurança microbiológica do produto quando fabricado sob boas práticas de fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFAIA, C. M. et al. **Assessment of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria isolated from Portuguese dry fermented sausages as potential starters based on their biogenic amine profile.** *Journal of Food Science*, v. 83, n. 10, p. 2544–2549, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252142/>. Acesso em: 8 dez. 2025.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001. 676 p. ISBN 978-0875531755.
- AQUILANTI, L. et al. **Ecology of lactic acid bacteria and coagulase-negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview.** *International Food Research Journal*, v. 23, n. 2, p. 429–445, 2016.
- BARBOSA, R. D. et al. **Boas práticas de fabricação em uma pequena unidade processadora de queijos.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 67, n. 389, p. 55–61, 2012.
- BECKER, K. et al. **Coagulase-negative staphylococci.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BERTUZZI, A. S. et al. **Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese.** *mSystems*, v. 3, n. 1, e00211-17, 2018.
- BJØRLAND, J. et al. **Widespread distribution of disinfectant resistance genes in staphylococci from bulk tank milk.** *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1234083/>. Acesso em: 8 dez. 2025.
- BOJOVIC, M.; MCGREGOR, A. **A review of megatrends in the global dairy sector: what are the socioecological implications?** *Agriculture and Human Values*, v. 40, n. 3, p. 373–394, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10460-022-10338-x>. Acesso em: 2 set. 2025.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. **Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. **Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019.** Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 jul. 2019. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/L13860.htm. Acesso em: 12 nov. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 73, de 21 de dezembro de 2018.** Estabelece critérios para produção de leite cru refrigerado. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br>. Acesso em: 22 nov. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. **Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003.** Oficializa os métodos

analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p.14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em: 22 nov. 2025.

CALASSO, M. et al. **Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant**. Food Microbiology, v. 54, p. 115–126, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002015001938>. Acesso em: 8 dez. 2025.

CAMPOS, A. F. P. et al. **Enterotoxigenic potential of Staphylococcus aureus isolated from artisanal Minas cheese from the Campo das Vertentes region, Brazil**. Food Science and Technology, Campinas, v. 41, supl. 1, p. 369–375, 2021.

CAMPOS, Kátia Aparecida. **Queijo Minas artesanal do Serro de casca florida: micobiota e caracterização físico-química**. 2023. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufla.br/handle/1/57048>. Acesso em: 5 dez. 2025.

CAMPOS, L. M. **Queijo Minas artesanal: produção e identidade cultural na Serra da Canastra**. 2019. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

CASTRO, R. D. de et al. **Caracterização físico-química e microbiológica de queijos Minas Artesanais da microrregião da Canastra, MG**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 71, n. 3, p. 115–124, 2016.

CASTRO, R. D. et al. **Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons**. Journal of Dairy Science, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 2016.

CHAGAS, L. G. da S. et al. **Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from milking equipment and milk samples from cows with mastitis**. Semina: Ciências Agrárias, v. 38, n. 4, p. 1887–1896, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1887>. Acesso em: 8 dez. 2024.

COLARES DE ANDRADE, A. P. et al. **Diversity of Staphylococcus coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, [S. l.], v. 36, n. 1, 2019. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/57553>. Acesso em: 8 dez. 2024.

COSTA, J. da S. et al. **A importância das bactérias ácido lácticas na produção de queijos artesanais: uma revisão.** Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 25, p. e18762, 31 jan. 2025.

COTON, E. et al. **Occurrence of Staphylococcus spp. in cheeses, delicatessen meats and production environments.** International Journal of Food Microbiology, v. 137, n. 2–3, p. 150–155, 2010.

DA SILVA, L. E.; DOS SANTOS, W. S. F.; VIANA, M. G. S. **Análise microbiológica das mãos de manipuladores de alimentos.** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, v. 10, n. 1, p. 15-20, jan.–mar. 2020.

DE FILIPPIS, F. et al. **The microbiome of European dairy products: richness, biodiversity, and functional potential.** Microbiome, v. 12, art. 24, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36811767/>. Acesso em: 23 nov. 2025.

DE VISSCHER, A. et al. **Teat apex colonization with coagulase-negative Staphylococcus species before parturition: distribution and species-specific risk factors.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 3, p. 1427–1439, 2016.

