

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL
CAMPUS SOROCABA

MARIA LUIZA CARDOSO

**QUALIDADE DO LEITE E EFEITO DO PROCESSAMENTO SOBRE A
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO PORUNGO**

SOROCABA
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

CAMPUS SOROCABA

MARIA LUIZA CARDOSO

**QUALIDADE DO LEITE E EFEITO DO PROCESSAMENTO SOBRE A
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO PORUNGO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Monitoramento Ambiental para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia e
Monitoramento Ambiental

Orientação: Prof. Dr. Natan de Jesus
Pimentel Filho

SOROCABA

2024

Cardoso, Maria Luiza

Qualidade do leite e efeito do processamento sobre a segurança microbiológica do Queijo Porungo / Maria Luiza Cardoso -- 2024.

40f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho

Banca Examinadora: Natan de Jesus Pimentel Filho, Solimar Gonçalves Machado, Michelle de Medeiros Carvalho

Bibliografia

1. Queijo artesanal tradicional. 2. Alimento seguro. 3. Controle microbiano. I. Cardoso, Maria Luiza. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Maria Luiza Cardoso, realizada em 30/07/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho (UFSCar)

Profa. Dra. Solimar Gonçalves Machado (UFV)

Profa. Dra. Michelle de Medeiros Carvalho (UFSC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais Adnilson e Jolice, e meu irmão Denner, por todo apoio e incentivo recebido durante esses anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho, que me orienta desde a graduação, sempre muito dedicado e atencioso. Saliento seu apoio incondicional prestado, a forma interessada e pertinente como acompanhou a realização deste projeto.

À Mayara Andrade Martins Souza pela ajuda nos experimentos laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Iuri Emanuel de Paula Ferreira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às professoras Michele de Medeiros Carvalho e Solimar Gonçalves Machado, pelas contribuições durante as bancas de qualificação e defesa de dissertação.

Ao produtor de queijo Porungo que permitiu a pesquisa em sua propriedade e cedeu as amostras para estudo.

RESUMO

CARDOSO, M. L. **Qualidade do leite e efeito do processamento sobre a segurança microbiológica do Queijo Porungo**. 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

O Porungo é um queijo artesanal tradicional produzido na região Sudoeste do estado de São Paulo. Apesar de o leite utilizado na fabricação não passar por tratamento térmico, o que pode representar um risco de contaminação por patógenos, a massa é submetida ao processo de filagem em água quente. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade do leite cru utilizado na produção do queijo Porungo, assim como o impacto do processamento sobre a microbiota contaminante. Foram coletadas amostras de leite de sete vacas em uma unidade produtora de queijo Porungo, que foram analisadas quanto à contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), coliformes totais, *Escherichia coli*, enterobactérias, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus* spp., além da determinação da composição química. Ao longo de um ano, foram coletadas amostras de leite, soro-fermento, massa, queijo pós-filagem e queijo pós-salga, sendo todas avaliadas quanto às contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *S. aureus*. Além disso, foi avaliado o efeito da filagem em água aquecida a temperaturas entre 65 e 72 °C sobre a viabilidade de *Listeria innocua* inoculada na massa do queijo Porungo. Três das sete vacas avaliadas apresentaram CCS acima de 400.000 CS/mL, com *S. aureus* detectado em populações superiores a 3 log UFC/mL em todas as amostras de leite, indicando a presença de mastite subclínica em alguns animais. Todas as amostras de leite cru recém-ordenhado apresentaram CPP inferiores a 4,5 log UFC/mL, enquanto os teores de gordura e sólidos totais se mostraram extremamente reduzidos. As contagens de mesófilos aeróbios e *S. aureus* não foram influenciadas pela época do ano, mas apresentaram diferenças significativas entre as etapas de processamento do queijo. Embora a etapa de filagem não tenha reduzido significativamente a população microbiana em ambos os grupos avaliados, uma redução significativa foi observada nos queijos após a salga. A população de coliformes totais variou ao longo do período de avaliação e entre as etapas analisadas, e nenhuma amostra apresentou contaminação por coliformes termotolerantes. A filagem reduziu a contaminação por *L. innocua* em mais

de 1 log UFC/g na massa do queijo. Portanto, conclui-se que, de modo geral, a população microbiana não é significativamente afetada pelo binômio tempo e temperatura utilizado na filagem do queijo (65 °C por 2 minutos). Por outro lado, *L. innocua* apresentou sensibilidade ao processo de filagem. Assim, a baixa contaminação do queijo deve ser assegurada por boas práticas de ordenha combinadas com boas práticas de fabricação.

ABSTRACT

CARDOSO, M. L. **Quality of milk and effect of processing on the microbiological safety of Porungo cheese.** 2024. Master's thesis (Masters in Biotechnology and Environmental Monitoring) – Federal University of São Carlos *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

Porungo is a traditional artisanal cheese produced in the southwestern region of São Paulo state. Although the milk used in its production is not thermally treated, which could pose a risk of pathogen contamination, the curd undergoes a hot water stretching process. This study aimed to evaluate the quality of the raw milk used in the production of Porungo cheese, as well as the impact of processing on the contaminating microbiota. Milk samples were collected from seven cows at a Porungo cheese production unit and analyzed for somatic cell count (SCC), standard plate count (SPC), total coliforms, *Escherichia coli*, enterobacteria, molds and yeasts, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus* spp., as well as chemical composition. Over the course of a year, samples of milk, fermented-whey, curd, cheese post-stretching, and cheese post-salting were collected and evaluated for aerobic mesophilic bacteria, total and thermotolerant coliforms, and *S. aureus* counts. Additionally, the effect of stretching in hot water at temperatures between 65 and 72 °C on the viability of *Listeria innocua* inoculated into the Porungo cheese curd was evaluated. Three of the seven cows evaluated had SCC levels above 400,000 SC/mL, with *S. aureus* detected at levels exceeding 3 log CFU/mL in all milk samples, indicating the presence of subclinical mastitis in some animals. All raw milk samples freshly collected had SPC levels below 4.5 log CFU/mL, while fat and total solids content were extremely low. Aerobic mesophilic bacteria and *S. aureus* counts were not influenced by the season but showed significant differences among the cheese processing stages. Although the stretching stage did not significantly reduce the microbial population in both groups evaluated, a significant reduction was observed in the cheese after salting. The total coliform population varied throughout the evaluation period and among the stages analyzed, with no samples showing contamination by thermotolerant coliforms. The stretching process reduced *L. innocua* contamination by more than 1 log CFU/g in the cheese curd. Therefore, it can be concluded that, in general, the microbial population is not significantly affected by the time-temperature combination used in the cheese stretching process (65 °C for 2 min).

On the other hand, *L. innocua* showed sensitivity to the stretching process. Thus, low contamination levels in the cheese must be ensured by good milking practices combined with good manufacturing practices.

SUMÁRIO

ARTIGO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Avaliação da qualidade do leite cru.....	13
2.2. Efeito do processamento do queijo sobre a contaminação microbiana.....	14
2.3. Efeito da etapa de filagem sobre <i>Listeria innocua</i> inoculada na massa de queijo Porungo.....	14
2.4. Delineamento experimental e análise dos dados	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Qualidade do leite cru.....	17
3.2. Efeito do processamento do queijo sobre a contaminação microbiana.....	21
3.3. Efeito da filagem sobre <i>Listeria innocua</i> inoculada na massa de queijo Porungo.....	28
4. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

ARTIGO

Qualidade do leite e efeito do processamento sobre a segurança microbiológica do queijo Porungo

Formatado de acordo com as normas da revista *International Dairy Journal*

Maria Luiza Cardoso¹ & Natan de Jesus Pimentel-Filho²

¹Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba. Rod. João Leme dos Santos, km 110 - SP-264, Bairro Itinga, 18052-780, Sorocaba/SP, Brasil

²Universidade Federal de São Carlos *campus* Lagoa do Sino. Rod. Lauri Simões de Barros SP-189, Km 12, Bairro Aracaçú, 18290-000, Buri/SP, Brasil

ABSTRACT

O Porungo é um queijo artesanal produzido no sudoeste de São Paulo, Brasil. Embora o leite não seja tratado termicamente, a massa passa por filagem em água quente. Este estudo avaliou a qualidade do leite cru e o efeito do processamento na microbiota do queijo. Amostras de leite de sete vacas foram analisadas quanto à contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão (CPP), coliformes totais, *E. coli*, enterobactérias, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp., além da composição química. Durante um ano, amostras de leite, soro-fermento, massa, queijo pós-filagem e pós-salga foram analisadas. Altas contagens de CCS, CPP e *S. aureus* indicaram mastite subclínica. As contagens de mesófilos aeróbios e *S. aureus* variaram entre as etapas de processamento, mas não ocorreu variação entre as estações do ano. A filagem reduziu significativamente *L. innocua*, o que não ocorreu com outros grupos microbianos avaliados. Conclui-se que a filagem a 65 °C por 2 min não é suficiente para segurança microbiana, exigindo boas práticas de ordenha e fabricação.

