

ANA BEATRIZ SANTO MACHADO

**AVALIAÇÃO DO pH E VERIFICAÇÃO DA SUA
RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE
MICRORGANISMOS NO QUEIJO DE AZEITÃO
AO LONGO DO PROCESSO DE MATURAÇÃO**

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Coorientadora: Dra. Rosália Maria Rodrigues dos Santos Furtado

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2020

ANA BEATRIZ SANTO MACHADO

**AVALIAÇÃO DO pH E A SUA RELAÇÃO COM O
DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS
NO QUEIJO DE AZEITÃO AO LONGO DO
PROCESSO DE MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, perante o Despacho de Nomeação Nº. 244/2020, no dia 23 Outubro, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Cristina Roseiro

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Coorientadora: Dra. Rosália Maria Rodrigues dos Santos Furtado

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos
no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

Aos meus pais, Fernanda e José
e à minha irmã Maria

Agradecimentos

O presente trabalho é fruto da colaboração e da influência de muitas pessoas, devido a isso, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a realização do mesmo.

Em primeiro lugar, começo por agradecer à Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, pela prontidão e ajuda ao aceitar orientar a elaboração deste trabalho.

À Dra. Rosália Maria Rodrigues dos Santos Furtado por me orientar na execução das tarefas inerentes ao estágio, pelos conhecimentos transmitidos durante a realização do mesmo e por me ajudar na elaboração desta tese, sendo incansável na resolução dos problemas que foram surgindo ao longo da elaboração da mesma e por ter estado sempre do meu lado.

À Doutora Maria Isabel da Silva Santos, que aceitou primeiramente ser minha orientadora de estágio e de tese, mas por ter saído da Faculdade, teve de deixar de o ser na teoria, mas não deixou de o ser na prática, acompanhando-me sempre, ajudando-me em tudo, tirando todas as minhas dúvidas, reunindo-se comigo na sua casa a qualquer hora e transmitindo todos os conhecimentos que adquiri tanto na elaboração deste trabalho como nas suas aulas, transmitindo o gosto por esta área.

À Engenheira Ana Rita Pisco Lopes por ter permitido que a realização do estágio fosse efetuada nas instalações da queijaria que dirige e por ter disponibilizado os queijos para a realização deste trabalho.

Às trabalhadoras da Queijaria, tenho a agradecer por todo o apoio e companheirismo durante o estágio. Foram uma simpatia, acolheram-me e fizeram-me sentir dentro da família, ajudando-me em todas as tarefas e ensinando-me tudo o que sei ao nível da laboração fabril.

À Engenheira Cristina Belo Correia responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge por me ter recebido como estagiária e por toda a simpatia e apoio e quero ainda a agradecer a todas as pessoas do laboratório, por me ajudarem e ensinarem as técnicas e por estarem a meu lado sempre que precisava.

À Doutora Carla Mota pela ajuda preciosa na elaboração dos cálculos estatísticos.

À minha querida irmã Maria Machado, um obrigado muito especial por me ter ajudado, incansavelmente, ao longo deste percurso e, principalmente, na formulação desta

tese, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida, estando sempre ao meu lado e por ser mais do que a melhor irmã do mundo, por ser a minha melhor amiga, companheira e do longe fazer perto.

Ao meu namorado Pedro, por me acompanhar nesta jornada e por me apoiar sempre que precisava e por estar sempre comigo, mesmo quando tinha vontade de desistir me incentivava não me deixando ir abaixo.

Às minhas melhores amigas Raquel Moreira, Raquel Ferreira, Filipa Leitão e Raquel Ruano por me terem acompanhado nesta longa jornada e por terem-na tornado única e tão especial. Obrigada por todos os momentos, não teria escolhido outras pessoas para passar estes anos.

E por último, mas não menos importante, um enorme agradecimento aos meus pais, por estarem sempre do meu lado e por permitirem que tudo isto fosse possível e que o sonho se tornasse realidade.

Resumo

Atualmente, é de extrema importância tomar medidas para prevenir as doenças de origem alimentar. O leite e produtos derivados têm relevância por serem muito consumidos na nossa sociedade. Cada vez mais, os consumidores são bastante exigentes relativamente aos produtos que consomem. A fim de atingir a qualidade dos produtos consumidos, deve-se selecionar matérias-primas de qualidade e garantir que os processos de fabrico cumpram regras de higiene e todos os requisitos para que se fabrique um produto final seguro. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a possível correlação entre a variação de pH e a existência de microrganismos, assim como a variação dos mesmos ao longo do processo de maturação em queijos recolhidos numa queijaria fabricante de queijos de pasta mole da região de Azeitão, onde se produz queijos DOP (Denominação de origem protegida) e queijos não DOP. Foram analisadas 125 amostras de queijo, efetuando-se determinações de pH, na totalidade das amostras (37 DOP e 89 não DOP) ao longo de 20 dias, que corresponde ao período da cura do queijo. Em 31 queijos de lotes diferentes (11 DOP e 20 não DOP) foram efetuadas determinações microbiológicas, nomeadamente Microrganismos totais a 30°C, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Este estudo evidenciou que os queijos em análise apresentavam boa qualidade microbiológica por não apresentarem *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em 1g, apesar da carga microbiana ser elevada, não foram identificadas estirpes patogénicas. Foram constatados valores superiores ao limite relativamente a Microrganismos Totais a 30°C, Estafilococos coagulase positiva e *Escherichia coli*. Constatou-se relação entre o valor de pH e a presença de microrganismos sendo que a meio do processo de maturação é quando estes estão mais elevados. Denotou-se correlação positiva entre Microrganismos Totais a 30 °C com *Escherichia coli* e correlação, igualmente positiva, entre *Escherichia coli* e Estafilococos coagulase positiva, constatando assim que a presença dos microrganismos potencia outros microrganismos por ser um ambiente favorável ao crescimento dos mesmos. Em relação ao pH verificou-se correlação negativa com valores de Microrganismos Totais a 30°C e entre pH e *Escherichia coli*, sendo favorecidos desta forma por pH mais baixos.

Palavras-chave: Queijo de Azeitão, qualidade microbiológica, pH, maturação.

Abstract

Nowadays it is extremely important to take precautions about food-borne infections because they can cause disease in humans. Milk and milk products are relevant because they are very consumed in our society. More and more consumers are very demanding in the products they consume. In order to ensure the quality of the products consumed, quality raw materials must be selected and the manufacturing processes must comply with hygiene rules and all the requirements for the manufacture of a safe final product. The present study had as main objectives to evaluate the possible correlation between the pH variation and the existence of microorganisms as well as their variation along the maturation process and to determine the presence of pathogenic microorganisms in cheeses. The cheese samples were obtained from a cheese factory in Azeitão, where PDO cheeses and non-PDO cheeses were produced, in the number of 126. All pH determinations were carried out of the samples (37 DOP and 89 non-DOP) over the course of 20 days, which correspond to the cheese curing period. In 31 cheeses from different lots (11 DOP and 20 non-DOP), microbiological determinations were performed, trying to identify bacteria as total Microorganisms at 30°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.

This study evidenced that the cheeses in analysis had good microbiological quality in general because they did not present *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in 1g, although the microbial load is high, no pathogenic strains have been identified. Values above the limit were found for Total Microorganisms at 30°C, coagulase positive *Staphylococci* and *Escherichia coli*. A relationship was found between the pH value and the presence of microorganisms, and in the middle of the maturation process is when they are highest. There was a positive correlation between Total Microorganisms at 30 °C with *Escherichia coli* and an equally positive correlation between *Escherichia coli* and *Staphylococcus* coagulase positive, thus confirming that the presence of the microorganisms potentiates other microorganisms because it is a favorable environment for their growth. Regarding pH, there was a negative correlation with values of Total Microorganisms at 30°C and between pH and *Escherichia coli*, being favored in this way by lower pH.

Key-words: Azeitão cheese, microbiological quality, pH, maturation.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos e acrónimos

% - Por cento

® - Marca registada

& – E

cm – Centímetro

g – Gramas

g/l – grama por litro

mm – Milímetro

ml – Mililitro

nm- Nanômetro

µm – Micrómetros

kg/hab – kilograma por habitante

mV - milivolts

a.C. – Antes de Cristo

AFSSA - Agência francesa de Segurança dos Alimentos, do francês *Agence Française*

ARCOLSA - Associação Regional dos Criadores de Ovinos Leiteiros da Serra da Arrábida

ASAE - Autoridade Segurança Alimentar e Económica

APT - Água Peptonada Tamponada

a_w- Atividade da água

BAL - Bactérias Ácido Láticas

BAM - Bacteriological Analytical Manual

BPF- Boas Práticas de Fabrico

BPH – Boas Práticas de Higiene

BPM – Batimentos por Minuto

B4 - Oficialmente Indemne a Brucelose

°C – Graus Célsius

CAC - *Codex Alimentarius Commission*

CDC - “Center for Disease Control”

DAN - Departamento de Alimentação e Nutrição

DGADR - Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

DGV - Direção Geral de Veterinária

DOP - Denominação de Origem Protegida

DSAVR - Direções de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais

EC - European Commission

EFSA - European Food Safety Authority

Eh - potencial de óxido-redução

ELFA - Enzyme Linked Flurescent Assay

EN - Norma Europeia, do inglês *European Standard*

EUA - Estados Unidos da América

EURL - Laboratório e Referência da União Europeia, do inglês (*European Union Reference Laboratory*)

FAO- Food and Agriculture Organization

FSANZ - Food Standards Australia New Zealand

HACCP - Hazard Analysis Critical Control Points

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

HPA - Agência de Proteção da Saúde, do inglês *Health Protection Agency*

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IDF - International Dairy Federation

IDFA – International Dairy Foods Association

IEC - Comissão Eletrotécnica Internacional, do inglês *International eletrotecnical comission*

IGP - Indicação Geográfica Protegida

INE - Instituto Nacional de Estatística

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P

IOM - Institute of Medicine

IPAC - Instituto Português de Acreditação

ISO - Organização Internacional de Normalização, do inglês *International Organization for Standardization*

LDL – Lipoptoreína de baixa densidade

LMO2 - Kit VIDAS *Listeria monocytogenes*

NMP - Número Mais Provável

NSLAB - Bactérias do Ácido Lático não starter, do inglês Non-Starter Lactic Acid Bacteria

NP - Norma Portuguesa

PCC - Ponto Crítico de Controlo

PEG - Poli Etileno Glicol

pH - Potencial Hidrogeniónico

PNCA - Plano Nacional de Colheita de Amostras

RFV - Valor Relativo da Fluorescência, do inglês *Relative Flurescence Value*

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

SMEDP - Métodos Standard para Análise de Produtos Lácteos, do inglês *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*

SLM - Kit VIDAS Salmonella

spp. - Várias espécies, do inglês *species*

SPR - Cone do kit VIDAS

TS - Tripsona Sal

UE - União Europeia

UFC - Unidade Formadora de Colónias

USDA - Departamento da Agricultura dos Estados Unidos da América, do inglês *United States Department of Agricultura*

UK - Reino Unido, do inglês United Kingdmon

VRBG - Agar com Cristal Violeta, Bilis e Glucose, do inglês *Violet Red Bile Glucose Agar*

VTEC - Escherichia coli produtor de verotoxina

Índice Geral

Índice de Figuras	I
Índice de Tabelas	I
Índice de Gráficos	II
Capítulo I	IV
1. Atividades do estágio curricular	IV
1.1. Queijaria Santiago	IV
1.2. Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge	VI
Capítulo II	1
I – Introdução	1
II – Revisão Bibliográfica	2
1. História do Queijo	2
2. Produção e consumo de queijo em Portugal	6
3. Queijo de Azeitão	9
3.1. Área Geográfica de produção do Queijo de Azeitão	9
3.2. Características sensoriais do Queijo de Azeitão	10
3.3. Características químicas do Queijo de Azeitão	11
3.4. Matérias-primas do Queijo de Azeitão	11
3.4.1. Cardo	11
3.4.2. Cloreto de Sódio	12
3.4.3. Leite de ovelha	12
3.5. Processo de Fabrico do Queijo de Azeitão	14
3.5.1. Receção das matérias-primas	15
3.5.2. Filtração	17
3.5.3. Adição de sal	17
3.5.4. Aquecimento e adição de cardo	17
3.5.5. Coagulação	18
3.5.6. Corte da Coalhada	18
3.5.7. Dessoramento	19
3.5.8. Enchimento e Moldagem	19
3.5.9. Prensagem	19
3.5.10. Primeira fase de maturação	20
3.5.11. Primeira Lavagem	21
3.5.12. Segunda fase de maturação	21
3.5.13. Segunda lavagem	21
3.5.14. Terceira fase de maturação	21
3.5.15. Embalagem e Rotulagem	21
3.5.16. Conservação	23