DE VliegHER, S. et al. **Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control.** Journal of Dairy Science, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012.

DELCENSERIE, V. et al. **Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 10, p. 6046–6056, 2014.

DOGAN, B. et al. **Molecular typing of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine milk.** Foodborne Pathogens and Disease, v. 13, n. 1, p. 50–60, 2016.

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

DORES, M. T. **Queijo Minas artesanal: aspectos microbiológicos e físico-químicos durante a maturação.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boas práticas na produção de leite: higiene de ordenha e qualidade microbiológica.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 22 nov. 2025.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Composição do leite.** Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 22 nov. 2025.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Queijos artesanais brasileiros: panoramas e recomendações técnicas.** Brasília, DF: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-artesanais-brasileiros.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2025.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Anuário do leite 2025: produção de leite e as mudanças climáticas**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 16 jan. 2026.

ERGUN, Y. et al. **Distribution of antiseptic resistance genes in staphylococci from dairy herds**. Veterinary Medicine, 2017. Disponível em: <https://vetmed.agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2017/04/04.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2025

FENG, Y. et al. **Antimicrobial resistance and virulence profiles of staphylococci isolated from clinical bovine mastitis**. Frontiers in Microbiology, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1190790/full>. Acesso em: 22 nov. 2025.

FOSTER, T. J. **Staphylococcus**. In: BARON, S. (ed.). Medical microbiology. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1993.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. 2. ed. New York: Springer, 2017.

FRANÇA, A. **O papel dos biofilmes de estafilococos coagulase-negativos na sepse de início tardio: desafios atuais, diagnósticos e terapias emergentes**. Antibiotics, v. 12, art. 554, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/3/554>. Acesso em: 25 nov. 2025.

FRANCISCO, C. S. et al. **Characterization of biofilms and antimicrobial resistance of coagulase-negative Staphylococcus species involved with subclinical mastitis**. Journal of Dairy Research, v. 88, n. 3, p. 319–326, 2021. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/characterization-of-biofilms-and-antimicrobial-resistance-of-coagulasenegative-staphylococcus-species-involved-with-subclinical-mastitis/E498AC4C14870FE7566B1F0237000D84>. Acesso em: 25 nov. 2025.

GAGLIO, R. et al. **Bacterial and yeast initial biofilm formation on different wood typologies applied in dairy production**. Food Microbiology, v. 74, p. 187–195, 2018.

GAJEWSKA, J.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. **Occurrence of coagulase-negative staphylococci in ready-to-eat foods: pathogenicity and antibiotic resistance**. Pathogens, v. 9, n. 9, art. 723, 2020. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Enterotoxigenic-Potential-of-Coagulase-Negative-Chaj%C4%99cka-Wierzchowska-Gajewska/4c5d1aea777b241cb894b991dd8904f90ad313cc>. Acesso em: 25 nov. 2025.

GARABAL, J. I. **Bacterias ácido-lácticas y sus aplicaciones en la elaboración de productos lácteos tradicionales**. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Madrid, v. 47, n. 1, p. 33–48, 2007.

GETAHUN, Y. A. et al. **Coagulase-negative staphylococci from bovine milk: antibiogram profiles and virulent gene detection**. BMC Microbiology, v. 24, n. 1, art. 263, 2024. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-024-03415-0>. Acesso em: 25 nov. 2025.

GOMES, W. S. et al. **Análise sazonal e temporal da qualidade do leite cru em uma fazenda do município de Patos de Minas-MG.** In: Anais do COMEIA, v. 14, p. 108–108, 2023.

GONÇALVES, T. G. **Biofilm production by coagulase-negative Staphylococcus: a review.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 87, e2020, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/8mBqsDbjX3QKKLrVZR9jzzM/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

HAMMER, P.; MÜLLER, W.; KIRCHHOFF, I. **Characterization of coagulase-negative staphylococci and macrococci isolated from cheese.** Journal of Food Protection, v. 85, n. 7, p. 1048–1058, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/362717979_Characterization_of_coagulase-negative_staphylococci_and_macrococci_isolated_from_cheese_in_Germany. Acesso em: 27 nov. 2025.