Palavras-chave: Queijo artesanal tradicional, alimento seguro, controle microbiano.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Porungo é um queijo artesanal tradicional do estado de São Paulo, Brasil, produzido a partir de leite cru e soro-fermento. O processo de fabricação envolve a coagulação do leite cru com enzimas coagulantes e acidificação promovida pelas bactérias nativas do leite e do soro-fermento, até se obter o ponto de filagem. A verificação do ponto de filagem é feita manualmente, testando a elasticidade da massa em água quente. Se a massa esticar sem se romper, a filagem pode ser iniciada. Após a filagem, o queijo é moldado manualmente em água quente e salgado pela imersão em salmoura (Silva *et al.*, 2020; Vasek & Filho, 2019). Este queijo é classificado como um queijo de alta umidade (de 46 a 54,9 % de umidade) e semigordo a gordo (de 25 a 59,9% de gordura) (Angatuba, 2018).

A produção de queijo com leite cru apresenta riscos microbiológicos devido à possível presença de microrganismos patogênicos e contaminantes (Pineda, Campos, Pimentel-Filho, Franco, & Pinto, 2021). A qualidade do leite cru é crucial, pois um leite de alta qualidade pode garantir um produto final seguro. No entanto, fatores como clima, ambiente, alimentação dos animais, condições de armazenamento e práticas de ordenha influenciam a microbiota do leite (Doyle, Gleeson, O'Toole, & Cotter, 2017). Os principais microrganismos de preocupação incluem *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp., que podem causar doenças graves em humanos (Claeys *et al.*, 2014; EFSA, 2015; Ntuli *et al.*, 2023; Verraes *et al.*, 2014).

A qualidade do leite é diretamente afetada pela saúde do rebanho, especialmente pela ocorrência de mastite, uma inflamação da glândula mamária. A mastite pode ser clínica, apresentando sintomas visíveis, ou subclínica, sem sintomas aparentes (Ruegg, 2017). Microrganismos como *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *E. coli* estão frequentemente associados à mastite (Srithanasuwan, Intanon, Chaisri, & Suriyasathaporn, 2023; Wagner & Erskine, 2013). A contagem de células somáticas (CCS) é um indicador importante da saúde do rebanho e da qualidade do leite; altos níveis de CCS indicam inflamação e comprometem a qualidade do leite, aumentando os riscos microbiológicos (Poutrel, Bareille, Lequeux, & Leboeuf, 2018).

Apesar das boas práticas de fabricação, os queijos artesanais de leite cru continuam a representar risco para a saúde pública. Existem registros de surtos de toxinfecções alimentares associadas ao consumo de queijos artesanais (Da Silva Santos Filho *et al.*, 2020; Gould, Mungai, & Behraves, 2014; Jackson, Gould, Hunter,

Kucerova, & Jackson, 2018; Johler *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2019), destacando a importância de garantir a qualidade do leite e a higiene durante a produção. O monitoramento contínuo e a implementação de medidas rigorosas de controle são essenciais para minimizar esses riscos.

O processamento do queijo, especialmente a etapa de filagem, tem um impacto significativo na segurança microbiológica do queijo (Kim, Schmidt, Phebus, & Jeon, 1998; Lehotová, Antálková, Medved'ová, & Valík, 2021). A filagem exige uma alta concentração de caseína intacta para formar, sob o calor, fibras alongadas e elásticas. Esse processo, que normalmente ocorre em água quente, pode reduzir a carga microbiana, mas não necessariamente eliminá-la (Loiola *et al.*, 2024; Ricci *et al.*, 2021). Portanto, a qualidade inicial do leite e a higiene durante o processamento são fundamentais para garantir um produto seguro.

Este estudo teve como objetivo avaliar qualidade do leite cru utilizado na fabricação do queijo Porungo bem como o efeito do processamento na segurança microbiológica do queijo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Avaliação da qualidade do leite cru

Em setembro de 2023, amostras de leite cru (aproximadamente 100 mL), utilizado para a fabricação do queijo Porungo, foram coletadas separadamente de cada uma das sete vacas das raças Girolanda e Jersey, em diferentes períodos de lactação, utilizando frascos plásticos estéreis. Antes da coleta, cada teto foi higienizado e avaliado pelo *California Mastitis Test* (CMT) para identificação de mastite subclínica. Para a coleta do leite, desprezou-se os primeiros jatos e então realizou-se a amostragem, sendo composta pela fração inicial da ordenha, ou seja, a amostra não representou o leite total ordenhado.

As amostras de leite foram imediatamente refrigeradas, sendo parte dos volumes acondicionados em caixas isotérmicas e enviados para um laboratório externo credenciado pela Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) para a determinação da contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP) e composição do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos).

A outra parte dos volumes foi utilizada para enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* (AOAC Official Method 991.14), Enterobacteriaceae (AOAC Official Method 2003.01), *Staphylococcus aureus* (AOAC Official Method 2003.08) e bolores e

leveduras (AOAC Official Method 2014.05), usando placas Petrifilm® (3M, Minnesota, USA). A contagem de *Streptococcus* spp. foi realizada em ágar sangue (APHA, 2015).

2.2. Efeito do processamento do queijo sobre a contaminação microbiana

Foram coletadas amostras de leite cru, soro-fermento, massa, queijo pós-filagem (antes da salga) e queijo pós-salga em uma propriedade produtora de queijo Porungo no município de Angatuba, São Paulo, Brasil, ao longo de um ano (2022/2023) obtendo-se amostras de todas as estações do ano (inverno: 12/08/22 e 04/09/22; primavera: 10/10/22 e 19/11/22; verão: 20/01/23; outono: 17/06/23). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas até o laboratório para realização das análises.

Durante as coletas das amostras, um termômetro digital foi utilizado para verificar as temperaturas ao longo do processo de fabricação do queijo.

As amostras de leite cru (RM), soro-fermento (FW), massa (C), queijo pós-filagem (CAStr) e queijo pós-salga (CASal) foram submetidas à diluição seriada utilizando-se solução de NaCl (0,85% m/v) e plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA; Acumedia, EUA), ágar Baird Parker (BP; Acumedia, EUA) e ágar Bile Vermelho Violeta (VRBA; Himedia, EUA) para enumeração de mesófilos aeróbios, *S. aureus* e coliformes totais, respectivamente. Teste de coagulase (Coagulplasma, Laborclin, Brasil) foi realizado em colônias isoladas a partir do ágar BP a fim de confirmar a presença de estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*). *S. aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo. A enumeração de coliformes termotolerantes foi realizada em caldo EC contendo tubos de Durhan, a partir de colônias crescidas em ágar VRBA (APHA, 2001).

2.3. Efeito da etapa de filagem sobre *Listeria innocua* inoculada na massa de queijo Porungo

A massa do queijo Porungo foi produzida em uma propriedade rural produtora de queijo Porungo no município de Angatuba, São Paulo, Brasil, de acordo com os procedimentos tradicionais empregados na produção do queijo artesanal. Aproximadamente 500 g da massa foram coletadas, acondicionadas em caixa isotérmica e transportadas até o laboratório.

Células de *Listeria innocua* ATCC 33090, cultivada em caldo TSB por 18 a 20 h a 37 °C, foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 15 min, lavadas em solução de

NaCl (0,85% m/v) e ressuspendidas em soro de leite drenado durante a produção do queijo. Diluições seriadas foram realizadas em soro de leite e, então a bactéria foi inoculada à massa do queijo para alcançar contagem inicial de, aproximadamente, 10^4 UFC/g. A massa foi homogeneizada manualmente por 2 min e, então, amostras de 10 g em duplicata foram retiradas para análise posterior.

O restante da massa foi fracionado em três partes de cerca de 100 g e submetido ao processo de filagem em uma panela de alumínio contendo água suficiente para submergir a massa do queijo. A água foi aquecida até 65 °C e, então, a massa foi introduzida, sendo a filagem realizada com auxílio de uma colher de poliuretano por, aproximadamente, 2 min. Em seguida, procedeu-se com a moldagem manual. Temperaturas da água, da massa e do queijo recém-filado foram determinadas ao longo do processo com uso de termômetro.

Dos três queijos elaborados, um foi reservado para análise imediatamente após a filagem. Os outros dois queijos foram salgados em salmoura (solução de NaCl a 30% m/v) por 1 h. Em seguida, um queijo foi analisado (queijo pós-salga) e o outro queijo foi acondicionado a 5 °C em embalagem plástica por 30 dias.

A figura 1 apresenta o fluxograma das etapas de filagem e salga do queijo.