3.6.Segurança alimentar e o queijo	23
3.6.1.Perigos Físicos	24
3.6.2.Perigos Químicos	25
3.6.3.Perigos Biológicos	25
3.7.Sistema de HACCP da técnica de fabrico do queijo de Azeitão.....	26
3.8.Fatores que influenciam a flora microbiana dos queijos	28
3.8.1.Fatores Intrínsecos	28
3.8.1.1. Atividade da Água	28
3.8.1.2. Acidez	30
3.8.1.3. Nutrientes do Leite	31
3.8.1.4. Microbiota	31
3.8.1.5. Potencial de oxidação-redução	32
3.8.2.Fatores Extrínsecos	33
3.8.2.1. Temperatura	33
3.8.2.2. Humidade Relativa	35
4. Influência do Consumo de queijo no consumidor	35
4.1.Microbiota Benéfica	36
4.2.Microbiota de Deterioração	37
4.2.1.Microrganismos totais a 30 °C	38
4.2.2.Bactérias da família Enterobacteriaceae	38
4.2.3.Microrganismos Patogénicos	39
4.2.3.1. <i>Salmonella</i> spp.	39
4.2.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	41
4.2.3.3. Estafilococos coagulase positiva .	43
Capítulo III	46
Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação	46
1. Objetivos	46
2. Materiais e Métodos	47
2.1.Amostras em Estudo	47
2.2.Análise Físico-Química	48
2.2.1.Medição do pH	48
2.3.Análises Microbiológicas	48
2.3.1.Preparação das amostras	48
2.3.2.Preparação das diluições decimais	49
2.4.Ensaio Microbiológicos	50
2.4.1.Fundamento da metodologia utilizada	50
2.4.2.Contagem de microrganismos totais a 30C°, estafilococos coagulase positivos e <i>Escherichia</i> <i>Coli</i>	52
2.4.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> species	54

2.4.4. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	55
2.4.5. Pesquisa de Enterotoxina Estafilocócica	57
2.4.5.1. Preparação da amostra	57
2.4.5.2. Extração	57
2.4.5.3. Diálise-Concentração	58
2.4.6. Análise de Dados e Tratamento Estatístico	59
3. Apresentação de Resultados	59
3.1. Resultados das análises microbiológicas	59
3.1.1. Contagens dos Microrganismos Totais a 30°C, EC e STA	59
3.1.2. Pesquisa dos Microrganismos Patogénicos	64
3.1.3. Pesquisa de Enterotoxina Estafilocócica	64
3.2. Resultados das análises físico – químicas: pH	65
3.3. Correlação entre os Valores de pH e as Contagens de Microrganismos	66
4. Discussão	66
4.1. Discussão dos Resultados das Análises Microbiológicas	66
4.1.1. Contagem de Microrganismos	66
4.1.1.1. Microrganismos Totais a 30°C	67
4.1.1.2. <i>Escherichia Coli</i>	69
4.1.1.3. Estafilococos coagulase positiva	72
4.1.2. Pesquisa de Microrganismos Patogénicos	74
4.1.2.1. <i>Salmonella species</i>	75
4.1.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	75
4.1.2.3. Pesquisa de Enterotoxinas Estafilocólicas	76
4.2. Discussão dos Resultados de Análise de pH	77
4.3. Discussão dos Resultados da Correlação entre valores de pH e as Contagens de Microrganismos	78
5. Conclusão	78
6. Bibliografia	80

Índice de Figuras

Figura 1. Regiões produtoras do Queijo de Azeitão (DGADR, 2019)	10
Figura 2. Processo de fabrico do Queijo de Azeitão (original)	15
Figura 3. Diagrama esquemático das diluições decimais sucessivas	49
Figura 4. Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de AC ST e EB, através do método automatizado TEMPO®	54
Figura 5. Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de Salmonella spp. através do método imunoenzimático VIDAS®	55
Figura 6. Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de Listeria monocytogenes através do método imunoenzimático VIDAS® (Fonte: original da autora)	56
Figura 7. Concentração do extrato através de membrana de diálise submersa em PEG (Fonte: Laboratório de Microbiologia, DAN, INSA)	58
Figura 8. Equipamento VIDAS (Fonte: Laboratório de Microbiologia, DAN, INSA)	59

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição aproximada de determinados parâmetros no leite de vaca, cabra e ovelha.....	14
Tabela 2. Limites máximos das contagens de microrganismos por mililitro	16
Tabela 3. Valores de a_w para determinados microrganismos	29

Tabela 4. Valores mínimos de a_w para microrganismos relevantes no queijo	30
Tabela 5. Temperaturas cardiais para o crescimento microbiano	33
Tabela 6. Temperaturas mínimas, ótimas e máximas de crescimento de microrganismos patogénicos em queijos	34
Tabela 7. Interpretação do resultado do teste RFV.....	51
Tabela 8. Médias, desvio padrão e amplitudes das contagens de microrganismos totais a 30 °C, Escherichia coli e Estafilococos coagulase positiva para total de Queijos, DOP e NDOP (log)	60
Tabela 9. Resultados das contagens de microrganismos a 30°C, Escherichia coli e Estafilococos coagulase positiva no leite	61
Tabela 10. Correlações entre o pH e os microrganismos	66

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Produção de queijo a nível mundial no ano de 2018 (em 1000 toneladas). 4	
Gráfico 2. Receitas da indústria de fabrico de produtos lácteos em Portugal entre 2011 e 2023	4
Gráfico 3. Produção de leite em Portugal entre 2015 e 2018	6
Gráfico 4. Evolução da produção de queijo em Portugal	7
Gráfico 5. Distribuição da Produção de determinados queijos DOP em Portugal no ano de 2014.....	8

Gráfico 6. Contagens de microrganismos a 30°C por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão)61

Gráfico 7. Distribuição dos resultados das contagens (log) de Microrganismos a 30 °C por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11).....62

Gráfico 8. Contagens de *Escherichia coli* por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão).....62

Gráfico 9. Distribuição dos resultados das contagens (log) de *Escherichia coli* por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11).....63

Gráfico 10. Contagens de *Estafilococos* coagulase positiva por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão).....63

Gráfico 11. Distribuição dos resultados das contagens (log) de *Estafilococos* coagulase positiva por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)64

Gráfico 12. pH por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão)65

Gráfico 13. Distribuição dos valores de pH por intervalo de tempo e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)65

Capítulo I

1. Atividades do estágio curricular

O estágio curricular incidiu-se na área de produção, controlo da segurança e qualidade alimentar. Este teve lugar na Queijaria Santiago, situada em Palmela, onde adquiri novos conhecimentos ao nível do fabrico de queijos de Azeitão e de requeijão. Estagiei também em simultâneo, no Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa na área de controlo e qualidade alimentar, desenvolvendo e aperfeiçoando técnicas laboratoriais anteriormente adquiridas durante o curso e aprendendo novas metodologias. O estágio decorreu num período de 6 meses, entre o dia 1 de Outubro de 2017 e o dia 1 de Março de 2018.

Os objetivos deste estágio incluíram a consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos do curso de Medicina Veterinária, em especial na área de produção, controlo, segurança e qualidade alimentar, bem como a aprendizagem de novos saberes e aplicação prática de todos os conhecimentos adquiridos.

1.1. Queijaria

A Queijaria foi criada em 1918. É formada por cinco unidades de produção. Cada unidade tem a responsabilidade de recolha, produção, embalagem e distribuição de todos os produtos.

Durante o estágio realizei várias tarefas, nomeadamente a receção do leite, durante a qual se recolhia uma pequena quantidade do mesmo para um recipiente esterilizado e se efetuavam vários testes para verificar se o leite estava em condições para ser utilizado no processo de fabrico do queijo.

O primeiro teste que se efetuava, era a técnica da fervura do leite, que consistia na colocação de uma reduzida quantidade de leite num tubo de ensaio e com a ajuda de uma pinça de madeira e de um isqueiro, se procedia ao aquecimento deste até à sua fervura. No caso de se verificar a coagulação do leite, significava que não tinha qualidade para ser usado no fabrico.

Um outro teste, igualmente efetuado era a pesquisa de inibidores, com o objetivo de despistar a presença de antibióticos no leite. O teste utilizado nesta unidade fabril era o Delvotest, o qual consiste num teste de inibição de crescimento microbiano de amplo

espectro, para a detecção de substâncias antimicrobianas no leite. O teste utiliza a bactéria *Geobacillus stearothermophilus*, que cresce e fermenta a glucose, virando o indicador de pH (púrpura de bromocresol) do meio de cultura para amarelo na ausência de resíduos de antibióticos e não cresce, permanecendo o meio de cor púrpura, quando se encontram presentes esses resíduos. Para realizar este teste era apenas necessário colocar cerca de 0,1 ml de leite no *kit*, com a ajuda de uma pipeta descartável, sendo necessárias três horas de incubação a 64 °C.

Realizava também a técnica da determinação da acidez titulável, com o intuito de aferir a acidez do leite, de forma a observar se este teria sido adulterado ou se haveria algum problema de higienização e manejo. Para a sua realização transferia-se 10 mL de leite para um frasco, com a ajuda de uma pipeta e de uma pompete, de seguida, adicionavam-se 6 a 7 gotas de solução alcoólica de fenolftalína a 1% que era o indicador da reação, e procedia-se à titulação com NaOH 0,1 N. A titulação finalizava quando o leite atingia a cor rosa. Se a acidez fosse baixa, poderia significar ter sido adicionada água ao leite para aumentar o volume do mesmo. Pelo contrário, se esta fosse elevada, poderia indicar um problema de higiene ou um processo inflamatório em algum animal, como mastite, pois nesse caso ocorre um aumento no número de microrganismos. Por último, observava o valor de pH do leite, recorrendo a uma tira colorimétrica de medição de pH.

Para além da receção do leite, participava também ativamente em todas as atividades laborais, tais como a introdução da massa nos moldes, a remoção da mesma dos moldes depois de prensada, a colocação do queijo nos suportes, a viragem dos queijos, a sua cintagem com cintas de pano ou de papel vegetal, a sua embalagem, rotulagem e pesagem.

Para efetuar o presente trabalho realizei, diariamente, a medição do pH de um queijo de cada lote laborado nesse dia e dos anteriormente selecionados, com o auxílio de um medidor de pH portátil.

1.2. Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

O Departamento de Alimentação e Nutrição [DAN] realiza atividades nas áreas de segurança alimentar e nutrição, sendo laboratório de referência para a saúde, nos domínios da segurança alimentar e nutrição. O DAN tem implementado um sistema de gestão da qualidade, encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação [IPAC] segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2018 (NP EN ISO/IEC 17025, 2018). O Laboratório de Microbiologia desenvolve a sua atividade na área da Segurança Alimentar nomeadamente no que se refere à prevenção de doenças com origem nos alimentos, através de vigilância e prestação de serviços diferenciados, sobretudo no que se refere a contaminação microbiológica dos alimentos prontos a consumir e a identificação dos fatores potencialmente responsáveis por essa contaminação.

Durante a permanência no laboratório, foi desenvolvido o trabalho analítico de estudo em queijo de Azeitão, que culminou com a elaboração desta Dissertação, após uma fase de treino e ensaios de controlo de qualidade.

Capítulo II

I - Introdução

Atualmente, os consumidores preocupam-se, cada vez mais, com a qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos, esperando que estes sejam apetecíveis, nutritivos e seguros do ponto de vista da saúde pública. Contudo, dado que o leite é um alimento muito rico em nutrientes, constitui um ótimo meio de crescimento para os microrganismos. Podem ser encontrados no leite patogénicos humanos bem como microrganismos responsáveis pela deterioração do leite, a par com bactérias do ácido láctico (BAL) responsáveis por processos fermentativos (Gaglio et al., 2019). Desta forma, torna-se necessário obter leite que reúna as condições de higiene adequadas para a elaboração de produtos lácteos como o queijo de Azeitão, havendo uma crescente preocupação em controlar os microrganismos que possam estar presentes no mesmo (Pfeiffer, 2004).

O fabrico de queijo constitui um processo de concentrar os componentes do leite, nomeadamente as caseínas e gordura. O leite é um género alimentício que se caracteriza por ser facilmente perecível, utilizando-se vários métodos tradicionais de conservação como, por exemplo, processamento térmico (pasteurização ou esterilização), concentração, desidratação, acidificação ou diminuição do pH. Embora o objetivo inicial da produção de queijos fosse a conservação dos principais constituintes do leite, o queijo evoluiu para se tornar uma excelente e apreciada especialidade gastronómica, além de ser altamente nutritivo (Martins & Vasconcelos, 2004; Fox & McSweeney, 2017). Pelo elevado teor de humidade, valor de pH e manipulação a que é sujeito no processo de fabrico, o queijo apresenta grande suscetibilidade a fenómenos microbiológicos e bioquímicos que podem afetar o seu rendimento, qualidade e vida útil (Perry, 2004). Deste modo, para garantir a qualidade e o rendimento do queijo é extremamente importante selecionar um leite com uma boa composição tanto quantitativa como qualitativa, no que se refere à riqueza em componentes úteis para o fabrico do mesmo, e com qualidade microbiológica visto que, estes fatores, vão influenciar, fortemente, todo o processo tecnológico do queijo (Baião, 2007).