HEO, S.; LEE, J. H.; JEONG, D. W. **Food-derived coagulase-negative Staphylococcus as starter cultures for fermented foods.** Food Science and Biotechnology, v. 29, n. 8, p. 1023–1035, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7347722/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

INAES - INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDOS E ANÁLISES DO LEITE E DERIVADOS. **Boas práticas de fabricação de queijo Minas artesanal.** Belo Horizonte: INAES, 2011.

INPI; SEBRAE - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Indicações geográficas brasileiras.** Brasília: SEBRAE; INPI, 2016.

IRLINGER, F. et al. **Genome sequence of Staphylococcus equorum subsp. equorum Mu2, isolated from a French smear-ripened cheese.** Journal of Bacteriology, v. 194, n. 18, p. 5141–5142, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22933766/>. Acesso em: 8 dez. 2025.

IRLINGER, F. **Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci.** International Journal of Food Microbiology, v. 126, n. 3, p. 302–310, 2008.

ISIDÓRIO, W. R.; HOFFMANN, C. **Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção.** 2019. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003108242>. Acesso em: 23 nov. 2024.

IWASE, T. et al. **A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach.** Scientific Reports, v. 3, p. 3081, 2013. Disponível em: <https://rdcu.be/eTJec>. Acesso em: 8 dez. 2025.

JOHNSON, M. E. et al. **Spatial and temporal variability of the microbiome in Cheddar cheese production facilities.** Applied and Environmental Microbiology, v. 87, n. 23, e01436-21, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33767682/>. Acesso em: 8 dez. 2025.

JÚNIOR, L. C. C. G. et al. **Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 2, p. 111–120, 2014.

- KAMIMURA, B. A. et al. **Microbiological and physicochemical quality of Canastra artisan cheese during ripening.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 49, n. 2, e20180335, 2019.
- LEE, Y. J.; LEE, E. B. **Characterization of biofilm-producing coagulase-negative staphylococci isolated from bulk tank milk.** *Veterinary Sciences*, v. 9, n. 8, art. 430, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/9/8/430>. Acesso em: 8 dez. 2025.
- LIANOU, A. et al. **Isolation of biofilm-forming staphylococci from bulk-tank milk of small ruminant farms in Greece.** *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 65, art. 48, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10417191>. Acesso em: 8 set. 2025.
- LOPES, B. R. da S.; MEDEIROS, M. das G. G. de A.; CEOTTO-VIGODER, H. **Fatores de risco associados à contaminação bacteriana das mãos de manipuladores de alimentos: uma revisão de literatura.** *Gestão da Qualidade e Segurança de Alimentos*, v. 4, n. 1, p. 1–?, 2023. Disponível em: <https://revistascientificas.ifrj.edu.br/index.php/alimentos/article/view/2616>. Acesso em: 12 dez. 2025.
- LÓPEZ-HERNÁNDEZ, L. M. et al. **Effect of season on the microbiological and physicochemical characteristics of artisan Mexican Chihuahua cheese.** *International Journal of Dairy Technology*, v. 71, supl. 1, p. 5–11, 2018.
- LORTAL, S. et al. **Wooden tools: reservoirs of microbial biodiversity in traditional cheesemaking.** *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 1, CM-0008-2012, 2014.
- MACFADDIN, Jean F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976.
- MAIA, K. M. et al. **Métodos de higienização das teteiras e incidência de bactérias causadoras de mastite.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/2774>. Acesso em: 23 nov. 2025.
- MARIADASSOU, M. et al. **Microbiota members from body sites of dairy cows are largely shared within individual hosts throughout lactation but sharing is limited in the herd.** *Animal Microbiome*, v. 5, art. 32, 2023.
- MCCORMICK, F. **Cows, milk and religion: the use of dairy produce in early societies.** *Anthropozoologica*, v. 47, n. 2, p. 101–113, 2012. Disponível em: <https://docslib.org/doc/7305403/cows-milk-and-religion-the-use-of-dairy-produce-in-early-societies>. Acesso em: 2 set. 2025.
- MINAS GERAIS. **Decreto nº 48.024, de 27 de agosto de 2020.** Regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais no Estado de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/legislacao-mineira/texto/DEC/48024/2020>. Acesso em: 15 nov. 2025.
- MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. **Portaria IMA nº 1.969, de 26 de março de 2020.** Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal (QMA) em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas. Belo Horizonte: IMA, 2020.