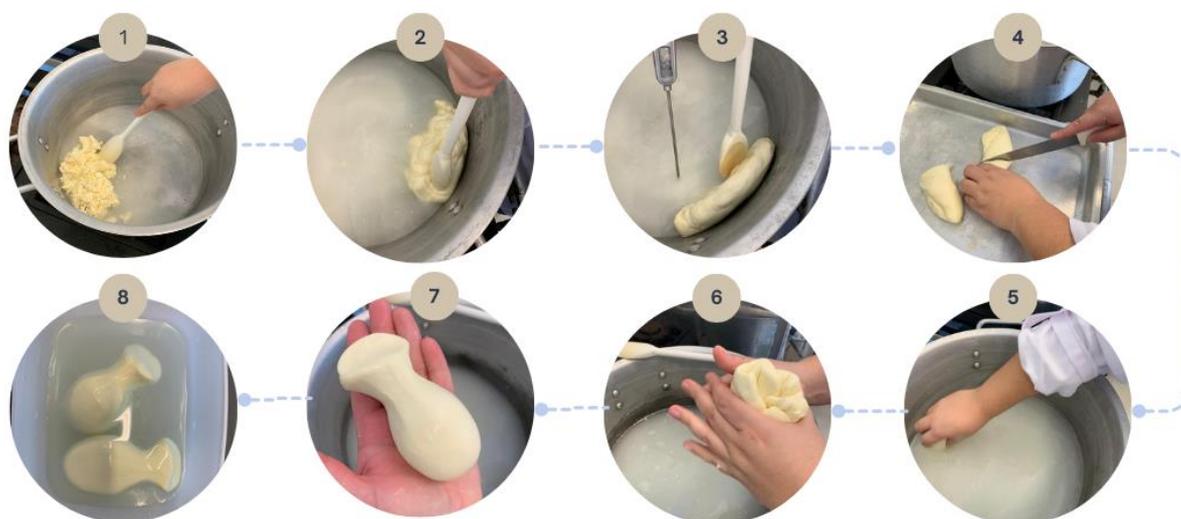


Figura 1. Fluxograma das etapas de filagem, moldagem e salga do queijo Porungo. Pequenos pedaços de massa crua são submersos em água quente a, aproximadamente, 65 °C (1). O calor é transferido para a massa que resulta em um derretimento parcial. Com auxílio de uma colher de poliuretano, a massa é esticada promovendo a formação

das fibras (2 e 3). A massa já filada é cortada (4). A moldagem do queijo é realizada manualmente em água quente (5, 6 e 7). Os queijos são salgados em salmoura (8).

Amostras de 10 g, em duplicata, de massa (C), queijo pós-filagem (CAStr), queijo pós-salga (CASal) e queijo refrigerado por 30 dias (C30d) foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,85% m/v), submetidas à diluição seriada e plaqueadas na superfície de ágar Oxford adicionado do suplemento seletivo (Himedia, Índia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Colônias cinzentas esverdeadas com halo preto foram contabilizadas.

Amostras do queijo pós-filagem (CAStr), pós-salga (CASal), refrigerado por 30 dias (C30d) e da salmoura foram avaliadas quanto ao pH utilizando potenciômetro (Jenway 3510, Reino Unido) e ao teor de cloreto de sódio (% NaCl) (Bruxelles, 1998).

O experimento foi conduzido em três repetições biológicas.

2.4. Delineamento experimental e análise dos dados

A avaliação do efeito das etapas do processamento do queijo sobre a contaminação microbiana foi realizada em delineamento casualizado em blocos, considerando-se cinco tratamentos (leite cru, soro-fermento, massa, queijo pós-filagem e queijo pós salga) e quatro blocos (inverno: 12/08/22 e 04/09/22; primavera: 10/10/22 e 19/11/22; verão: 20/01/23; outono: 17/06/23).

Antes de realizar a análise, os dados das contagens microbianas foram transformados pela função logaritmo (\log_{10}) para a correção da escala. Gráficos dos resíduos e teste de normalidade e homogeneidade de variância foram empregados na análise diagnóstica dos ajustes. Comparações múltiplas de médias utilizando-se o teste de Tukey foram conduzidas nos casos em que a significância dos efeitos de tratamentos foi confirmada pelo teste F da ANOVA. Dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados por métodos não paramétricos, como ANOVA sobre postos, teste de Kruskal-Wallis (χ^2) e comparações múltiplas pelo método de Dunn, com correção do erro tipo I pelo método de Sidák e Holm.

Posteriormente, o coeficiente de correlação de Pearson foi usado para avaliar a possível associação entre os fatores pH e NaCl e as contagens de *L. innocua* (\log_{10}) nos queijos durante as etapas de pós-filagem, pós-salga e refrigeração por 30 dias. A correlação linear foi testada estatisticamente a partir da distribuição t de Student.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R. Para os testes de hipóteses, considerou-se o nível α de 5% de significância (Montgomery, 2021; Vieira, 2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade do leite cru

Nas unidades produtoras de queijo Porungo localizadas na região Sudoeste do estado de São Paulo é comum a prática da ordenha, majoritariamente mecânica, duas vezes ao dia. A primeira ocorre por volta das 6:00 e a segunda, por volta das 15:00. A produção do queijo sempre ocorre no período da manhã, logo após a ordenha, reunindo-se o leite recém-ordenhado ao leite cru refrigerado obtido na tarde do dia anterior. Tão importante quanto o imediato uso ou a refrigeração do leite recém-ordenhado é a sanidade do rebanho e a adoção das boas práticas de ordenha para garantir um leite de qualidade.

Para avaliar a qualidade do leite cru utilizado na produção do queijo, amostras de leite de sete vacas em lactação foram avaliadas e a tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as análises de CMT, CCS e CPP.

Tabela 1. CMT, CCS e CPP de leite cru recém-ordenhado em uma unidade produtora de queijo Porungo

Vaca	CMT	CCS (CS/mL)	CPP (UFC/mL)
01	Positivo para 3 tetos	1.037.000	8.000
02	Negativo para todos os tetos	53.000	4.000
03	Positivo para todos os tetos	1.928.000	27.000
04	Positivo para 2 tetos	481.000	4.000
05	Negativo para todos os tetos	9.000	3.000
06	Positivo para 01 teto	278.000	2.000
07	Negativo para todos os tetos	22.000	950

Legenda: CMT (California Mastitis Test); CCS (Contagem de Células Somáticas); CPP (Contagem Padrão em Placas).

A mastite, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, provoca perdas econômicas significativas em função da perda substancial da produção de leite pelas vacas doentes (Ruegg, 2017). A condição inflamatória leva à redução da qualidade do

leite, como mudanças na composição e aumento de células somáticas, especialmente leucócitos, em resposta à invasão do canal do teto e colonização dos tecidos mamários por microrganismos (Oliver & Calvinho, 1995). A mastite possui diversas causas, entre elas a ambiental e a contagiosa. A mastite pode ocorrer de forma clínica, quando a modificação no tecido mamário é aparente ou de forma subclínica, diagnosticada principalmente pela contagem de células somáticas no leite. Pelos resultados obtidos, é possível notar que apenas três vacas apresentaram CMT negativo para todos os tetos, indicando ausência de mastite subclínica. Nas demais, ao menos um teto testou positivo no teste CMT. No momento da coleta das amostras na unidade produtora, foi possível acompanhar o descarte do leite proveniente dos tetos acometidos com mastite. Os resultados obtidos para CCS estão de acordo os dados obtidos no teste CMT, sendo mais elevadas as contagens no leite proveniente de vacas com mais tetos testados positivos no teste CMT (Tabela 1), confirmando o diagnóstico de mastite subclínica para algumas vacas. A contagem das células somáticas pode aumentar devido às infecções intra-mamárias, porém outros fatores podem influenciar na variação deste indicador, como suscetibilidade do animal em relação aos demais animais do rebanho, a ordem do parto, o período de lactação e a estação do ano (Schukken, Wilson, Welcome, Garrison-Tikofsky, & Gonzalez, 2003).

A Instrução Normativa (IN) 76/2018 (Brasil, 2018) estabelece que nas propriedades rurais, o leite cru refrigerado de tanque individual ou comunitário deve apresentar médias geométricas trimestrais de CCS de no máximo 500.000 CS/mL e CPP de no máximo 300.000 UFC/mL. Com base na legislação vigente, apenas os leites das vacas 01 e 03 apresentaram CCS superior ao valor estabelecido, enquanto a CPP foi inferior ao limite estabelecido pela legislação em todas as amostras de leite (Tabela 1).

A CPP quantifica o número de bactérias mesofílicas aeróbias e anaeróbias facultativas que conseguem se desenvolver em um meio bacteriológico não seletivo. Um valor elevado de CPP pode resultar de uma contaminação excessiva do leite ou de uma refrigeração inadequada, permitindo a proliferação bacteriana, o que compromete a qualidade e a segurança do leite (Borneman & Ingham, 2014).