O trabalho fez parte da seguinte comunicação:

Marcos, S., Barreira, M.J., **Machado, A.B.**, Furtado, R. e Santos, M.I. (2018). “Quantificação de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijos de Origem Nacional Fabricados com Leite Cru de Ovelha”. *Poster* apresentado no 5º Simpósio Nacional SPASS 2018, Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura - Perigos Microbiológicos - Estratégias e Perspetivas, IV Painel Interpretar e decidir – critérios microbiológicos, Lisboa, 27 de setembro. Publicado no Livro de Resumos P4-P02, página 65.

II – Revisão bibliográfica

1.História do Queijo

É possível, afirmar que o queijo é um dos alimentos preparados mais antigos do mundo, pois, apesar de não existir uma data precisa para o início desta arte, acredita-se que a sua origem remonta a milhares de anos antes do nascimento de Cristo (Fox, McGuffey, Shirley & Cogan, 2011). Devido ao avanço tecnológico e ao conhecimento científico, foram encontrados achados arqueológicos que demonstram a presença de queijos elaborados através do leite de vaca e cabra entre 6.000 a 3.000 a.C. Contudo, embora haja evidências relativamente à sua produção e consumo, que comprovam a sua antiguidade, não existe qualquer prova conclusiva acerca da sua origem, sendo a mesma, uma incógnita (International Dairy Foods Association [IDFA], 2019; Perry, 2004;). A literatura disponível, relativamente a este assunto, é vaga e apresenta inúmeras versões que tendem a decifrar o início, assim como, os responsáveis pela produção de queijo, desde a versão mitológica, onde o queijo teria sido descoberto por um dos filhos de Apolo, Aristeu, Rei da Arcádia, passando por um mercador árabe que expôs, o seu cantil, feito de estômago de cabra seco, contendo leite de cabra ao calor do deserto, enquanto cavalgava, até às formas mais sofisticadas de fabrico utilizadas atualmente (IDFA, 2019; Perry, 2004).

Os gregos foram um dos primeiros povos na Europa a incluir o queijo na sua dieta, utilizando apenas leite de cabra e ovelha, de modo a rentabilizar os animais que criavam. No entanto, foi o povo romano, aquando da expansão do seu Império, o maior responsável pela difusão de queijo pelo resto da Europa, tendo sido em Roma que nasceu o comércio

do queijo (Perry, 2004; Fox *et al.*, 2011). A expansão do Império Romano contribui para a difusão do consumo de queijo por toda a Europa e tornou-o um alimento importante, tanto do ponto de vista nutricional como comercial. Assim, passou a ser uma das iguarias mais apreciadas pela nobreza, quer pelas inúmeras variedades fabricadas, mas também, pelas propriedades atribuídas tornando-o num alimento indispensável para os diferentes povos (O'Connor, 1993; Blom & Weréen, 2002; Perry, 2004; Fox *et al.*, 2011).

As grandes produções de queijo tiveram o seu início no século XIX, com o surgimento de uma indústria queijeira nos Estados Unidos da América (EUA) em 1851, no estado de Nova Iorque, motivada grandemente pela Revolução Industrial (Johnson, 2017; IDFA, 2019). Mais tarde, no início do século XX, nasceu a primeira queijaria industrial na Europa, especificamente em França (Reed, 1983; Godfrey & West, 1996; Perry, 2004), país que, ao longo dos anos, se especializou na produção de diferentes tipos de queijo, sendo tradicionalmente conhecido como um dos maiores apreciadores desta iguaria, produzindo cerca de 400 tipos de queijo (Perry, 2004). O processo de fabrico de queijo é, como referido anteriormente, bastante antigo, sendo comum a quase todas as variedades, tendo sido reportados mais de 1000 tipos diferentes, apresentando uma longa história que se reflete na ampla gama de tecnologias utilizada no seu fabrico (Sandine & Elliker 1970; Perry, 2004; McSweeney, Ottogalli & Fox, 2017).

Atualmente, é na Europa que se verifica o maior consumo e a maior produção de diferentes tipos de queijo, seguindo-se os EUA. Cada país possui regulamentação própria, adequada para cada tipo de queijo, garantindo, assim, a autenticidade de cada produto, que permite que haja um reconhecimento mundial (Perry, 2004; Statista, 2019a). No Gráfico 1 observa-se a produção de queijos a nível mundial em 2018, que comprova que a Europa é o maior produtor com uma produção de 10160 mil toneladas.

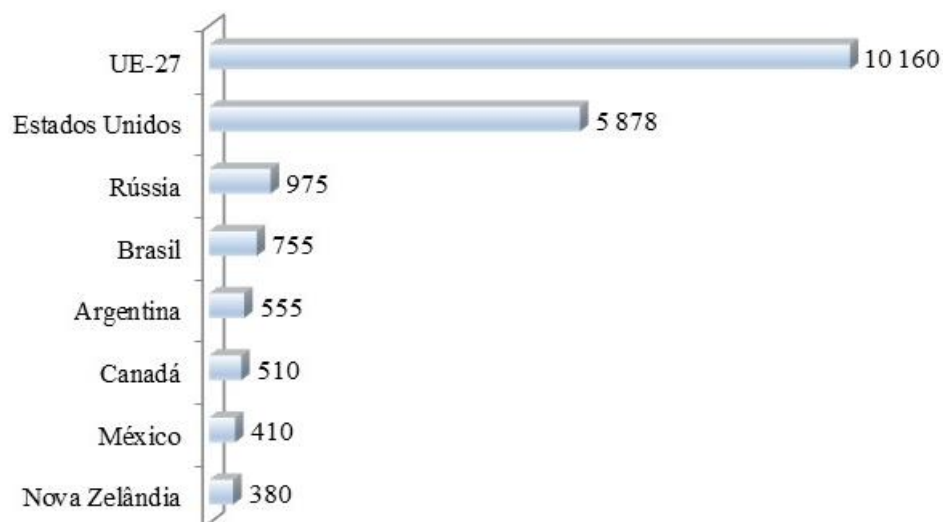


Gráfico 1 - Produção de queijo a nível mundial no ano de 2018 (em 1000 toneladas) (Fonte: Statista, 2019a)

Em Portugal, de acordo com Statista (2019b), prevê-se um ligeiro decréscimo, de 2,3% para o período 2019-2023, na indústria de produtos láteos, como se pode observar no Gráfico 2.

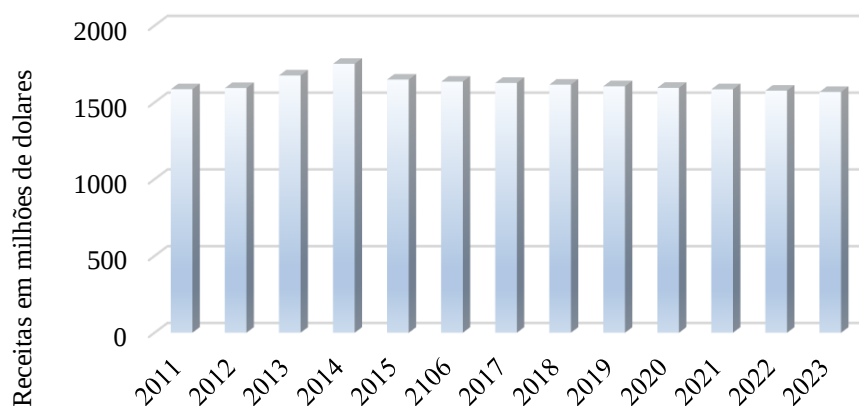


Gráfico 2 - Receitas da indústria de fabrico de produtos lácteos em Portugal entre 2011 e 2023 (Fonte: Statista, 2019b)

Existe uma ampla variedade de tipos de queijo no mundo, mas o processo básico de fabrico é comum, independentemente de variações tais como a origem do leite, as técnicas de produção e o tempo de maturação. Este processo envolve a transformação de uma matéria-prima líquida num produto final sólido por precipitação das proteínas presentes no leite (Hutkins, 2006). Um dos fatores de classificação dos queijos é a espécie de origem podendo ser leite puro de ovelha, cabra, vaca ou mistura de leite dessas várias

espécies (Burkhalter, 1981; McSweeney *et al.*, 2017). O leite de ovelha e cabra são os que apresentam menor expressão de produção em relação ao de bovino, sendo que apresentam uma produção mundial de 2% cada, comparativamente a 85% de leite de vaca. Porém, leite de cabra e ovelha são bastante importantes nos países Mediterrâneos e na região dos Balcãs, onde a produção de queijo recorre maioritariamente ao leite proveniente destes animais (McSweeney *et al.*, 2017).

A queijaria tradicional apresenta diversos fatores de variabilidade mantendo-se a utilização de leite cru, predominantemente de pequenos ruminantes, estando a riqueza bioquímica do mesmo relacionada com a qualidade e tipicidade do produto final, sendo que muitos aspetos físico-químicos e microbiológicos podem ser determinados pelas condições específicas de cada região, o que é de extrema relevância (Martins & Vasconcelos, 2004). É importante, desta forma, o consumidor saber a origem do que está a comprar pois implica variações no queijo, sendo que já foi demonstrado que os produtos lácteos têm sofrido adulterações como adição de soro ou água, retirada de componentes e, até mesmo mistura de leite de espécies diferentes (Mašková & Paulíčková, 2006).

Os queijos, independentemente da espécie proveniente, podem receber o estatuto de Denominação de Origem Protegida (DOP), denominação que reflete um património coletivo e pode ser usada por todos os produtores de uma certa região, sendo protegidos pela União Europeia (UE) ao abrigo de vários acordos internacionais (McSweeney *et al.*, 2017). Essa classificação designa e identifica um produto como sendo originário de uma certa região, com características inerentes da mesma onde foi produzido (Regulamento 1151, 2012). Em Portugal encontram-se protegidos queijos de origens diferentes e modos de produção específicos sendo que existem 11 queijos classificados como DOP, nomeadamente Queijo de Azeitão, Queijo Serra da Estrela, Queijo de Cabra Transmontano, Queijo de Évora, Queijo de Nisa, Queijo do Pico, Queijo do Rabaçal, Queijo São Jorge, Queijo de Serpa, Queijos da Beira Baixa (Queijo de Castelo Branco, Queijo Picante da Beira Baixa e Queijo Amarelo da Beira Baixa) e Queijo Terrincho (McSweeney *et al.*, 2017; Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR], 2019).

2. Produção e consumo de queijo em Portugal

A maioria do leite produzido na União Europeia [EU] é leite de vaca sendo que, tanto este leite como o de ovelha e cabra são, maioritariamente, utilizados para a produção de queijo. No ano de 2018 produziram-se 172,2 milhões de toneladas de leite sendo 97% correspondentes a leite de vaca. Este valor indica que de ano para ano tem havido um aumento da produção de leite em cerca de 1,9 milhão de toneladas, tendo sido produzidas, no ano atrás mencionado, 10,3 milhões de toneladas de queijo. De facto, existe grande produção de queijo e manteiga a corresponder a dois terços do leite total (União Europeia [UE], 2019).

Em relação a Portugal, a produção de leite tem-se mantido constante nos últimos anos como revela o Gráfico 3, no qual se denota que o leite de vaca é o mais produzido, seguido do de ovelha e, por último o de cabra (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2019).