Disponível em: <https://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias>. Acesso em: 5 dez. 2025.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. **Portaria IMA nº 2.051, de 7 de abril de 2021**. Estabelece o período mínimo de maturação para o Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. **Portaria nº 2.051, de 7 de abril de 2021**. Define períodos mínimos de maturação para microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2021. Disponível em: <https://www.mg.gov.br/sites/default/files/agricultura/images/documentos/Ações%20do%20Sistema%20Agricultura%20Outubro%202022.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2025.

MINAS GERAIS. Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI. **Registro de Indicação Geográfica: Queijo Minas Artesanal da Canastra**. Belo Horizonte, 2018.

MINAS GERAIS. **Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002**. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1 fev. 2002. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/legislacao-mineira/texto/LEI/14185/2002>

MINAS GERAIS. **Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012**. Dispõe sobre a produção e a comercialização do Queijo Minas Artesanal. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 18 dez. 2012.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018**. **Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 18 dez. 2018. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/legislacao-mineira/texto/LEI/23157/2018/>. Acesso em: 16 jan. 2026.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais no Estado de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.mg.gov.br/agricultura/pagina/legislacao-queijos-artesanais>. Acesso em: 15 nov. 2025.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, Belo Horizonte, 19 dez. 2018.

MIRANDA, G. R. et al. **Queijos artesanais: qualidade físico-química e microbiológica e avaliação das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e ambiente de produção**. Extensão Rural, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 78–88, 2016. DOI: 10.5902/2318179618101. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/extensaorural/article/view/18101>. Acesso em: 26 nov. 2025.

NAKATSUJI, T. et al. **Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis**. Science Translational Medicine, v. 11, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31043573/>

NÓBREGA, J. E. et al. **Avaliação da microbiota láctica autóctone em queijos Minas artesanais produzidos na Serra da Canastra.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 4, p. 753–758, 2008.

NURXAT, N. et al. **Commensal *Staphylococcus epidermidis* defends against *Staphylococcus aureus* through SaeRS two-component system.** *ACS Omega*, v. 8, n. 20, p. 17712–17718, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c00263. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10210170/>

OCHLICH, D. et al. **The influence of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis* on the epidermal barrier and inflammation: implications for atopic dermatitis.** *Experimental Dermatology*, v. 32, n. 4, p. 555–561, 2023. DOI: 10.1111/exd.14727. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36484602/>

OLIVEIRA, D. P. **Caracterização funcional genômica dos microrganismos predominantes no fermento endógeno "pingo" do queijo da Serra da Canastra.** 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-01072021-183612/publico/Debora_Preceliano_de_Oliveira_ME_Corrigida.pdf. Acesso em: 14 nov. 2025.

OLIVEIRA, G. S. **Diversidade e controle de biofilme formado pela microbiota do leite cru.** 2021. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/460e5a54-f4de-4324-9139-fb8708d062cf>. Acesso em: 26 nov. 2025.

OLIVEIRA, L. G. et al. **Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Serrano artisan cheese produced on the grasslands of Southern Brazil.** *Food Science and Technology*, Campinas, v. 35, n. 1, p. 180–186, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235792439>

Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO). **Traditional Ways of Making Artisan Minas Cheese included in UNESCO's Intangible Cultural Heritage List.** Paris: UNESCO, 4 dez. 2024. Disponível em: <https://www.unesco.org>. Acesso em: 16 jan. 2026.

OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis*: the "accidental" pathogen.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609257/>

PEREIRA, M. A. et al. **Biofilm retention and microbial persistence in porous materials used in dairy plants.** *Food Control*, v. 126, p. 108–116, 2021. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107966.

PERSSE WALLER, K. et al. **Genotypic characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* from Swedish cases of bovine subclinical mastitis.** *Journal of Dairy Science*, v. 106, n. 11, p. 7991–8004, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030223005398>

PICININ, L. C. et al. **Efeito da sazonalidade e práticas de manejo na qualidade do leite de tanque no Estado de Minas Gerais - Brasil.** Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 4, p. 1355–1363, 2019. DOI: 10.1590/1678-4162-10063. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/dc6Dh4qZ8HMrRmhmcBPW67R/>

PINEDA, A. P. A. et al. **Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector.** Frontiers in Microbiology, v. 12, art. 666922, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.666922.