Fagundes, Pompeu, Corassin, & Oliveira (2011) avaliaram o leite cru proveniente de 42 fazendas no estado de São Paulo, classificadas em três grupos em função do volume de leite ordenhado: baixa produção (< 400 L/dia), produção intermediária (400 a 1000 L/dia) e alta produção (> 1.000 L/dia). A média da CCS para todas as categorias foi superior a 500.000 CS/mL, sem diferenças estatísticas entre elas.

Em contraste, os valores médios de CPP foram superiores a 39.810 UFC/mL, com médias mais altas nas fazendas de baixa e intermediária produção, diferindo estatisticamente das fazendas de alta produção. O leite cru de seis fazendas produtoras de queijo Minas Artesanal do Serro, produzido no estado de Minas Gerais, foi avaliado e a CCS variou de 10.000 a 1.390.000 CS/mL enquanto a CPP variou de 71 a 7.588.230 UFC/mL (Costa Sobrinho *et al.*, 2012). Níveis variados de CCS e CPP no leite cru também têm sido observados em outras partes mundo (Arsoy, 2020; D'amico & Donnelly, 2010; Fadillah *et al.*, 2023; Mehany, El-Shafaie, Fahim, & Sallam, 2021; Zahumenská *et al.*, 2024), demonstrando a relevância deste tipo de diagnóstico para melhoria da qualidade do leite.

Com intuito de identificar o potencial agente causador da mastite subclínica identificada através do CMT, as amostras de leite foram analisadas para seis grupos microbianos e os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Contagens de microrganismos associados à mastite em amostras de leite recém-ordenhados (UFC/mL).

VACA	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	Enterobact eriaceae	Bolores e leveduras	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
01	< 1	< 1	< 1	< 1	2,6 x 10 ³	< 10
02	< 1	< 1	< 1	< 1	1,4 x 10 ³	< 10
03	< 1	< 1	< 1	< 1	2,9 x 10 ³	< 10
04	< 1	< 1	< 1	< 1	2,8 x 10 ³	< 10
05	< 1	< 1	< 1	< 1	1,3 x 10 ³	< 10
06	< 1	< 1	< 1	< 1	9,2 x 10 ³	< 10
07	< 1	< 1	< 1	< 1	5,0 x 10 ³	< 10

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que dentre os grupos microbianos potencialmente associados à mastite avaliados neste estudo, apenas *S. aureus* foi detectado, indicando ser este microrganismo o causador da inflamação das glândulas mamárias. Vale ressaltar que mesmo nas amostras de leite provenientes de vacas que testaram negativo para o CMT e apresentaram valores reduzidos de CCS, *S. aureus* esteve presente em população elevada (Tabela 1), indicando a possível colonização e estabelecimento da doença, caso não haja um manejo imediato dos

animais. O isolamento recorrente de *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* a partir de animais diagnosticados com mastite foi reportado por Ruegg (2017) em um trabalho que compilou publicações sobre o assunto ao longo de um século.

Os métodos tradicionais para controlar essa doença baseia-se no Plano de 5 Pontos para o Controle da Mastite Contagiosa (Neave, Dodd, Kingwill, & Westgarth, 1969), que tem sido implementado por mais de 4 décadas e inclui: (1) pós-*dipping* efetiva dos tetos após a ordenha, (2) uso de antibioticoterapia nas vacas secas em todos os quartos mamários ao final de cada lactação, (3) tratamento adequado dos casos clínicos, (4) descarte das vacas cronicamente afetadas e (5) manutenção e higienização do equipamento de ordenha para garantir um vácuo estável na extremidade do teto.

Alterações importantes na composição química do leite cru pode ser observada a partir dos resultados das análises apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Composição química do leite

VACA	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Sólidos totais (g/100g)	Sólidos não gordurosos (g/100g)
01	0,91	3,04	4,34	9,25	8,54
02	0,88	2,84	4,62	9,31	8,43
03	1,32	3,28	4,94	10,47	9,15
04	1,96	3,49	4,43	10,83	8,87
05	1,57	2,87	4,26	9,62	8,04
06	1,20	3,00	4,70	9,87	8,67
07	1,42	2,71	4,89	9,90	8,48

De acordo com a IN 76/2018 (Brasil, 2018), o leite cru refrigerado deve apresentar teor mínimo de 3,0g/100g de gordura, 2,9g/100g de proteína total, 4,3g/100g de lactose, 11,4g/100g de sólidos totais e 8,4g/100g de sólidos não gordurosos. De maneira geral, os leites não atenderam aos critérios para gordura e sólidos totais, sendo esses parâmetros físico-químicos inferiores ao exigido para todas as amostras (Tabela 3). Os valores de gordura apresentaram maior discrepância quando comparados os valores estabelecidos pela legislação vigente.

É importante ressaltar que de acordo com a IN 62/2011 (Brasil, 2011), o leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Como descrito na metodologia

de coleta do leite, as amostras não foram provenientes da ordenha completa das vacas, e sim da fase inicial de ordenha, que pode representar impacto significativo na composição do leite.

A produção e a composição do leite são influenciadas por diversos fatores como a dieta (por exemplo, ingestão de energia, relação entre forragem e concentrado, teor de gordura da dieta e, em menor grau, conteúdo e qualidade das proteínas), condição corporal, em que as reservas corporais podem ser mobilizadas para a produção de leite durante períodos de balanço energético negativo, frequência de ordenha e fatores relacionados ao animal, incluindo paridade, idade, raça e estágio de lactação (Cabezas-Garcia, Gordon, Mulligan, & Ferris, 2021; Jenkins & McGuire, 2006; Komaragiri & Erdman, 1997; O'Callaghan *et al.*, 2018). Como mencionado, além da presença de mastite e elevada contaminação por *S. aureus*, o baixo teor de gordura está diretamente associado à nutrição animal. Segundo o produtor rural, as vacas avaliadas neste estudo têm a dieta majoritariamente baseada em pastagens (braquiária e volumoso) e silagem de milho e, em menor proporção, ração granulada com 20% de proteína. Estudos como o reportado por O'Callaghan *et al.* (2018) relatam que o leite de vacas alimentadas ao pasto apresenta significativamente maiores concentrações de gordura e proteínas. Tão logo os resultados das análises foram obtidos, o produtor foi informado para que buscasse assistência especializada em nutrição animal para corrigir a alimentação do rebanho.

3.2. Efeito do processamento do queijo sobre a contaminação microbiana

O queijo Porungo é produzido tradicionalmente de forma artesanal há mais de um século por produtores familiares na região Sudoeste do estado de São Paulo. O leite cru é utilizado na elaboração dos queijos, além do coalho e do soro-fermento que fornece boa parte das bactérias responsáveis pela fermentação da massa do queijo. Como o leite não passa por nenhum tratamento térmico e a produção não é realizada em ambiente industrial, riscos de contaminação estão presentes, embora não haja nenhum relato de intoxicação ou infecção associados a este alimento.

Embora o leite cru seja utilizado, a massa fermentada passa pela etapa de filagem em água quente antes de ser moldada e salgada. Ao longo de todo processo de filagem, as temperaturas da água, da massa e do queijo pós-filagem foram determinadas. A temperatura da água durante o processo de filagem e moldagem variou de 62 a 72 °C. Durante o processo de filagem, que durou cerca de 2 min, a massa

alcançou 57 °C e o queijo moldado e pronto para ser imerso na salmoura apresentou temperatura variando de 47 a 51 °C.

A análise de variância não indicou diferença estatística entre os tempos avaliados, portanto, ao longo do ano o nível de contaminação por mesófilos aeróbios em cada etapa do processamento foi considerado o mesmo ($F_c = 43,79$ e $P < 0,00001$). Logo, a contagem de mesófilos aeróbios não é influenciada pela época do ano, mas sim pelo tratamento (etapas do processo). O soro-fermento apresentou o maior nível médio de mesófilos aeróbios ($8,49 \pm 0,25$ log UFC/mL), sendo significativamente diferente da contaminação do leite cru e do queijo pós-salga. Porém, as contagens do grupo microbiano na massa e no queijo pós-filagem não diferiram estatisticamente do soro-fermento (Figura 2). Nestas etapas, os níveis de mesófilos continuaram elevados, porém ocorreu uma redução na última etapa, queijo pós-salga. Este resultado não diverge do esperado, visto que o soro-fermento utilizado na produção do queijo é obtido no dia anterior ao uso, após o processo de fermentação da massa. Esse soro é armazenado em garrafas plásticas e fermentado à temperatura ambiente até o momento do uso, no dia seguinte. Esse processo permite a multiplicação das bactérias lácticas responsáveis pela fermentação da massa e definição das características do queijo.