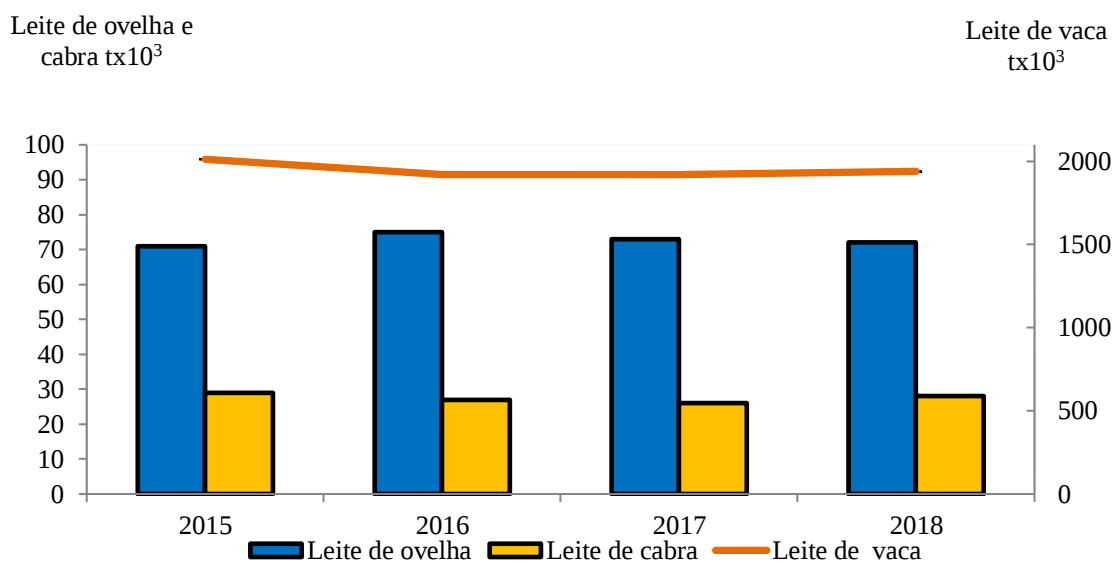


Gráfico 3 - Produção de leite em Portugal entre 2015 e 2018 (INE, 2019a)

A produção de queijo em 2018 foi de cerca de 84 mil toneladas registando-se um pequeno aumento, de 0,8% face ao ano anterior. Em 2017 o aumento registado foi de 3,7%. Esta evolução resultou da maior produção, em 2017, de queijo de vaca que aumentou para 62,5 mil toneladas, de queijo de cabra que aumentou 21,5%, com a produção de 2,9 mil toneladas e queijo de mistura que atingiu 6 mil toneladas, mais 1,7% que no ano de 2016. Em 2018 a produção de queijo de vaca caiu para 60,5 mil toneladas, mas a de queijo de cabra continuou a aumentar, 3,8 mil toneladas, o que corresponde a 29% de aumento (ver Gráfico 4) (INE, 2019).

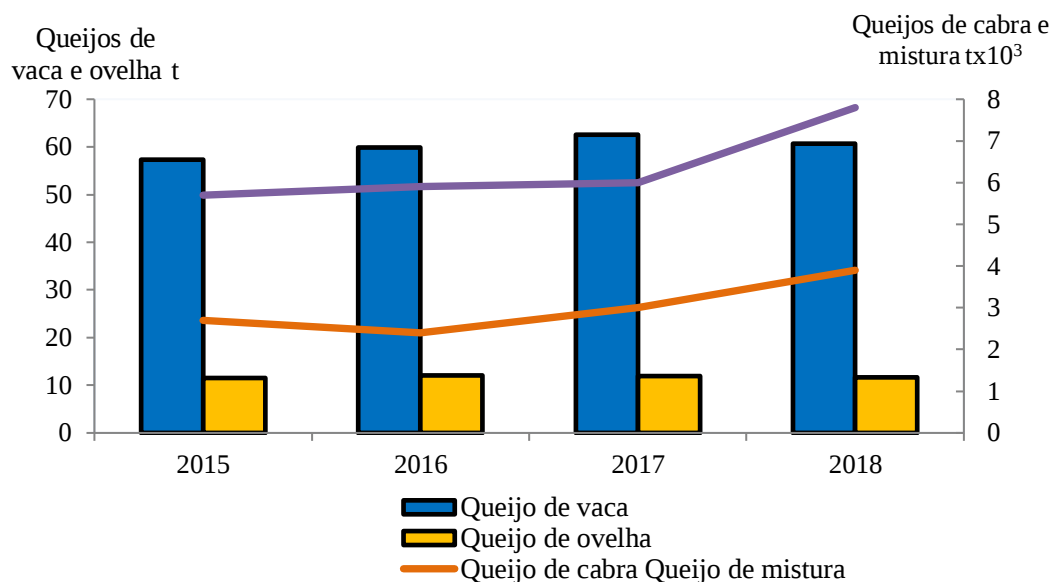


Gráfico 4 - Evolução da produção de queijo em Portugal (Fonte: INE, 2019b)

Relativamente à produção de Queijo de Azeitão, esta tem aumentado ao longo dos últimos anos sendo que em 2002 se denotavam valores de 78 toneladas ao passo que em 2009 se registaram valores de 126,40 toneladas, o que comprova o aumento referido (DGADR, 2016). No ano de 2015 verificaram-se valores de produção de 148 toneladas, em 2017 registaram-se valores de 217.662 e no ano de 2018 registaram-se valores de 226.13 toneladas, continuando a observar-se, desta forma, um aumento na sua produção (DGADR, 2016, DGADR, 2017, DGADR, 2018). A distribuição de vários queijos DOP em Portugal encontra-se refletida no Gráfico 5, representando a produção do queijo de Azeitão 10% do total da produção de queijos DOP, em 2015 (DGADR, 2016).

A produção de manteiga aumentou 4,1% no ano de 2017, com uma produção de 32 mil toneladas. Em relação à produção de queijo o aumento situou-se nos 3,7% tendo sido produzidas cerca de 83 mil toneladas. Esta evolução na produção de queijo resultou da maior produção em 2017 de queijo de vaca que aumentou para 62 mil toneladas, de queijo de cabra que aumentou 21,5%, com a produção de 2,9 mil toneladas e queijo de mistura que atingiu 6 mil toneladas, mais 1,7% que no ano de 2016 (INE, 2017).

Relativamente à produção de Queijo de Azeitão, esta tem aumentado ao longo dos últimos anos sendo que em 2002 se denotavam valores de 78 toneladas ao passo que em 2009 se registaram valores de 126,40 toneladas, o que comprova o aumento referido (Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR], 2016). No ano de 2015 verificaram-se valores de produção de 148 toneladas, em 2017 registaram-se valores de 217.662 e no ano de 2018 registaram-se valores de 226.13 toneladas, continuando a observar-se, desta forma, um aumento na sua produção (DGADR, 2016, DGADR, 2017, DGADR, 2018). A distribuição de vários queijos DOP em Portugal encontra-se refletida no gráfico abaixo, representando a produção do queijo de Azeitão 10% do total da produção de queijos DOP, em 2015 (DGADR, 2016).

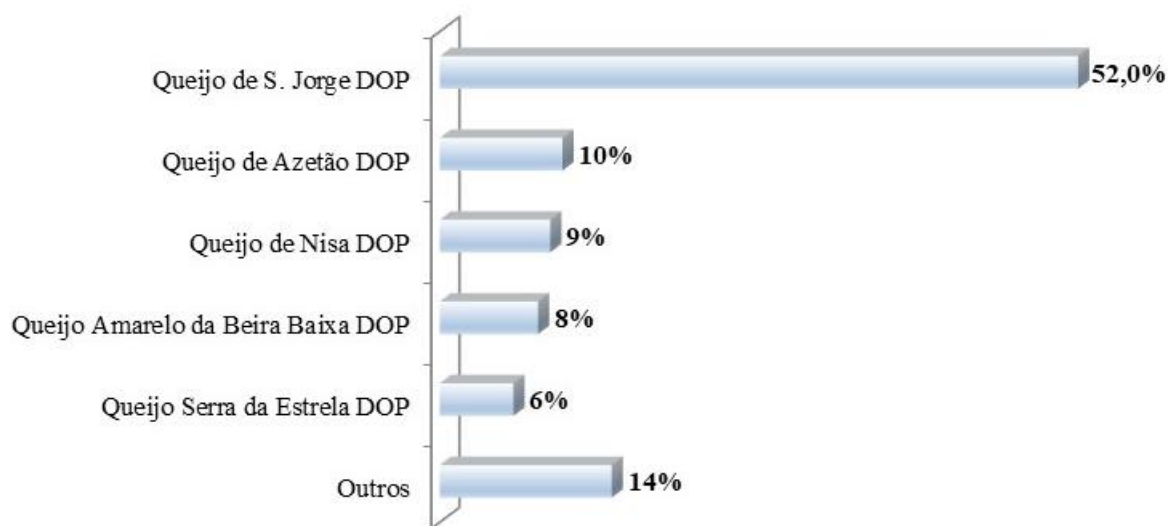


Gráfico 5 - Distribuição da Produção de determinados queijos DOP em Portugal no ano de 2014 (Fonte: DGADR, 2016)

3. Queijo de Azeitão

A origem do Queijo de Azeitão remonta ao século XIX. Por volta do ano 1830, Gaspar Henriques de Paiva, oriundo das Beiras, chegou a Azeitão para se dedicar à agricultura. Com ele, levou o seu rebanho de ovelhas leiteiras e todos os anos chamava um queijeiro da sua terra natal para que produzisse o Queijo Serra da Estrela. No entanto, verificou-se que os queijos possuíam características diferentes, embora o processo de fabrico do queijo fosse o mesmo. É à Serra da Arrábida, com condições ótimas para a criação do gado ovino, que se deve a singularidade do queijo de Azeitão. Posteriormente, na geração seguinte, pela mão de Frederico Franco da Paiva, o Queijo de Azeitão, como foi desde logo batizado, começou a ser produzido em grande escala para ser comercializado e é nesta mesma altura, que se dá o reconhecimento merecido a este produto de excelente qualidade, ganhando inúmeros prémios (DGADR, 2019).

Os produtores de queijo desta região do País uniram esforços no sentido de promover a defesa da sua produção, tendo obtido a sua primeira recompensa através do Decreto Regulamentar nº 49/86 de 2 de outubro o qual criou a Região Demarcada do Queijo de Azeitão abrangendo os concelhos de Palmela, Sesimbra e Setúbal. A Associação Regional de Criadores de Ovinos Leiteiros da Serra da Arrábida (ARCOLSA), ficou com a competência da atribuição do uso da Denominação de Origem Protegida (DOP) «Queijo de Azeitão», conferida através do Despacho nº 6400/2003 (2ª série) de 1 de Abril.

Este queijo foi reconhecido como denominação de origem pelo Despacho nº15/94, tendo o mesmo determinado as condições em que o seu uso pode ser efetuado. Posteriormente e através do Regulamento (CE) n.º 1107/96, de 12 de Junho, foi registado «Queijo de Azeitão» como Denominação de Origem Protegida (DOP).

3.1. Área Geográfica de produção do Queijo de Azeitão

O Queijo de Azeitão é um queijo DOP, produzido a partir de leite de ovelha não pasteurizado, sendo produzido na região da Serra da Arrábida, no sudoeste de Portugal, demarcado pelos municípios de Setúbal, Palmela e Sesimbra (Franco 1981; DGADR, 2019). O Queijo de Azeitão apenas pode ser fabricado com leite de ovelha produzido nas regiões abaixo indicadas no mapa da Figura 1 (Decreto Regulamentar nº49/86).

Figura 1 - Regiões produtoras do Queijo de Azeitão (DGADR, 2019)



De acordo com o descrito no Decreto Regulamentar 49/86 de 2 de Outubro de 1986, o Queijo de Azeitão caracteriza-se por ter uma forma cilíndrica baixa (prato), regular com abaulamento lateral e igualmente na face superior, sem bordos perfeitamente definidos, sendo admitidos dois tamanhos diferentes. O Queijo pode caracterizar-se por ter tamanho normal quando tem um diâmetro de 8 cm a 11 cm, 3 a 5 cm de altura e 250g de peso. Contudo, pode caracterizar-se por ser de tamanho pequeno quando possui um diâmetro de 5 a 7 cm, 3 a 5 cm de altura e 100g de peso.

3.2. Características sensoriais do Queijo de Azeitão

O Queijo de Azeitão é um queijo curado que apresenta uma crosta com consistência maleável, bastante mole, inteira, lisa e fina, sendo uniformemente amarelada. O mesmo apresenta uma pasta semimole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada, uniforme, com textura fechada, amanteigada, com zona de corte facilmente deformável, chegando mesmo a escorrer, um aspeto cremoso, untuoso, com poucos ou nenhuns olhos (Decreto Regulamentar 49/86). Este queijo possui um sabor inigualável picante e, simultaneamente, acidificado e salgado, podendo o mesmo dever-se às condições edafoclimáticas da região em que é produzido, que influenciam a qualidade dos pastos, assim como à utilização como coagulante de uma flor de cardo espontânea *Cynara cardunculus*, L. (Reis & Malcata, 2011; DGADR, 2019).

3.3. Características químicas do Queijo de Azeitão

O queijo referido contém um teor de humidade de 63% a 69%, quando referido ao queijo isento de matéria gorda, e um teor de gordura de 45% a menos de 60%, quando referido ao resíduo seco. Em relação ao coeficiente de maturação, este apresenta um valor mínimo, que deve ser respeitado, de 35 g de matéria azotada em 100 g de queijo (Decreto Regulamentar 49/86).

3.4. Matérias-primas do Queijo de Azeitão

As matérias-primas usadas para a produção do Queijo de Azeitão são bastante simples, leite de ovelha, sal e cardo. O cardo provoca a agregação de caseínas e transforma o leite líquido num gel consistente. Pela mistura dos 3 ingredientes e com o auxílio das bactérias do ácido láctico (BAL), naturalmente presentes no leite, é possível originar ácido láctico, fundamental para a expulsão do soro da coalhada e consequentemente para a determinação do teor de humidade, sabor, cor e textura final do queijo, assim como determinação dos microrganismos envolvidos no processo de maturação (Fox, Cogan, Timothy & Guinee, 2017; Gomes *et al.*, 2019; Martins & Vasconcelos, 2004).