PLACE, R. B. et al. **Staphylococcus equorum subsp. linens, subsp. nov., a starter culture component for surface-ripened semi-hard cheeses.** Systematic and Applied Microbiology, v. 26, n. 1, p. 30–37, 2003.

QUIGLEY, L. et al. **The complex microbiota of raw milk.** FEMS Microbiology Reviews, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.

RESENDE, M. F. S. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas.** 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

REUBEN, R. C. et al. **Universal drivers of cheese microbiomes.** iScience, v. 26, n. 1, p. 1–12, 2023. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105744.

SANTOS, P. R. et al. **Resistance profile and biofilm production of Enterococcus spp., Staphylococcus sp., and Streptococcus spp. from dairy farms in southern Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 54, n. 2, p. 1217–1229, 2023. DOI:10.1007/s42770-023-00929-z.

SILVA, J. M. M. **Micobiota core de queijos de leite cru produzidos na região da Serra da Canastra.** 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/27934>. Acesso em: 5 dez. 2025.

SILVA, S. F. **Composição e qualidade do leite no Alto Paranaíba de Minas Gerais.** 2019. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/b1ec76e5-9d1b-4928-a3ac-763cce2180c0>. Acesso em: 22 ago. 2025.

SIQUEIRA, I. N.; LIMEIRA, C. H.; CAVALCANTI, A. A. C.; SOUZA, J. G.; FREIRE, D. H. F.; AZEVEDO, S. S.; MELO, M. A. **Bactérias formadoras de biofilmes na indústria de laticínios: uma breve revisão.** Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v. 25, n. 4, p. 491–500, 2021. DOI: 10.17921/1415-6938.2021v25n4p491-500. Disponível em: <https://ensaioseciencia.pgsscogna.com.br/ensaioeciencia/article/view/8580>. Acesso em: 8 nov. 2025.

STAVROPOULOU, D. A.; DE VUYST, L.; LEROY, F. **Nonconventional starter cultures of coagulase-negative staphylococci to produce animal-derived fermented foods: a SWOT analysis.** Journal of Applied Microbiology, v. 125, n. 6, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1111/jam.14054.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; PENNA JÚNIOR, C. O.; CÓSER, A. C. **Fatores que afetam a composição e a qualidade do leite.** Produção Científica, 2012. Disponível em:

<http://br.monografias.com/trabalhos3/fatores-afetam-composicao-do-leite/fatores-afetam-composicao-do-leite2.shtml>. Acesso em: 2 set. 2025.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. **Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: not so different from Staphylococcus aureus?** Veterinary Microbiology, v. 134, n. 1–2, p. 29–36, 2009.

TREMBLAY, Y. D. et al. **Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 10, p. 6149–6158, 2014.

TREMBLAY, Y. D. et al. **Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 1, p. 234–246, 2013.

TREMBLAY, Y. D. N. et al. **Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms.** Veterinary Microbiology, v. 172, n. 3–4, p. 511–518, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984943/>. Acesso em: 27 out. 2025.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 2. ed. Santa Maria, RS: Editora da UFSM, 2010. 191 p. ISBN 8573910364.

TRONCO, Vania Maria. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 5. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

VALENTE, G. L. C. **Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, superfícies de queijaria e queijo Minas artesanal durante a maturação em diferentes estações.** 2022. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/46129>. Acesso em: 23 nov. 2025.

VEIGA DE ALMEIDA, P.; CUNHA NETO, A.; SOUZA FIGUEIREDO, E. E.; TAVARES CARVALHO, R. C. **Micro-organismos isolados de mastite bovina e em leite cru no Brasil.** Uniciências, v. 24, n. 1, p. 58–64, 2021. DOI: 10.17921/1415-5141.2020v24n1p58-64. Disponível em: <https://uniciencias.pgsscogna.com.br/uniciencias/article/view/8952>. Acesso em: 23 nov. 2025.

YAN, H. et al. **Bacterial composition and interactions in raw milk and teat skin of dairy cows.** Fermentation, v. 8, n. 5, art. 235, 2022. DOI: 10.3390/fermentation8050235.