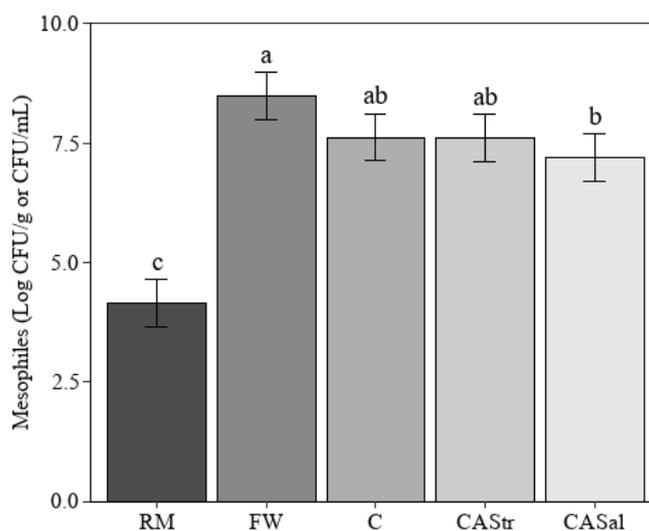


Figura 2. Contagens de mesófilos aeróbios (log UFC/mL ou log UFC/g) em amostras de leite cru (RM), soro-fermento (FW), massa (C) e queijos pós-filagem (CASt) e pós-salga (CASal) obtidas ao longo de um ano. Valores médios e intervalos com 95% de confiança. CV = 8,8%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O leite cru apresentou uma contaminação diferente das demais etapas, a menor (4,15 log UFC/mL). Assim, observa-se que as contagens obtidas para o leite cru encontram-se abaixo do limite estabelecido pela legislação federal (5,48 log UFC/mL) (Brasil, 2018).

Uma análise comumente empregada nas indústrias de laticínios para verificar a potencial fermentativo do leite cru é a lactofermentação, que avalia o tipo de microbiota mesofílica predominante no leite, com base no aspecto, odor e tipo de coágulo formado (Bramley & Mckinnon, 1990). Com uma contaminação relativamente baixa e com predominância de bactérias do ácido lático é possível observar formação de coágulo gelatinoso, com característica firme, brilhante, uniforme e sem bolhas ou soro. Esta microbiota, ideal e natural do leite cru, fermenta a lactose, produz ácido lático e, devido à redução do pH, coagula o leite.

A massa fermentada (pré-filagem) e o queijo pós-filagem, são estatisticamente semelhantes quanto ao nível médio de contaminação por mesófilos (Figura 2). Apesar de estatisticamente não haver diferença entre as médias das contagens de mesófilos aeróbios na massa, no queijo pós-filagem e no queijo pós-salga, pode-se observar uma tendência de diminuição de contaminação após o queijo passar pela salga em salmoura.

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias é geralmente adotada para avaliar as condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação (Rodriguez et al. 2011). A legislação brasileira não apresenta valores mínimos ou máximos para este grupo de microrganismos em queijos, porém, em altas contagens pode-se concluir que o produto foi produzido com matéria-prima altamente contaminada, porém, não necessariamente os microrganismos presentes sejam prejudiciais uma vez que bactérias do ácido lático também podem se desenvolver neste meio de cultivo (Carr, Chill, & Maida, 2002).

A figura 3 apresenta as médias das contagens de *S. aureus* nas amostras de leite cru, soro-fermento, massa, queijo pós-filagem e queijo pós-salga.

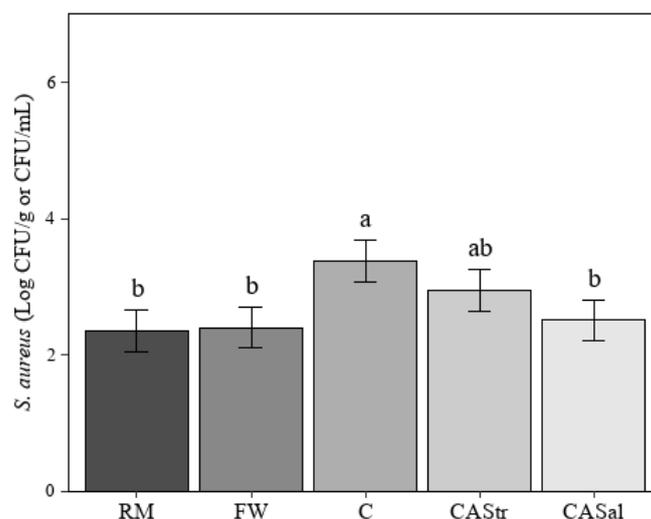


Figura 3. Contagens de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL ou log UFC/g) em amostras de leite cru (RM), soro-fermento (FW), massa (C) e queijos pós-filagem (CAStr) e pós-salga (CASal) obtidas ao longo de um ano. Valores médios e intervalo com 95% de confiança. CV = 13,84%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Assim como para a contagem de mesófilos aeróbios, a contaminação por *S. aureus* não variou estatisticamente entre os tempos de avaliação, porém, apresentou diferenças entre os tratamentos ($F_c = 8,19$ e $P = 0,00044$). A massa, que reúne a mistura do leite cru, coalho e soro-fermento, após a fermentação mostrou-se como a etapa mais contaminada (3,38 log UFC/g), diferindo estatisticamente do leite, do soro e do queijo pós-salga. Embora a análise estatística indique que a massa e o queijo pós-filagem apresentem o mesmo nível de contaminação, sugerindo que o processo de filagem não é eficiente para reduzir a contaminação por *S. aureus*, foi possível observar uma redução de 0,43 log UFC/g da bactéria após a filagem. Por outro lado, comparando-se as contagens da massa e do queijo pós-salga, uma redução de 0,87 log UFC/g foi observada, diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

S. aureus é um patógeno oportunista, Gram-positivo, frequentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção até infecções graves (Lakhundi & Zhang, 2018). A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é capaz de sobreviver em ambientes distintos e condições adversas. Este microrganismo é mais prevalente em casos de mastite bovina (Jurado, Fernández, Rodríguez, & García, 2024).

O Decreto 325/2018, legislação do município de Angatuba, São Paulo, Brasil, que dispõe sobre o regulamento para a padronização do queijo artesanal Porungo,

primeira e única legislação específica para queijo Porungo existente até o presente, classifica o produto como queijo de alta umidade (Angatuba, 2018). Para este tipo de queijo, a Portaria 146/1996, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece que para o queijo ser classificado como de qualidade intermediária, em cinco amostras analisadas, apenas duas podem conter entre 100 e 1000 UFC/g de estafilococos coagulase positiva (Brasil, 1996). A etapa de filagem seguida da salga reduziu a contagem de *S. aureus* para 2,51 log UFC/g (Figura 3), sendo este índice adequado ao limite estabelecido pela legislação vigente.

Quando comparado ao queijo Cabacinha do Vale do Jequitinhonha no estado de Minas Gerais, Brasil, um queijo elaborado de forma semelhante ao queijo Porungo, em um estudo realizado em três municípios diferentes, o resultado médio obtido para a contagem de *S. aureus* foi de 3,7 log UFC/g. A partir dos resultados, os autores indicam a necessidade de regulamentação deste produto, para evitar potenciais riscos aos consumidores (Da Silva Santos Filho *et al.*, 2020). População superior a 3 log UFC/g de *S. aureus* também foi encontrada por Busetta *et al.* (2023) após o processo de filagem do queijo Caciocavallo Podolico Lucano. Andrade *et al.* (2022) relataram que o tratamento térmico a 95 °C por 3 min não foi suficiente para a completa inativação de estafilococos coagulase positivo, sendo eficaz apenas quando o tempo de tratamento foi de no mínimo 5 min. Em um outro estudo que avaliou o efeito do processo de filagem da massa sobre a contaminação microbiana, onde a temperatura média interna da massa foi de 62,2 °C por 4,5 minutos, foi observada uma redução de *S. aureus* variando de 0,53 a 2,87 log UFC/g (Lehotová, Antálková, Medved'ová, & Valík, 2021). Como mencionado anteriormente, a temperatura máxima alcançada no interior da massa do queijo Porungo foi de 57 °C, o que explica a menor redução da bactéria no presente estudo.

Os coliformes são divididos em dois grupos, os coliformes totais que inclui as bactérias na forma de bastonetes, Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose com produção de ácido e gás de 24 a 48 h, em temperatura de 30 a 35 °C. São indicadores de qualidade higiênico-sanitária. Para os coliformes termotolerantes, a temperatura para a fermentação da lactose e produção de gás se estende até 44,5 °C. Esses são indicadores de contaminação de origem fecal em alimentos. A bactéria *E. coli* pertence a essa categoria e é mundialmente utilizada como indicadora para avaliar a contaminação de origem fecal

em alimentos e água. A presença de uma elevada população deste grupo pode indicar a presença de patógenos entéricos (Martin, Trmcic, Hsieh, Boor & Wiedmann, 2016).