3.4.1. Cardo

O cardo pertence à família *Asteraceae*, espécie *Cynara cardunculus* L. Cresce em locais rochosos e é uma planta abundante na Península Ibérica, sendo que a sua atividade coagulante do leite é devida à presença das cardosinas, que são proteínases aspárticas isoladas dos carpelos. A utilização das proteínases vegetais como coagulantes do leite tem despertado interesse, uma vez que são enzimas naturais que podem substituir o coalho de origem bovina e a quimosina recombinante (Gomez *et al.*, 2001). As proteases aspárticas destabilizam a estrutura coloidal da caseína, ligação peptídica da caseína k, que se caracteriza por ser quantitativamente pouco relevante mas que tem grande responsabilidade no que se refere à estabilidade do complexo caseínico do leite (Martins & Vasconcelos, 2004; Cruz, Buriti, Souza, Faria & Saad, 2009; Brasil, Nicolau, Cabral & Silva, 2015).

3.4.2. Cloreto de Sódio

No processo de produção de queijos é de extrema importância a adição de Cloreto de Sódio (NaCl), vulgarmente conhecido como sal, não estando apenas relacionado com o sabor, mas igualmente com o processo de cura, interferindo nas reações bioquímicas e no desenvolvimento da microbiota láctica. Além disso, é um inibidor de microrganismos indesejáveis (Rocha, 2004; Korakhashvili & Jeiranashvili, 2016). A presença de sal num determinado queijo influencia a atividade da água, controlando a atividade microbiana e enzimática. Além disso, influencia a humidade do queijo e a sua textura (Guinee, 2004; Korakhashvili & Jeiranashvili, 2016). O sal contribui diretamente para o sabor do queijo, característica que sobressai na degustação do consumidor.

3.4.3. Leite de ovelha

Em Portugal, a utilização do leite cru de ovelha é exclusivo para a produção de queijo. Os pequenos ruminantes, como por exemplo as ovelhas, são animais de reprodução sazonal. Deste modo, entre as diferentes épocas podem suceder alterações notórias na composição do leite de ovelha (Park & Haenlein, 2006). Um leite de qualidade para queijaria deve ser rico em determinados fatores de rendimento como gordura e, especialmente, proteínas (caseínas), devendo ter um bom equilíbrio mineral relativamente à proteína, nomeadamente cálcio e fósforo, sendo o cálcio de extrema importância para a coagulação enzimática pois vai permitir a agregação de toda a caseína. Tendo em vista a segurança do consumidor, é ainda importante utilizar um leite isento de patogénicos e outras substâncias indesejáveis, como inibidores ou contaminantes de origem química. Por fim, sendo que se trata de leite cru, deve conter um teor microbiano reduzido, predominantemente útil (Martins & Vasconcelos, 2004). Quanto melhor a qualidade microbiológica, maior a probabilidade de obter um queijo de qualidade, já que a multiplicação de microrganismos indesejáveis podem originar defeitos no produto final como produção de gás ou proteólise intensa (Martins & Vasconcelos, 2004; Paula, Carvalho & Furtado, 2009). Comparativamente ao leite de cabra, o leite de ovelha apresenta maiores valores de proteína bruta (5,5%), gordura (5,9%), lactose (4,8%) e caseína (4,7%), sendo que no leite de cabra os valores são de 3,7%, 3,8%, 4,1% e 2,4%, respetivamente (Balthazar *et al.*, 2017).

O leite cru deve advir de um efetivo que esteja indemne de brucelose e tuberculose, que não apresente sintomas ou doenças contagiosas transmissíveis ao homem pelo leite, que não seja suscetível de conferir características organoléticas anormais, que não tenha perturbações visíveis do estado geral de saúde, não apresentando doenças do aparelho genital, enterite com diarreia e febre ou inflamação/ferida visível do úbere e que não tenha sido tratado com substâncias transmissíveis ao leite e prejudiciais à saúde humana (Noronha, 2003; Regulamento 853, 2004).

Ao comparar as propriedades físico-químicas com leites de outras espécies, podemos salientar que o leite de ovelha apresenta maior viscosidade, bem como índice de refração e acidez titulável. A acidez titulável normal do leite de ovelha está compreendida na faixa de 16 a 25 graus Dornic, e a densidade média a 15 °C é de 1,036 (Park & Haenlein, 2006). As seis principais proteínas encontradas no leite de vaca também estão presentes no leite de ovelha: caseína α 1, caseína α 2, caseína β , caseína κ , α -lactalbumina, β -lactoglobulina. As caseínas que são as principais proteínas do leite, constituindo cerca de 80% das proteínas totais, são as únicas proteínas que coagulam, e que permitem o fabrico do queijo. Devido ao alto teor de caseínas do leite de ovelha, a coagulação enzimática processa-se mais rapidamente, relativamente ao leite de vaca ou de cabra, sendo a taxa de formação da coalhada, consequentemente maior (Park & Haenlein, 2006; Brasil *et al.*, 2015).

A lactose, é o principal glícido e representa 4,9% no leite de ovelha, sendo superior ao valor encontrado no leite de cabra, o qual é de 4,4%. Para o fabrico de queijo, a lactose é utilizada como principal substrato pela microbiota, com formação do ácido láctico, garantindo que ocorram todas as fermentações lácticas necessárias à maturação do queijo (Grandpierre, Ghilsfi & Thouvenot, 1988; Le Jaouen, 1990; Fox & McSweeney, 2017; McSweeney *et al.*, 2017).

Em relação à quantidade de gordura, o leite de ovelha apresenta maior quantidade comparativamente a outras espécies pecuárias, sendo o leite de ovelha mais rico em ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados que o leite de vaca (Park & Haenlein, 2006). A gordura é um dos componentes mais importantes do leite de ovelha, influenciando as características físicas e organoléticas e está presente no leite sob a forma de glóbulos. É composta maioritariamente por Acilgliceróis, na forma de triglicéridos de cadeia média, mas também por outros mais simples, lípidos complexos e componentes lipossolúveis (Luquet, 1985; Park & Haenlein, 2006). Para além disso, o leite de ovelha apresenta maior proporção de glóbulos de gordura menores, sendo o seu coalho suave

para o fabrico dos queijos e para a digestão dos consumidores (Park & Haenlein, 2006).

A Tabela 1 apresenta a composição dos leites de vaca, cabra e ovelha.

Tabela 1 – Composição aproximada de determinados parâmetros no leite de vaca, cabra e ovelha. Adaptado de: Balthazar et al., (2017).

Parâmetro	Leite de vaca	Leite de cabra	Leite de ovelha
Humidade (g/100g)	87,9 ± 0,5	87,6 ± 0,7	82,9 ± 1,4
Gordura (g/100g)	3,3 ± 0,2	3,8 ± 0,1	5,9 ± 0,3
Cinza (g/100g)	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Lactose (g/100g)	4,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Proteína (g/100g)	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	5,5 ± 1,1
Caseína (g/100g)	3,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,7 ± 0,5
Caseína α1 (%)	39,7	5,6	6,7
Caseína α2 (%)	10,3	19,2	22,8
Caseína β (%)	32,7	54,8	61,6
Caseína κ (%)	11,6	20,4	8,9

3.5. Processo de Fabrico do Queijo de Azeitão

A produção de queijo baseia-se na remoção de água e alguns minerais do leite, ficando apenas um concentrado de gorduras e caseínas. Como anteriormente referido, os constituintes principais são o leite, o agente de coagulação (o coalho vegetal), a microbiota e o sal. O coagulante vegetal (cardo) é adicionado com o objetivo de agregar as proteínas e assim, transformar o leite líquido numa estrutura de gel muito firme (Fox *et al.*, 2017). Para a obtenção de um queijo saboroso e seguro, é necessário o cumprimento das diferentes etapas de processo assim como, o conhecimento e identificação dos principais perigos que podem ocorrer em algumas delas, tendo em conta o HACCP que deve ser implementado e cumprido no fabrico do mesmo. Na figura 2 é apresentado o esquema de fabrico com os respetivos pontos críticos de controlo.

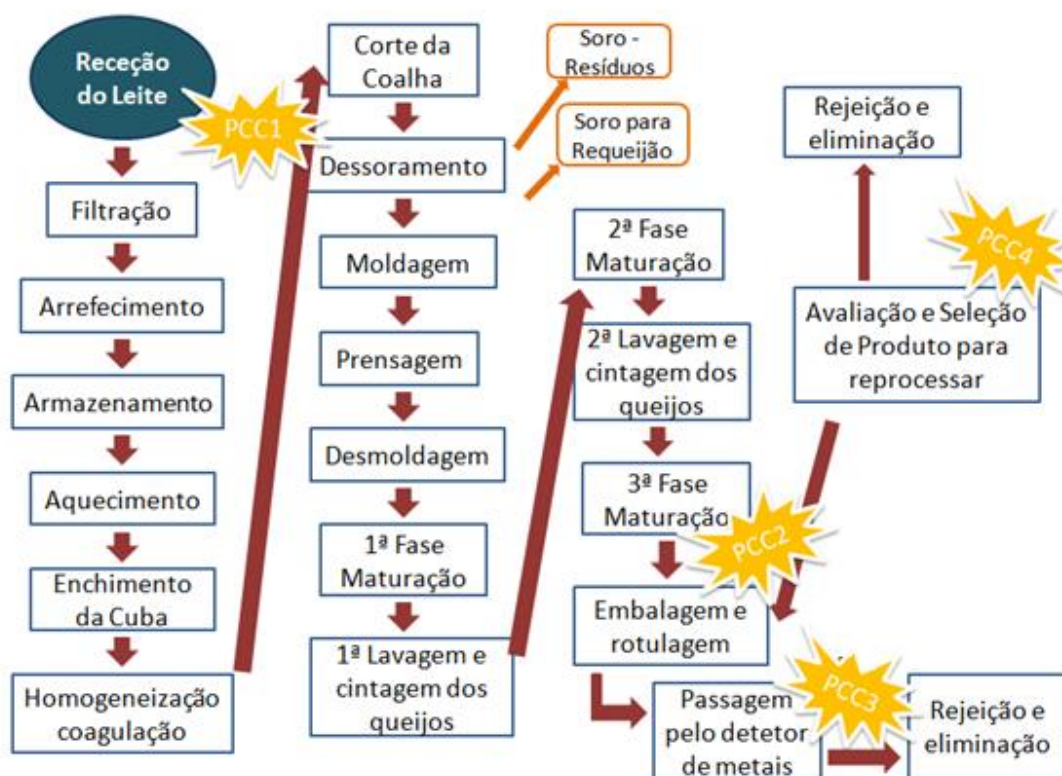


Figura 2 – Processo de fabrico do Queijo de Azeitão (original).

3.5.1. Receção das matérias-primas

A provisão do leite de ovelha é feita pelos produtores da região de acordo com a legislação aplicável, nomeadamente o Regulamento 853/2004. Os rebanhos devem estar saneados devendo apresentar o passaporte de rebanho onde consta o estatuto sanitário de Oficialmente Indemne a Brucelose (B4), documento que é emitido pelas Direções de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais (DSAVR), ou por organizações de produtores pecuários (Direção Geral de Veterinária [DGV], 2012).

Os produtores devem estar atentos ao estado geral de saúde dos animais e sempre que estes, apresentem sinais que sugiram doenças contagiosas transmissíveis ao Homem através do leite, devem ser separados para local próprio e o seu leite rejeitado. Também, devem respeitar os intervalos de segurança sempre que utilizem qualquer substância, que seja prejudicial à saúde humana e à qualidade do queijo (Martins & Vasconcelos, 2004; DGV, 2012).

O equipamento de ordenha e as instalações onde o leite é armazenado, manuseado e, posteriormente, arrefecido devem ser construídos de modo a que se evitem possíveis

contaminações do mesmo com substâncias que possam ter ação nociva para o Homem (Martins & Vasconcelos, 2004; Regulamento 853/2004: Ray & Bhljnia, 2014). Segundo o Regulamento 853/2004, o leite recolhido na ordenha deve ser arrefecido imediatamente a uma temperatura não superior a 8 °C ou ser entregue na queijaria no prazo máximo de duas horas, onde é então sujeito a arrefecimento. O leite de ovelha recebido para produção do queijo referido deve obedecer aos critérios do Regulamento (CE) 853/2004. Visto que vai ser usado para o fabrico de queijo, será desejável que satisfaça o Regulamento (CE) nº 2073/2005 e as suas alterações relativamente à pesquisa de microrganismos, especificados na Tabela 2.

Tabela 2- Limites máximos das contagens de microrganismos por mililitro. Adaptado de: Veiga (2012); Portaria 533/93 de 21 de Maio; Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Microrganismo (por mililitro)	Contagem
Microrganismos a 30°C (Reg 853/2004)	≤500 000 u.f.c./ml
Salmonella spp. (Reg 2073/2005)	Não detetado em 25ml de produto
Listeria monocytogenes (Reg 2073/2005)	Não detetado em 25ml de produto

Visto que o leite não é adicionado de culturas *starter* vai apresentar uma maior biodiversidade, o que vai permitir que o queijo desenvolva a textura e o sabor característicos. Ressalta-se, por consequência, a importância da qualidade e do controlo da matéria prima, assim como um período de maturação mínimo que garantam as características sensoriais e a segurança do produto final (Bachmann, Kruijswijk, Molenaar, Kleerebezem & van Hylckama Vlieg, 2009; Montel *et al.*, 2014; Araújo-Rodrigues, Tavarina, Santos, Alvarenga & Pintado, 2020).

3.5.2. Filtração

Primeiramente o leite é filtrado, antes de ser colocado na cuba onde sofre o processo de coagulação. O processo de filtração é importante para que se consigam remover partículas sólidas que ficam retidas no filtro com malha inferior a 1 mm (Franco, 1981; Ferreira, 2010; Korakhashvili & Jeiranashvili, 2016).

3.5.3. Adição de sal

O sal é um componente extremamente importante, visto que, para além de ser um agente sávido, é também um dos fatores que assegura a qualidade e segurança do queijo por baixar o a_w . A maioria dos microrganismos é inibida a partir de uma concentração de sal de 5%. Porém, *Estafilococos* coagulase positiva consegue sobreviver a concentrações superiores a 15% e *Listeria monocytogenes* sobrevive a concentrações de 20 a 30% por um período de 10 dias. A maior concentração de sal faz com que a atividade da água (a_w) seja reduzida, aumentando assim a segurança e qualidade do produto final. É ainda de salientar que o sal facilita a agregação da coalhada e extração de soro, ajudando na desidratação da coalhada (Noronha, 2003; Ganesan, Brown, Irish, Brothersen & McMahon, 2014). Nos queijos de Azeitão a concentração de sal é de cerca de 4% (Freitas & Malcata, 2000; Alves, Martins, Raymundo, & Barbosa, 2003). Usualmente, a adição de sal corresponde a 25 g/l, aproximadamente (DGADR, 2019).

3.5.4. Aquecimento e adição de cardo

O aquecimento é realizado em cubas de coagulação, a temperatura aproximada de 32 °C (Franco, 1981), que é a temperatura ótima para a atividade das enzimas do cardo. Seguidamente, o leite é mantido nas cubas de coagulação à temperatura de 30 °C, por um período de cerca de 45 mins (DGADR, 2019). O cardo, agente responsável pelo processo de coagulação, encontra-se desidratado e tem de ser previamente preparado para formar uma espécie de infusão na proporção de cerca de 0,5 g/l. No momento da incorporação no leite, a infusão é coada de forma a passar apenas a parte líquida, sendo adicionada quando o leite atinge uma temperatura de cerca de 30 °C nas cubas de coagulação.

3.5.5. Coagulação

A coagulação é a fase inicial do processo de transformação do leite em queijo, no qual o leite se desdobra em duas substâncias sendo as mesmas a coalhada, que consiste na substância sólida, e o soro que se caracteriza por ser a substância líquida. Este processo baseia-se na desnaturação da caseína, por ação das enzimas que estão presentes no coalho vegetal, neste caso em específico, as enzimas extraídas das flores do género *Cynara cardunculus* L. são proteases ácidas, pertencendo ao grupo das proteases aspárticas, com o nome de cipsosinas, cardosinas e cinarases, sendo que a caseína se vai agregar originando uma rede que se denomina de coalhada, a qual no seu interior possui uma grande quantidade de gordura, água, açúcar e alguns sais, passando outros constituintes para o soro, sendo o excesso de soro retirado no final da coagulação (DGADR, 2019; Noronha 2003).

Neste processo, o leite fica em repouso nas cubas de coagulação, que funcionam com um sistema de água quente, até atingir a consistência desejada. O controlo da temperatura é feito com o auxílio de termómetros incorporados na cuba ocorrendo a uma temperatura de cerca de 30 °C, num período de tempo entre os 45 e os 60 mins (DGADR, 2019; Ferreira, 2010; Fox *et al.*, 2017). É de extrema importância ter atenção a certos fatores como a temperatura, o pH do leite e o tempo de coagulação para que o processo ocorra da forma mais correta com os melhores resultados (Noronha, 2003).

3.5.6. Corte da Coalhada

O corte da coalhada é efetuado na vertical e na horizontal com o objetivo de facilitar a saída do soro, sendo realizada por liras que não podem ter qualquer espécie de ferrugem ou qualquer característica que possa contaminar a coalhada. O tipo de corte realizado vai caracterizar o tipo de queijo, sendo que quanto maior a duração e mais pequenos os fragmentos da coalhada maior o dessoramento e menor a humidade do produto final. A coalhada necessita de ter uma boa consistência para sofrer o corte e serem evitadas ao máximo as perdas de gordura e caseína (Noronha, 2003; Ferreira, 2010; Medina & Nuñez, 2017).

3.5.7. Dessoramento

O dessoramento pretende acelerar, de forma controlada, a expulsão do soro para que se consiga obter um produto moldável que mantenha a forma que se pretende com condições mínimas de conservação. Engloba um conjunto de ações como o corte, divisão controlada do gel para aumentar a superfície de expulsão de soro, agitação da coalhada e prensagem (Martins & Vasconcelos, 2004; Fagan, O'Callaghan, Mateo, & Dejmek, 2017).

De forma, a que a libertação do soro ocorra lentamente, a coalhada passa para um tecido poroso sendo trabalhada lentamente com as mãos, o que permite a separação dos grãos, até se separar a quantidade de soro desejada da massa. Este processo vai retirar o açúcar e humidade existentes em excesso, sendo crucial respeitar as Boas Práticas de Higiene (BPH) necessárias com o manuseamento da massa para que se evitem contaminações (Franco, 1981; Noronha, 2003).

3.5.8. Enchimento e Moldagem

Neste processo a massa da coalhada resultante do dessoramento é colocada em pequenos cinchos, com dimensões adequadas ao tamanho do queijo que é pretendido para dar ao mesmo a forma final, onde é comprimida manualmente, com força mas lentamente, continuando a haver dessoramento, até sair a quantidade de soro apropriada para uma boa fermentação ou cura do futuro queijo (Ferreira, 2010; Fagan *et al.*, 2017).

O arrefecimento da massa deve ser evitado para prevenir uma possível má fermentação e, em consequência disso, uma má qualidade do queijo. A moldagem do cincho é própria da queijaria, sendo que a experiência no processo realizado permite saber quando a massa está suficientemente dessorada (Noronha, 2003; Ferreira, 2010).

3.5.9. Prensagem

Neste processo, os queijos de 250 g, depois de comprimidos manualmente, são submetidos a uma prensagem adicional em equipamento próprio (Ferreira, 2010). O grande objetivo é melhorar a consistência, a textura e a forma do queijo eliminando totalmente o excedente do soro, sendo que o local da prensagem deve ser fresco e todo o material estar em boas condições higiénicas (Noronha, 2003; Fagan *et al.*, 2017). A

prensagem engloba duas fases sendo que a primeira ocorre por 30 min a uma pressão de 1,5 bar e a segunda fase por 15 min a uma pressão de 2,5 bar (Ferreira, 2010).

3.5.10. Primeira fase de maturação

A maturação é a última etapa do processo de fabrico na qual vão ocorrer numerosas alterações de natureza microbiológicas, físicas e químicas sendo o queijo mantido em condições de temperatura e humidade controladas. É nesta etapa que o queijo adquire as suas características de sabor, aroma e textura. A maturação engloba três processos sendo eles a proteólise, a lipólise e a glicólise com conversão da lactose em ácido láctico, conduzindo a uma degradação dos compostos em produtos primários e depois secundários, conferindo à coalhada características novas. A proteólise é considerada o processo mais importante na maturação do queijo, sendo muito importante para o desenvolvimento da textura e características organoléticas. Nesta a ação das cardosinas A e B vão fazer proteólise das caseínas, podendo o mesmo ser feito por plasmídeos do leite em menor escala (Martins & Vasconcelos, 2004; Paula *et al*, 2009).

Assim, após a sua produção e arrefecimento os queijos frescos permanecem encinchados e são colocados de forma ligeiramente inclinada, para que ocorra, ainda, alguma extração de soro remanescente que tenha ficado no seu interior, sendo, seguidamente, colocados na primeira câmara de maturação. Passadas aproximadamente 12 h os queijos são desenformados e voltados. Permanecem nesta câmara cerca de 10 dias a uma temperatura entre 10-15 °C, com humidade relativa entre 85-95% (Decreto Regulamentar 49/86; Ferreira, 2010). A temperatura a que ocorre a maturação tem uma grande influência na taxa de maturação e qualidade do queijo (Fox *et al.*, 2017). No decorrer deste processo ocorre a degradação de lípidos, ácidos gordos e glicerol. (Raynal-Ljutovac, Lagriffoud, Paccard, Guillet & Chilliard, 2008). A existência de pouca gordura no leite pode originar defeitos na textura e no sabor do queijo (Martins & Vasconcelos, 1993).

3.5.11. Primeira Lavagem

Durante a fase de maturação os queijos começam a exsudar com a produção de soro caracterizado por ser uma substância espessa, pegajosa com um cheiro desagradável. Assim, quando possuem as características desejadas, são retirados da primeira câmara de maturação e são lavados ou raspados para retirar essa substância. No final, são cintados com gaze ou tecido, quer se trate de queijos de 250 ou 100g, respetivamente (Ferreira, 2010). Durante todo o processo de maturação, os queijos são virados, periodicamente, e lavados, dependendo a frequência do aspeto da crosta do queijo, sendo que a mesma se deve manter lisa e limpa (DGADR, 2019).

3.5.12. Segunda fase de maturação

Após a lavagem e cintagem, são transferidos para uma segunda câmara de maturação, onde permanecem cerca de 10 dias, a uma temperatura entre os 11 e os 12 °C, com uma lenta corrente de ar e uma humidade relativa de 85 a 86%. Tal como, na fase de maturação anterior, os queijos devem ser voltados todos os dias e neste caso, sempre que as cintas se encontrem molhadas devem ser substituídas (Ferreira, 2010).

3.5.13. Segunda lavagem

No final da segunda fase de maturação quando os queijos apresentarem as características pretendidas, são sujeitos a uma segunda lavagem e voltam a ser cintados, mas desta vez, com uma cinta de papel vegetal (Ferreira, 2010).

3.5.14. Terceira fase de maturação

Nesta última fase de maturação os queijos são submetidos a temperaturas mais altas, entre os 15 e os 20 °C, e a uma humidade relativa de 60 a 75%, no período de 1 a 2 dias (Queijaria Santiago, comunicação pessoal, 2018).

3.5.15. Embalagem e rotulagem

O Queijo de Azeitão deve ser embalado em papel vegetal com o rótulo impresso ou colado no papel, com a respetiva marca de certificação. É fundamental que estes sejam adequadamente acondicionados e protegidos durante o transporte, para assegurar a qualidade e segurança do produto (Noronha, 2003; Ferreira, 2010).

Como acontece no caso de todos os géneros alimentícios é fundamental que o queijo contenha informação de acordo com o Regulamento (UE) nº 1169/2011 e suas alterações, que estabelece a base para garantir um elevado nível de defesa do consumidor no que se refere à informação sobre os géneros alimentícios, tendo em conta as diferenças de perceção e as necessidades de informação dos consumidores, assegurando simultaneamente o bom funcionamento do mercado interno.

Assim sendo, na rotulagem do Queijo de Azeitão devem constar parâmetros, tais como a denominação do género alimentício, a lista de ingredientes, a quantidade de certos ingredientes ou categorias de ingredientes, a data de durabilidade ou data limite de consumo, as condições especiais de conservação, o nome e endereço do fabricante, o país de origem e a declaração nutricional (Regulamento (UE) nº 1169/2011).

Desde 1992, que a UE tem vindo a desenvolver políticas específicas relativamente à qualidade e diversidade dos produtos agrícolas e géneros alimentícios tradicionais, no sentido de contribuir para o património cultural e gastronómico da União. Nesse sentido o Regulamento (UE) nº 1151/2012 de 21 de novembro estabelece um regime de indicações geográficas protegidas [IGP] e denominações de origem protegida [DOP] na qual o Queijo de Azeitão se inclui. Um produto que tenha a referência DOP deve satisfazer um certo número de condições, nomeadamente, ser originário da região designada, local ou país, ter qualidade ou características que se devam essencialmente ou exclusivamente a um meio geográfico específico e cuja produção, transformação e elaboração ocorram na área geográfica delimitada. Para os produtos poderem beneficiar do estatuto DOP devem obedecer a um caderno de especificações do qual devem constar pelo menos o nome do produto, a sua descrição incluindo as matérias-primas e as principais características físicas, químicas, microbiológicas ou organoléticas, a área geográfica e os elementos que provam que o produto é originário dessa área, a descrição do método de obtenção do produto, a relação entre a qualidade do produto e o meio geográfico, o nome e endereço das autoridades ou organismos que verificam a observância das disposições do caderno de especificações, as regras de rotulagem específicas do produto e eventuais exigências ditadas pelas disposições comunitárias ou nacionais (Regulamento (UE) nº 1151/2012; DGADR, 2019).