A figura 4 apresenta as contagens de coliformes totais para as amostras de leite, soro, massa, queijo pós-filagem e queijo pós salga. Diferentemente dos outros grupos analisados (mesófilos aeróbios e *S. aureus*), não houve normalidade nos dados obtidos, sendo necessário analisá-los a partir de métodos não paramétricos. A ANOVA calculada a partir dos postos demonstra efeitos significativos tanto das etapas de processamento quanto dos tempos de avaliação (data da coleta das amostras) (teste $F= 5,32$; $P < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis reforça a evidência de que as etapas possuem níveis diferentes de coliformes totais ($\chi^2=17.01$; $P=0.0019$). Os grupos diferentes foram identificados pelo teste de Dunn com correção de Holm e Sidák.

A etapa com maior mediana de coliformes totais foi a massa, que não diferiu estatisticamente do queijo pós filagem (Figura 4). Esse resultado demonstra que a etapa de filagem não foi eficiente para reduzir a população deste grupo microbiano.

Segundo a Portaria 146/1996 do MAPA, analisando cinco amostras de queijo de alta umidade, como o queijo Porungo, apenas duas amostras podem apresentar contagens de coliformes totais entre 1000 e 5000 UFC/g, para que o produto seja classificado como de qualidade intermediária (Brasil, 1996). Todas as amostras analisadas apresentaram contagens superiores ao limite estabelecido pela legislação vigente. Porém, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, responsável pela fiscalização de produtos de origem animal no ponto de venda, não há parâmetros para coliformes totais. Esses queijos, portanto, pela ANVISA estão aptos para a comercialização (Brasil, 2022).

A mesma legislação estabelece os mesmos critérios para os limites de coliformes termotolerantes. Entretanto, nenhuma etapa apresentou amostras contaminadas com este grupo microbiano.

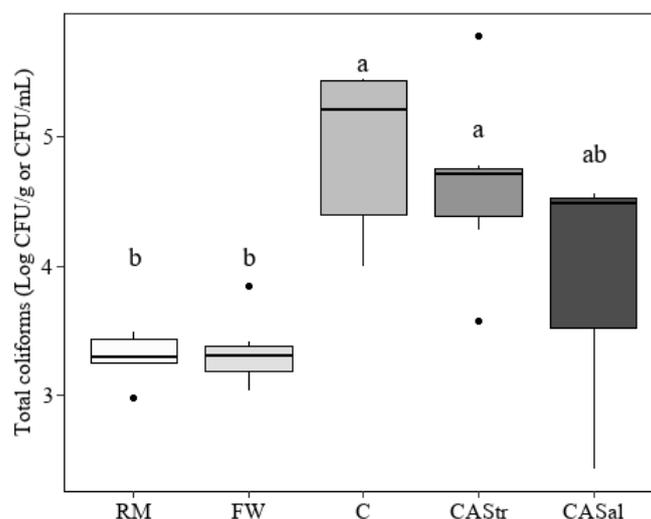


Figura 4. Diagramas de caixas para as contagens de coliformes totais (log UFC/mL ou log UFC/g) em amostras de leite cru (RM), soro-fermento (FW), massa (C) e queijos pós-filagem (CAStr) e pós-salga (CASal) obtidas ao longo de um ano. Letras diferentes indicam diferença estatística quanto ao valor mediano dos níveis de contaminação pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

Em um estudo realizado com o queijo Caciocavallo, comumente produzido de forma similar ao queijo Porungo, porém na região sul da Itália a partir do leite de vaca, os autores reportaram aumento na população de Enterobacteriaceae e coliformes totais após a coagulação do leite. O mesmo não foi observado para *E. coli*. Todavia, após o processo de fermentação da massa houve a redução de todos os grupos avaliados. Por fim, a etapa de filagem, que ocorre em temperatura e tempo variando de 85 a 95 °C e de 10 a 15 min, respectivamente, foi capaz de reduzir as contagens de quase todos os grupos microbianos indesejáveis até abaixo dos níveis de detecção (Busetta *et al.*, 2023). Lehotová, Antálková, Medved'ová, & Valík, (2021) reportaram redução de, aproximadamente, 3,8 log UFC/g e 2,3 log UFC/g para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, após o processo de filagem por 4,5 min com temperatura média interna da massa alcançando 62,2 °C, temperatura superior à observada neste estudo. Após a filagem da massa para obtenção de queijo muçarela no estado do Tocantins, Brasil, observou-se uma redução de 2,64 log UFC/g e de 2,3 log UFC/g para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente (Loiola *et al.*, 2024). Os dados apontam para a importância do binômio tempo-temperatura do processo de filagem para a eficiente redução da carga microbiana indesejável.

3.3. Efeito da filagem sobre *Listeria innocua* inoculada na massa de queijo Porungo

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica de distribuição ubiqüitária, responsável por casos e por surtos de listeriose em humanos e animais. São bacilos pequenos, anaeróbios facultativos e Gram-positivos. A bactéria é sensível à pasteurização e resiste a condições ambientais adversas como baixo pH e altas concentrações de NaCl (Rocourt & Buchrieser, 2007). Neste estudo, optou-se pelo uso de *L. innocua*, bactéria pertencente ao mesmo gênero da cepa patogênica, porém sem risco à saúde do manipulador.

O binômio tempo-temperatura da pasteurização do leite a 75 °C por 15 s é esperado resultar em mais de 10 reduções logarítmicas da maioria dos patógenos, incluindo *L. monocytogenes* (EFSA, 2022). Portanto, quando a bactéria é detectada em leite pasteurizado, as causas mais prováveis são pasteurização inadequada ou contaminação pós-processamento (Ryser & Marth, 2007).

A figura 5 apresenta a média das contagens de *L. innocua* nas amostras de massa (C) e dos queijos pós-filagem (CAStr), pós-salga (CASal) e refrigerado por 30 dias (C30d).

Pela análise de variância dos resultados é possível inferir que a etapa de filagem reduziu significativamente ($P < 0,05$) a população de *L. innocua*. A redução observada foi de 1,4 log UFC/g. A população da bactéria não diferiu significativamente ($P > 0,05$) entre as etapas filagem, salga e refrigeração por 30 dias. Mesmo a bactéria apresentando um comportamento psicrotrófico, não foi observado crescimento durante o tempo de armazenamento sob refrigeração (Figura 5).

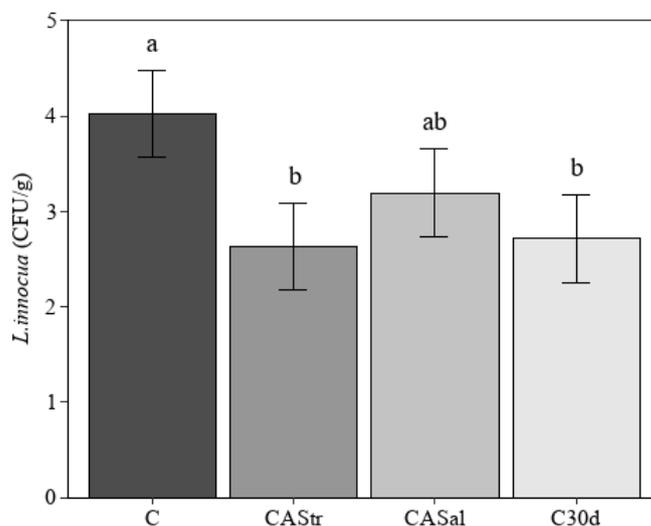


Figura 5. Contagens de *Listeria innocua* (log UFC/g) em amostras de massa (C), queijo pós-filagem (CAStr), pós-salga (CASal) e refrigerado por 30 dias (C30d). Valores médios e intervalos com 95% de confiança. CV= 12,87%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

De acordo com a Portaria 146/1996, queijos de alta umidade como o queijo Porungo, não deve conter *L. monocytogenes* (Brasil, 1996). Embora a etapa de filagem tenha reduzido a contagem de *Listeria* no queijo, a redução não foi suficiente para atingir os níveis estabelecidos pela legislação. Por outro lado, a resolução mais recente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, IN 161/2022, estabelece que o limite para alimentos prontos para o consumo com as características do queijo Porungo é de 100 UFC/g (2 log UFC/g) (Brasil, 2022) porém, essa legislação só é aplicada quando o produto encontra-se no comércio, disponível para compra. No queijo pós-salga e no queijo refrigerado por 30 dias, as contagens foram de 3,20 e 2,72 log UFC/g, respectivamente (Figura 5), ambos acima dos limites estabelecidos.

Kim, Schmidt, Phebus & Jeon (1998) avaliaram diferentes tempos e temperaturas de filagem da massa sobre a viabilidade de *L. monocytogenes* em queijo muçarela. No estudo, o leite foi inoculado com o patógeno e a massa filada a 55, 66 e 77 °C por 1, 3 e 5 min. Os autores reportaram que a filagem a 66 °C por 3 min reduziu 5 ciclos log de *L. monocytogenes*, porém o efetivo controle do patógeno foi alcançado apenas quando a filagem foi realizada a 66 °C por 5 min ou a 77 °C por 1 min.

O efeito de diferentes temperaturas aplicadas durante o processo de filagem da massa na fabricação do queijo Mozzarella di Bufala Campana sobre a resistência térmica de *L. monocytogenes* Lm15 foi avaliada por Ricci *et al.* (2021). O estudo revelou que o tempo necessário para reduzir 90% da população do patógeno (valor *D*) foi de, aproximadamente, 7 min a 62,3 °C, 3 min a 66,4 °C e 1,4 min a 70 °C. No presente estudo, a redução de *L. innocua* após filagem da massa do queijo Porungo a 65 °C por, aproximadamente 2 min, foi de 96%.

Na fabricação do Quesillo, um queijo artesanal hondurenho feito de leite cru, a massa fermentada passa pelas etapas de fusão e filagem, consideradas cruciais para o controle de patógenos. No estudo realizado por Márquez-González, Osorio, Moreno & García-Lira, (2022), o valor *D* para *L. monocytogenes* inoculado na massa foi de 2,32 minutos a 65 °C.

Cabe destacar que, embora a redução da população de *Listeria* tenha sido de pouco mais que 1 log UFC/g, a inoculação da bactéria na massa foi na ordem de 10⁴ UFC/g. Essa elevada população teve como objetivo possibilitar o acompanhamento do comportamento da bactéria ao longo do processamento. Acredita-se que uma possível contaminação por *L. monocytogenes* ocorreria em uma população bastante inferior e, provavelmente, numa situação dessas, o binômio tempo-temperatura utilizado nesta pesquisa eliminaria o microrganismo.

Amostras de queijo pós-filagem, pós-salga, refrigerados por 30 dias e da salmoura foram avaliados quanto ao pH e ao teor de NaCl e as médias dos resultados obtidos são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Valores de pH e teor de NaCl em amostras de queijo pós-filagem, pós-salga, refrigerado por 30 dias e da salmoura.

AMOSTRA	pH	%NaCl
Queijo pós-filagem	5,08	1,30
Queijo pós-salga	5,16	2,60
Queijo refrigerado por 30 dias	5,20	2,40
Salmoura	5,63	21,67

É possível observar que não há variação significativa no pH das amostras e que a salmoura aumentou o teor de sal do produto. Os valores de pH estão próximos daqueles encontrados por Silva *et al.* (2020), $5,42 \pm 0,14$; por outro lado, diferem para o teor de NaCl, uma vez que os autores relataram valores de $0,62 \pm 0,36$ %.

De acordo com a análise estatística, os valores de pH e contagem de *Listeria* não apresentam correlação linear significativa ($t= 0,13273$, $df= 7$ e $P= 0,8981$) assim como os valores de NaCl e contagem de *Listeria* também não apresentam correlação linear significativa ($t= 1,8068$, $df= 7$ e $P= 0,1138$).

O pH ideal para o crescimento da maioria das bactérias é próximo ao neutro e o crescimento é prejudicado em valores de pH inferiores a 5,0. O pH e o conteúdo ácido influenciam o crescimento e os tipos de bactérias que sobreviverão no queijo. Em geral, o pH da massa varia de 4,5 a 5,3, representando um papel significativo no controle do crescimento microbiano no queijo. No entanto, o processo de fabricação do queijo determina a composição do queijo e as condições ambientais influenciam ainda mais o comportamento da microbiota durante o processo. Entre vários patógenos de origem

alimentar, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *Campylobacter* spp. são os mais comuns associados a surtos de doenças transmitidas por queijo (Papademas & Bintsis, 2017). Geralmente, as doenças de origem alimentar relacionadas com o queijo têm sido associadas a queijos de massa mole ou a queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado (Choi, Lee, Lee, Kim, & Yoon, 2016).

Os queijos são os produtos lácteos mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e média umidade. A presença desta bactéria é preocupante, pois, geralmente, são produtos armazenados por longos períodos sobre refrigeração, permitindo o seu crescimento, além de serem consumidos sem aquecimento prévio (Ryser & Marth, 2007).

No Brasil relata-se ampla variação de ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos, em sua grande maioria Minas Frescal, ricota e coalho. Essa variação de ocorrência da bactéria em queijos pode ser explicada pelo uso de diferentes métodos para a detecção da bactéria, diferenças de padrões de qualidade dos queijos e pelo uso de leite cru como matéria-prima.

L. monocytogenes tem sido isolada de diversos tipos tradicionais de queijos em vários países, em frequências variáveis (Pintado, Oliveira, Pampulha & Ferreira, 2005). A bactéria foi isolada em 6,4% das amostras de queijos macios oriundas de países da Europa e, importante ressaltar, foi verificada maior ocorrência nos queijos elaborados com leite pasteurizado em comparação com queijos fabricados com leite cru (Rudolf & Scherer, 2001), indicando que a contaminação ocorre com maior frequência durante o processamento na indústria.

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram a presença de alta contaminação por *S. aureus* no leite ordenhado para produção do queijo Porungo e, conseqüentemente, elevada CCS. Esses índices associados ao manejo animal, que inclui a alimentação e as boas práticas de ordenha, influenciam diretamente a qualidade e a composição do leite, sobretudo no teor de gordura e sólidos totais.

A população microbiana de uma maneira geral não é afetada pela temperatura e tempo de filagem utilizada neste trabalho. Por outro lado, utilizando-se *L. innocua* como indicativo do comportamento de *L. monocytogenes*, importante patógeno de origem alimentar, redução superior a um ciclo log foi observada após a filagem da massa.

Novos trabalhos precisam ser realizados, avaliando uma variação em alguns graus de temperatura e no tempo de filagem sobre redução da contaminação microbiana. Porém, deve-se considerar que esse queijo é artesanal moldado manualmente e que temperaturas elevadas podem impossibilitar a moldagem.

Portanto, é necessário garantir o uso de leite de boa qualidade e a adoção das boas práticas de fabricação para evitar que ocorra a contaminação durante o processo de produção do queijo Porungo.

REFERÊNCIAS

Andrade, N. M. D., Carvalho, A. M. D., Saleh, M. M., Fonseca, A. B. M., Mesquita, E. D. F. M. D., Duarte, M. C. K. H., ... & Nascimento, E. R. D. (2022). Hygiene conditions of mussels *Perna perna* captured in Niterói, RJ, Brazil: thermal intervention and microbiological evaluation. *Food Science and Technology*, 42, e107421. <https://doi.org/10.1590/fst.107421>.

Angatuba. (2018). Decreto nº 325 de 29 de agosto de 2018 - Dispõe sobre o regulamento para a padronização do queijo artesanal Porungo e dá outras providências. Prefeitura do Município de Angatuba. Disponível em: <https://www.angatuba.sp.gov.br/public/admin/globalarq/legislacao/arquivo/10cqO88325.pdf>.

AOAC Official Method 2003.01: *Enterobacteriaceae Count Plate Method for Enumeration of Enterobacteriaceae in Selected Foods*. AOAC International.

AOAC Official Method 2003.08: *Staphylococcus aureus Express Count Plate Method for the Enumeration of Staphylococcus aureus in Selected Foods*. AOAC International.

AOAC Official Method 2014.05: *Yeast and Mold Count in Foods, 3M Petrifilm Rapid Yeast and Mold Count Plate Method*. AOAC International.

AOAC Official Method 991.14: *Coliform and Escherichia coli Counts in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate) Method*. AOAC International.

American Public Health Association (APHA). (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4th ed.).

American Public Health Association (APHA). (2015). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (19th ed.).

Arsoy, H. D. (2020). The effect of year, month, region, and herd size on bulk tank somatic cell and standard plate count, and the determination of optimum herd size in the intensive Holstein Friesian dairy farms in the Turkish Republic of Cyprus. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(6), 1232-1242. <https://doi.org/10.3906/vet-2005-124>

Borneman, D. L., Ingham, S. (2014). Correlation between standard plate count and somatic cell count milk quality results for Wisconsin dairy producers. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2646-2652. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7784>

Bramley, A. J., Mckinnon, C. H. (1990). The microbiology of raw milk. In: Robinson, R. K. (Ed.). *Dairy Microbiology*, (Vol 11, pp. 1-43). London, UK: Elsevier Science Publishers.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1996). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria 146 de 07 de março de 1996. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011). Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2022). Instrução Normativa – IN nº 161, de 01 de Julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos – ANVISA.

Bruxelles. International Dairy Federation: 88A. (1998). *Cheese and Processed Cheese Products: Determination of chloride content (potentiometric titration method)*.

Busetta, G., Garófalo, G., Barbera, M., Di Trana, A., Claps, S., Lovallo, C., Franciosi, E.; Gaglio, R., Settanni, L. (2023). Metagenomic, microbiological, chemical and sensory profiling of Caciocavallo Podolico Lucano cheese. *Food Research International*, 169, 112926. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112926>.

Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>.