3.5.16. Conservação

A conservação do queijo é um aspeto a ter em consideração ao nível da segurança e qualidade do produto final. Deste modo, depois de o queijo ser fabricado e certificado, cabe ao produtor assegurar que até à comercialização do mesmo, são mantidas as condições de conservação adequadas nas diversas situações. No armazém devem ser mantidas temperaturas inferiores a 5 °C, no transporte máximo de 10 °C e, finalmente, no retalhista as temperaturas devem ser inferiores a 5 °C (Decreto Regulamentar 49/86, 1986).

3.6. Segurança alimentar e o queijo

Atualmente, é dada grande importância, por parte dos consumidores, à proveniência, qualidade e segurança dos alimentos. Quando um consumidor elege um determinado alimento espera que este seja seguro, não colocando em risco a sua saúde e o seu bem-estar. Estas questões deixaram de ser apenas questões técnicas e científicas, visto que os consumidores têm acesso fácil à informação e estão muito mais alerta, exigindo por parte das autoridades e dos operadores do setor alimentar medidas que garantam a sua segurança. Como resposta, foi implementado, a nível nacional e europeu, um sistema de controlo da qualidade e segurança desde a produção dos alimentos até ao consumidor final, que se traduz na aplicação de normas e legislação, e aplicação do sistema Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) (do inglês *Hazard Analysis Critical Control Points*), que permite identificar e controlar os perigos associados ao processo de fabrico. De acordo com a *Codex Alimentarius Commission* Segurança Alimentar é a “Garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com o uso a que se destina” (*Codex Alimentarius Commission* [CAC], 2003). De acordo com este documento, previamente à aplicação de um plano HACCP devem ser implementadas as BPH, as quais são denominadas no seu conjunto pré-requisitos e constituem a base para a implementação de um sistema HACCP (CAC, 2003). De acordo com a legislação europeia os operadores do sector alimentar são os principais responsáveis pela segurança dos géneros alimentícios sendo, por conseguinte necessário respeitar os requisitos explicitados no Regulamento (CE) nº 852/2004 bem como as regras específicas de higiene dos géneros alimentícios de origem animal indicadas no Regulamento (CE) nº 853/2004.

O queijo, como qualquer outro derivado do leite, bem como todos os alimentos, deve ser um produto seguro. A sua segurança pode ser posta em causa ao veicular agentes de natureza biológica, química ou física, que podem ser intrínsecos ao próprio alimento, ou que possam ter sido adicionados acidentalmente, tornando-se assim um perigo (Noronha, 2003; Andrade *et al.*, 2013; Kamala & Kumar, 2018).

O conceito de perigo na segurança alimentar foi definido pelo *Codex Alimentarius* como qualquer agente biológico, físico ou químico presente no alimento ou condição do alimento que possa causar um efeito adverso na saúde (CAC, 2003). Os perigos podem ser classificados tendo em conta a sua natureza em perigos físicos, químicos ou biológicos, tal como descrito de forma detalhada abaixo (CAC, 2003; Noronha, 2003).

3.6.1. Perigos físicos

Perigos físicos são geralmente objetos estranhos que se encontram no alimento e podem ter um impacto severo quando ingeridos inadvertidamente. A origem destes perigos é muito variável, podem ser objetos anormais presentes nas matérias-primas ou que sejam introduzidos nos produtos alimentares por via da manipulação a que eles estão sujeitos no decurso dos processos de fabrico, distribuição e comercialização. Podem resultar de defeitos dos equipamentos ou utensílios, de problemas com os materiais de embalagens e acondicionamento ou até dos operadores (Autoridade Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2009; QUALI, 2018a). Deste modo, entre os perigos físicos mais frequentes é possível relatar plásticos, vidros, madeiras, metais, objetos de uso pessoal, entre outros, pragas ou partes de pragas, sendo que estas podem veicular microrganismos patogénicos (ASAE, 2009; Ferreira, 2010; Mortimore & Wallace, 2013; Kamala & Kumar, 2018). O seu controlo passa essencialmente pelo conhecimento e cumprimento das BPH e Boas Práticas de Fabrico [BPF], sendo essencial para que se evitem situações como choque, asfixia, cortes ou até mesmo dentes partidos por determinados materiais (Mortimore & Wallace, 2013; QUALI, 2018a).

3.6.2. Perigos químicos

Muitos compostos químicos são contaminantes ambientais podendo chegar facilmente à cadeia alimentar em qualquer etapa da produção e do processamento de alimentos (Mortimore & Wallace, 2013). Deste modo, a via alimentar constitui uma das vias mais importantes de exposição a estes perigos (ASAE, 2009). Os perigos químicos têm a capacidade de causar doenças transmitidas pelos alimentos, embora afetem menos indivíduos quando comparados com os perigos biológicos. São geralmente associados a doenças crónicas podendo originar doenças agudas quando se encontram em níveis elevados (QUALI, 2018a).

Do conjunto de perigos químicos podem ser destacados os aditivos alimentares quando em concentrações incorretas, pesticidas, medicamentos veterinários (como antibióticos e promotores de crescimento), metais pesados (como o chumbo, cádmio e mercúrio) e químicos introduzidos durante o processo, como é o caso de produtos de limpeza, entre outros (Manual Forvisão – SAAIA, 2017). Assim, os perigos químicos podem ser carcinogénicos, mutagénicos ou teratogénicos ou tóxicos resultando em doenças severas e até na possibilidade de morte, relacionadas com o seu efeito biológico no corpo humano (QUALI, 2018a).

O aparecimento destes perigos químicos pode, igualmente, ocorrer quando os alimentos são sujeitos a processos térmicos em que a temperatura atingida é demasiado elevada ou pela exposição do mesmo a uma temperatura adequada mas durante um tempo demasiado prolongado que vai degradando o produto. O risco que potencialmente pode surgir para a saúde do consumidor aumenta quando os químicos não são controlados ou as proporções recomendadas de uso são excedidas (Manual Forvisão – SAAIA, 2017; QUALI, 2018a).

3.6.3. Perigos Biológicos

Comparando entre os três tipos de perigos, os perigos biológicos são aqueles que se afiguram um maior risco para a segurança alimentar. Este grupo de perigos compreende diversos microrganismos como as bactérias, os fungos, os vírus, os parasitas e algumas toxinas microbianas que estão comumente associados à incorreta manipulação dos alimentos por parte dos operadores e aos produtos crus contaminados utilizados como matéria-prima. Grande parte das contaminações por microrganismos acontece naturalmente nos locais onde são produzidos e podem ser destruídos por via de

processos térmicos. Nos casos, em que o processamento não prevê qualquer tratamento térmico, o controlo deve ser ainda mais eficaz, aplicando práticas adequadas e rigorosas ao nível da higiene durante a manipulação e armazenamento (QUALI, 2018a).

O queijo, o género alimentício sobre o qual incide este estudo, é um produto pronto a consumir, o qual não é geralmente sujeito a qualquer tratamento que permita garantir a sua segurança antes do consumo, podendo apresentar contaminações por microrganismos, incluindo patogénicos. Com efeito, a sua matéria-prima, o leite, é um produto altamente perecível e um excelente substrato, ao possuir características intrínsecas ótimas para o desenvolvimento de microrganismos (Kousta, Mataragas, Skandamis & Drosinos, 2010; Settanni & Moschetti, 2010; Johnson, 2017).

Apesar de poderem ser associados ao leite cru outros microrganismos, como vírus, parasitas e fungos, são as bactérias a maioria dos microrganismos isolados no leite cru, e são também elas, quando patogénicas, as responsáveis por um maior número de surtos de origem alimentar. As bactérias patogénicas mais frequentemente associadas aos queijos produzidos com leite cru são *Estafilococos* produtores de enterotoxina, *Escherichia coli* produtor de verotoxina (VTEC), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Embora as bactérias estejam presentes em determinados níveis no leite cru, devido ao momento de extração ou por contaminação nas etapas seguintes, um armazenamento deficiente ou uma manipulação desadequada desse leite contribui para um número significativamente maior de bactérias ao longo do processo levando assim, a um aumento do risco de se obter um queijo de fraca qualidade e que pode constituir um perigo para o consumidor (Kousta *et al.*, 2010; Bachmann *et al.*, 2011; QUALI, 2018a).

3.7. Sistema HACCP da técnica de fabrico do queijo de Azeitão

Na produção dos mais variados géneros alimentícios é fundamental haver uma análise dos perigos para que haja um maior controlo em relação a todos os perigos relacionados com instalações e tipo de processo e se possam evitar os mesmos, identificando, desta forma, os pontos críticos de controlo [PCC] e quais os parâmetros a cumprir nesses pontos (Ferreira, 2010). Há que ter em consideração os limites críticos que devem ser especificados e validados para cada PCC. Neste contexto, a análise de risco é composta por três componentes: a avaliação de risco microbiológico, a gestão de risco e a comunicação de risco. A avaliação de risco, processo de base científica, é composta por quatro etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo (incluindo

a avaliação da relação dose-resposta), avaliação da exposição e caracterização do risco (Codex Alimentarius Commission, 2011).

Um dos PCC relativamente ao processo de fabrico do queijo de Azeitão é a receção do leite em que a mesma apresenta perigos biológicos e químicos tanto por contaminação microbiana como por resíduos de produtos de higienização ou fármacos ministrados em vida, respetivamente. Para tal devem ser tomadas medidas como higienização correta dos tanques de receção, temperaturas adequadas no transporte, mantendo sistemas de ventilação, cumprir Intervalo de Segurança de fármacos a ministrar aos animais, realizar corretamente o plano de higienização, rejeitar o leite que não esteja conforme, visitar os produtos e verificar as condições, devendo realizar-se como medida de vigilância análises físico-químicas e microbiológicas ao leite. O segundo PCC ocorre na embalagem e rotulagem podendo haver principalmente contaminação microbiana e desenvolvimento microbiano, devendo, para evitar, higienizar corretamente as embalagens, correta higiene pessoal dos colaboradores, assim como formação dos mesmos e manutenção continua do sistema de refrigeração. O terceiro PCC é a passagem pelo detector de metais pois é crucial que perigos físicos sejam detetados tendo que ter atenção ao mesmo. O último PCC é na avaliação e seleção de produtos a reprocessar tendo possibilidade de contaminações microbiana, focando sempre para a refrigeração e manutenção do produto nas melhores condições assim como higienização tanto dos trabalhadores como de todas as superfícies de contacto, tendo atenção a que queijos são selecionados (Ferreira, 2010).

A implementação de programas de segurança alimentar baseados nos princípios HACCP ao longo da cadeia de produção, distribuição e venda de produtos lácteos, tem contribuído para o excelente histórico de segurança de produtos lácteos. Estes programas, quando combinados com melhorias nas práticas de produção primária que gerem eficazmente a saúde animal, com as boas práticas de ordenha, e com as melhorias na higiene dos equipamentos de ordenha e das instalações, têm sido e continuarão a ser decisivos na redução da carga microbiana no leite cru e produtos derivados do leite (ASAE, 2013).

3.8. Fatores que influenciam a flora microbiana dos queijos

A microbiota dos queijos integra microrganismos benéficos, microrganismos de deterioração e patogénicos, sendo que a presença de microrganismos benéficos contribui para as características sensoriais, conservação e condições higiénicas do produto. A presença de microrganismos patogénicos pode ser resultante de contaminações do leite, o qual pode ser contaminado durante ou após a ordenha através do equipamento, das fezes, do exterior do úbere e tetas, da pele, do meio ambiente, ou relacionadas com higiene inadequada ou de deficiências no processo de fabrico (Montel *et al.*, 2014; Verraes *et al.*, 2015; Gaglio *et al.*, 2019).

Existe um conjunto de fatores intrínsecos no leite que o tornam um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos, mas que também desempenham um papel ativo no seu controlo, destacando-se o pH, a microbiota natural, a atividade da água e os nutrientes disponíveis no leite. Para auxiliar, existem ainda fatores extrínsecos associados ao processo, os quais são imprescindíveis para controlar o crescimento da microbiota desejável e indesejável, entre eles, a salga, o tempo de cura, a lavagem e a higienização dos materiais em contacto, já anteriormente abordados. Para além desses também será referida a temperatura e a humidade relativa (Noronha, 2003; Johnson, 2017; Manual Forvisão – SAAIA, 2017; Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020).