Cabezas-Garcia, E. H., Gordon, A. W., Mulligan, F. J., Ferris, C. P. (2021). Revisiting the relationships between fat-to-protein ratio in milk and energy balance in dairy cows of different parities, and at different stages of lactation. *Animals*, 11(11), 3256. <https://doi.org/10.3390/ani11113256>

Choi, K. H., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Yoon, Y. (2016). Cheese Microbial Risk Assessments – A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29(3), 307. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0332>

Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K. Dewettinck, Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>

Costa Sobrinho, P. D. S., Marcal de Faria, C. A., Silva Pinheiro, J., Gonçalves de Almeida, H., Vieira Pires, C., Silva Santos, A. (2012). Bacteriological quality of raw milk used for production of a Brazilian farmstead raw milk cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(2), 138-144. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1010>

D'Amico, D. J., Donnelly, C. W. (2010). Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 134-147. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2426>

Da Silva Santos Filho, A., Pires, C. V., Marçal Da Silva, A., Sousa Silva, L., Soares Pinto, M., Leal Teixeira, G., Faria De Oliveira, N. J. (2020). Microbiological and chemical characterization of Cabacinha cheese marketed in three municipalities in Vale do Jequitinhonha. *Research, Society and Development*, 9(9), e979998049. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.8049>.

Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(2), e02694-16. <https://doi.org/10.1128/aem.02694-16>.

EFSA Panel On Biological Hazards (Biohaz). (2015). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13, n. 1, 3940. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3940>.

EFSA Panel on Biological Hazards (Biohaz). (2022). Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Allende, A. The efficacy and safety of high-pressure processing of food. *EFSA Journal*, 20, e07128. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7128>.

Fadillah, A., Van Den Borne, B. H., Poetri, O. N., Hogeveen, H., Slijper, T., Pisestyani, H., Schukken, Y. H. (2023). Evaluation of factors associated with bulk milk somatic cell count and total plate count in Indonesian smallholder dairy farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1280264. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1280264>.

Fagundes, H., Pompeu, L. D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F. D. (2011). Microbiological analysis and somatic cell counts in raw milk from farms of São Paulo State, Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 3542-3545. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.722>.

Gould, L. H., Mungai, E., Behravesh, C. B. (2014). Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, *11*, 545–551. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1650>

Jackson, K. A., Gould, L. H., Hunter, J. C., Kucerova, Z., Jackson, B. (2018). Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. *Emerging Infectious Diseases*, *24*, 1116. <https://doi.org/10.3201/eid2406.171051>

Jenkins, T. C., McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal Of Dairy Science*, *89*, 1302-1310. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72198-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72198-1).

Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., et al. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, *98*, 2944–2948. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9123>.

Jones, G., Lefèvre, S., Donguy, M. P., Nisavanh, A., Terpant, G., Fougère, E., et al. (2019). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Eurosurveillance*, *24*, 1900305. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305>.

Jurado, A., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P. (2024). Prevalence of virulence-and antibiotic resistance-associated genotypes and phenotypes in *Staphylococcus aureus* strains from the food sector compared to clinical and cow mastitis isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1327131. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1327131>

Kim, J., Schmidt, K. A., Phebus, R. K., Jeon, I. J. (1998). Time and temperature of stretching as critical control points for *Listeria monocytogenes* during production of mozzarella cheese. *Journal of Food Protection*, *61*, 116-118. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.1.116>

Komaragiri, M. V., Erdman, R. A. (1997). Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein. *Journal of Dairy Science*, 80, 929-937. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76016-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76016-8).

Lehotová, V., Antálková, V., Medved'ová, A., Valík, L. (2021). Quantitative Microbiological Analysis of Artisanal Stretched Cheese Manufacture. *Applied Sciences*, 11, 2680. <https://doi.org/10.3390/app11062680>.

Loiola Nunes, F., Sirqueira Mendonça, J. K., Pereira Dias, B., Ribeiro da Silva, E. P., Teles Aguiar, N., Ferreira dos Santos, A. J., Ribeiro-Júnior, J. C. (2024). Microbiological Quality and Safety of Brazilian Mozzarella Cheese During Production Stages. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0135>.

Lakhundi, S., Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/cmr.00020-18>.

Martin, N. H., Trmcic, A., Hsieh, T. H. (2016). *The Evolving Role of Coliforms as Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods*. Sec. Food Microbiology. v.7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>.

Márquez-González, M., Osorio, L. F., Velásquez-Moreno, C. G., García-Lira, A. G. (2022). Thermal Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in Quesillo Manufactured from Raw Milk. *International Journal of Food Science*, 2022(1), 2507867. <https://doi.org/10.1155/2022/2507867>

Mehany, E. S. N., El-Shafaie, M. A., Fahim, K. M., Sallam, S. S. (2021). Relationship between somatic cell count and different microbial and chemical quality parameters of bulk tank milk. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9, 1660-1668. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1660.1668>

Montgomery, D. C., Runger, G. C. (2021). *Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros*. 4ª ed., Rio de Janeiro, RJ, Brasil: LCT.

Neave, F. K., Dodd, F. H., Kingwill, R. G., Westgarth, D. R. (1969). Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *Journal of Dairy Science*, 52, 696-707. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86632-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86632-4).

Ntuli, V., Sibanda, T., Elegbeleye, J. A., Mugadza, D. T., Seifu, E., Buys, E. M. (2023). Chapter 30 - Dairy production: microbial safety of raw milk and processed milk products. In. Knowles, M. E., Anelich, L. E., Boobis, A. R., Popping, B. (Eds.), *Present knowledge in food safety*, Academic Press, 439-454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00076-7>.

O'Callaghan, T. F., Hennessy, D., McAuliffe, S., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Dillon, P., Stanton, C. (2018). Corrigendum to “Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation”. *Journal of Dairy Science*, 101, 8615. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-101-9-8615>.

Oliver, S. P., Calvino, L. F. (1995). Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *Journal of Animal Science*, 73, 18-33. https://doi.org/10.2527/1995.73suppl_218x.

Papademas, P., Bintsis, T. (Eds.). (2017). *Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics*. John Wiley & Sons.

Pineda, A. P. A., Campos, G. Z., Pimentel-Filho, N. J., Franco, B. D. G. D. M., Pinto, U. M. (2021). Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. *Frontiers in Microbiology*, 12, 666922. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.666922>.

Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E., Ferreira, M. A. S. S. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.004>

Poutrel, B., Bareille, S., Lequeux, G., Leboeuf, F. (2018). Prevalence of mastitis pathogens in France: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 9, 1-3. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000522>

Rodriguez, M., Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Posada, G. D., Zurera, G. (2011). Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals. *Food Control*, 22(6), 874-882. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.015>.

Ricci, A., Alinovi, M., Martelli, F., Bernini, V., Garofalo, A., Perna, G., Mucchetti, G. (2021). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy matrices involved in mozzarella di Bufala Campana PDO cheese. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581934>.

Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety* (3rd ed., pp. 1-20). CRC Press.

Rudolf, M., Scherer, S. (2001). High incidence of *L. monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 91-98. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00413-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00413-x).

Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100, 10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.

Ryser, E. T., Marth, E. H. (Eds.). (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd ed.). CRC Press.

Schukken, Y., Wilson, D., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34, 579-596. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003028>.

Silva, N. F. N., Aguiar, K. S., Pimentel Filho, N. J., Ferreira, I. E. P., Troiani, C. A. L.; Tribst, A. A. L., & Carvalho, A. F. (2020). Milk quality, production process and physicochemical characteristics of Porungo, an artisanal cheese from the state of São Paulo, Brazil. *Journal of Dairy Research*, 87, 480-483. <https://doi.org/10.1017/S0022029920001016>.

Srithanasuwan, A., Intanon, M., Chaisri, W., Suriyasathaporn, W. (2023). In Vitro Bacterial Competition of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* against Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Mastitis Milk. *Antibiotics*, 12, 600. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030600>.

Vasek, O. M., Pimentel-Filho, N. J. (2019). Quesos artesanales ancestrales. In M. J. Stadnik, A. C. Velho, S. E. Zorrilla (Eds.), *Desarrollo sostenible en la producción agroalimentaria* (pp. 193-208). CCA/UFSC.

Verraes, C., Claeys, W., Cardoen S., Daube, G., De Zutter, L., Imberechts, H., et al. (2014). A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows. *International Dairy Journal*, 39, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.010>.

Vieira, S. (2018). *Estatística básica – edição revista e ampliada*. 2ª ed. São Paulo, SP, Brasil: Cengage. 272 p.

Wagner, S., Erskine, R. (2013). Antimicrobial drug use in mastites. In. Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M, (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 519-528. <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch30>.

Zahumenská, J., Zigo, F., Kováčová, M., Ondrašovičová, S., Hisira, V., Mihok, T., Farkašová, Z. (2024). Influence of different milking methods on milk quality based on somatic cell count and basic composition. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 31, 198-204. <https://doi.org/10.26444/aaem/187170>.