3.8.1. Fatores intrínsecos

3.8.1.1. Atividade da água

Todos os organismos vivos são dependentes da água no estado líquido e, por conseguinte, para ocorrer desenvolvimento microbiano é indispensável a sua presença nos alimentos. A água é, normalmente, o principal constituinte dos alimentos, sendo igualmente o solvente mais importante, ao permitir que os restantes constituintes se tornem solúveis de modo a poderem ser transportados, absorvidos ou expelidos do interior das células, onde ocorrem as reações no citoplasma. (Noronha, 2003; Adams & Moss, 2008). Nos alimentos a água encontra-se em duas formas diferentes, quimicamente ligada a outras moléculas, estando imobilizada, ou na sua forma livre, e como tal disponível, designando-se por a_w .

Os valores da a_w variam entre 0, quando a água livre é inexistente, e 1, quando a água se encontra totalmente disponível (água pura). No que toca ao leite, ele apresenta

uma percentagem de água de 88-89%, o que significa que tem uma grande quantidade de água disponível para o desenvolvimento de microrganismos, sendo um excelente meio para o crescimento dos mesmos (Noronha, 2003). Todos os microrganismos têm um valor limite de a_w , abaixo do qual cessam a sua atividade, o qual varia conforme os microrganismos, como se pode verificar na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de a_w para determinados microrganismos. Adaptado de: Noronha(2003).

Microrganismo	a_w
Bactérias	0,90-0,91
Leveduras	0,87-0,94
Bolores	0,70-0,80

É de considerar que estes valores são aproximados e que são característicos da maioria dos microrganismos destes grupos, havendo sempre espaço para as exceções (Noronha, 2003). A maioria das bactérias encontra-se controlada e é inibida a produção de toxinas quando a a_w é inferior a 0,90. A grande exceção, é *S. aureus* que pode crescer e produzir toxinas em condições de a_w de 0,86 (Manual Forvisão – SAAIA, 2017; Park & Seo, 2019).

Uma vez que o crescimento microbiano é o fator mais importante na preservação dos alimentos, uma das melhores maneiras de prever e controlar a sua deterioração é ter em conta a a_w do alimento. Para isso, pode recorrer-se à adição de solutos como o sal, como é feito no queijo, que se vai ligar quimicamente com a água livre disponível e assim reduzir a sua atividade o que resulta numa maior segurança do produto, pois (Noronha, 2003; Adams & Moss, 2008).

Os queijos de pasta mole apresentam uma atividade da água elevada (aproximadamente 0,95) comparativamente aos queijos de pasta dura (0,85), o que reforça a proteção dos últimos. Na Tabela 4 é possível verificar os valores mínimos aproximados da a_w para os microrganismos patogénicos mais relevantes para os queijos (Noronha, 2003; Adams & Moss, 2008; Park & Seo, 2019; Ryser, Buchnan & Bakker, 2019).

Tabela 4 – Valores mínimos de a_w para microrganismos relevantes no queijo. Adaptado de Noronha (2003).

Microrganismo patogénico	Atividade da água (a_w)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92
<i>Salmonella spp.</i>	0,95
Estafilococos coagulase positiva	0,86
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	0,95

3.8.1.2. Acidez

O parâmetro acidez, que normalmente é medido através do pH, é dos mais importantes no que diz respeito ao controlo de qualidade do processo de fabrico de queijo (Coton & Leguerinel, 2014). Para além disso, tem um papel essencial no ponto de vista de segurança alimentar do Queijo de Azeitão, uma vez que o leite não passa por um processo de pasteurização, sendo que, parte do controlo do crescimento microbiano é feito através do pH (Noronha, 2003). Dos alimentos considerados ácidos, podem ser muito ou pouco ácidos, sendo que o pH que determina a diferença é o de 4,6 (Coton & Leguerinel, 2014).

O leite tem um pH próximo de 6,8, próximo da neutralidade, o que indica que é um meio adequado ao crescimento da maioria das bactérias que se desenvolvem bem em pH 6,0-8,0. A redução do pH num alimento contribui para reduzir a capacidade de desenvolvimento microbiano, razão pela qual a acidificação de alimentos, por exemplo através da fermentação, é utilizada como técnica para a sua conservação. Durante a maturação do queijo, o pH decresce devido à formação de ácido láctico por ação das BAL e esta diminuição depende do tipo de bactérias lácticas envolvidas e da tecnologia de produção. A redução do pH do queijo ao longo da cura, para valores entre os 4,5 e 5,5 contribui para a inibição do crescimento de microrganismos patogénicos e está envolvida na qualidade sensorial do produto, nomeadamente aroma e paladar (Noronha, 2003; Alvarenga, Silva, Garcia & Sousa, 2008; Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020;).

Os fungos podem desenvolver-se numa vasta faixa de valores de pH, que pode ir dos 2,5 aos 9,5. Os bolores apresentam um valor de pH ótimo de crescimento entre 1,5 e 9,5 e as leveduras entre os 2,5 e 8,5.

No entanto, o parâmetro acidez pode atuar em associação com outros fatores como a a_w e a temperatura de modo a impedir o desenvolvimento de bactérias patogénicas e de outros microrganismos (Coton & Leguerinel, 2014). O queijo de Azeitão apresenta um pH final próximo de 5,9 o que permite o crescimento de certos microrganismos (Noronha, 2003).

3.8.1.3. Nutrientes do leite

Com um elevado conteúdo nutritivo em relação ao conteúdo calórico, o leite é dos alimentos mais completos e equilibrados graças a proteínas de elevado valor biológico, gordura, hidratos de carbono, vitaminas lipossolúveis e minerais (Food and Agriculture Organization [FAO], 2013). Esta composição quase perfeita, torna o leite um excelente substrato para os microrganismos em geral, que se multiplicam muito rapidamente neste meio sempre que a temperatura é a ideal ao seu crescimento, deteriorando o leite ao ponto de este se tornar impróprio para processamento e consumo humano (FAO, 2013).

Os microrganismos necessitam de um conjunto de nutrientes para o seu crescimento e para a execução das funções metabólicas e o leite é uma fonte de todos esses nutrientes fundamentais. O açúcar presente é a lactose, o qual pode ser degradado em dois açúcares mais simples, a galactose e a glicose. Ao contrário da maioria das bactérias, as BAL conseguem fazer essa degradação e assim utilizar a lactose como fonte de energia, o que permite obter vantagem sobrepondo-se a outras populações de microrganismos. Assim, a composição nutricional do leite é também um fator de segurança para o queijo (Noronha, 2003).

3.8.1.4. Microbiota

Como anteriormente referido, as BAL conseguem degradar a lactose, uma vantagem competitiva comparativamente com outras bactérias. Para além disso, da fermentação da lactose resulta ácido láctico o que reduz o pH do meio, condicionando o crescimento de muitas bactérias não lácticas presentes na microbiota natural. Adicionalmente, as BAL apresentam um sistema proteolítico capaz de degradar as proteínas do leite, que é um meio pobre em aminoácidos livres e péptidos de cadeia curta, sendo por isso essencial que hidrolisem as proteínas para lhes permitir o crescimento, o que explica a importância do sistema proteolítico que estas bactérias apresentam. Deste metabolismo resultam péptidos bioativos, bacteriocinas importantes para a saúde e que

têm igualmente um papel importante na inibição de outros microrganismos com impactos positivos na preservação e segurança do produto (Lopez-Kleine & Monnet, 2011; Espitia *et al.*, 2012; Sánchez-Rivera, Martínez-Maqueda, Cruz-Huerta, Miralles & Recio, 2014; Salvuccia, LeBlanc & Pérez, 2016; Santos *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). Hoje em dia, muitas espécies de BAL são consideradas probióticos, ou seja, microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006; Sanders, 2008; Cruz *et al.*, 2009; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Argyri *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014). Outro atributo do metabolismo destas bactérias, o qual permite o recurso à sua utilização nos alimentos possibilitando a criação de uma grande diversidade de especialidades gastronómicas, é a sua capacidade de se multiplicarem em concentrações elevadas de NaCl, o que é especialmente importante para variadíssimos produtos fermentados nomeadamente o queijo (Oliveira *et al.*, 2014; Sidira, Kandyli, Kanellaki & Kourkoutas, 2016).

Adicionalmente, as BAL através destas propriedades proteolíticas e lipolíticas, formam compostos que conferem o sabor e a textura característicos de cada queijo. Para a manutenção dessas bactérias, importantes no processo de fabrico do queijo, é necessário que sejam aplicadas temperaturas adequadas tanto na refrigeração do leite, como na fase de cura (Noronha, 2003).

3.8.1.5. Potencial de oxidação-redução

Os microrganismos exibem sensibilidades diferentes ao potencial de oxidação-redução [Eh] do meio onde crescem. O Eh pode ser definido pela capacidade de determinados substratos ganharem ou perderem eletrões. O elemento que perde um eletrão é denominado oxidado e o que ganha é denominado por reduzido (Jay, Loessner & Golden, 2005). Quando ocorre a transferência de eletrões de um composto para o outro, estabelece-se uma diferença de potencial entre os mesmos. A sua medição é feita com instrumentos apropriados em milivolts (mV) e normalmente feita a pH 7, uma vez que o potencial oxidação-redução é afetado pelo pH do substrato (Jay *et al.*, 2005). Os microrganismos aeróbios precisam de valores positivos de Eh para crescerem (+500 e +300 mV), os anaeróbios necessitam de valores negativos (+100 e menos de -250 mV) e os aeróbios facultativos entre +300 e -100 mV (QUALI, 2018b).

Dos microrganismos aeróbios fazem parte praticamente todos os bolores, leveduras oxidantes e muitas bactérias que se caracterizam por deteriorarem os alimentos

como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Flavobacterium* e bactérias patogénicas aeróbias como *Aeromonas hydrophila*. Existem algumas bactérias que crescem melhor com condições reduzidas denominadas de microaerófilas, como *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Dos microrganismos anaeróbios fazem parte bactérias patogénicas como *Clostridium botulinum* e entre os microrganismos aeróbios facultativos estão as bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Bacillus cereus* (QUALI, 2018b).

3.8.2. Fatores extrínsecos

3.8.2.1. Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento e sobrevivência dos microrganismos. Como se pode ver na Tabela 5, todos os microrganismos possuem uma faixa de temperatura na qual crescem, existindo um valor mínimo, um máximo e um valor ótimo, ao qual a sua taxa de crescimento é máxima.

Tabela 5 - Temperaturas cardiais para o crescimento microbiano (Fonte: Adams & Moss, 2008)

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Mesófilos	5-15	30-40	40-47
Psicrófilos (Psicrófilos obrigatórios)	-5 a +5	12-15	15-20
Psicrotróficos (Psicrófilos facultativos)	-5 a +5	25-30	30-35

A maioria dos microrganismos patogénicos são mesófilos, apresentando uma temperatura ótima para o seu crescimento entre os 30 e 40 °C. Na Tabela 6, estão representados os principais microrganismos patogénicos mais frequentes no queijo, com as suas respetivas temperaturas mínimas, máximas e ótimas (Adams & Moss, 2008; Manual Forvisão – SAAIA, 2017; Park & Seoa, 2019; Ryser *et al.*, 2019).

Tabela 6- Temperaturas mínimas, ótimas e máximas de crescimento de microrganismos patogénicos em queijos. Adaptado de (Manual Forvisão – SAAIA, 2017).

Microrganismos	Temperatura mínima	Temperatura ótima	Temperatura máxima
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30-37	45
<i>Salmonella spp.</i>	5	35-37	45-47
Estafilococos coagulase positiva	7	35-40	48
<i>Escherichia coli</i>	8	35-40	44-45

Em termos de segurança alimentar a temperatura de maior risco para os alimentos situa-se entre os 4 e os 63 °C, sendo denominada como “zona de perigo” (QUALI, 2018b; Center for Disease Control [CDC], 2020).

Tal como mencionado anteriormente, o crescimento microbiano é afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos, assim, a análise do crescimento face à temperatura não pode ser efetuada desligada do fator tempo, visto que, uma má aplicação do binómio tempo/temperatura pode facilitar a multiplicação dos microrganismos patogénicos. Por exemplo as bactérias são destruídas quando expostas a temperaturas superiores a 63 °C, pois há uma desnaturação das proteínas estruturais, sendo maior a sua mortalidade ao aumentar o tempo de exposição a essas temperaturas (Crispim, 2014). No caso dos fungos, os patogénicos, em geral, são mesófilos e apresentam como temperaturas mínimas 25 a 30 °C e como máximas 40 a 45 °C (Ross & Nichols, 2014).

3.8.2.2. Humidade relativa

A humidade relativa é um fator a ter em consideração, visto que tem uma influência direta na atividade da água e como consequência no desenvolvimento dos microrganismos. Um alimento que apresente uma baixa atividade da água pode vê-la a aumentar quando armazenado num ambiente com humidade relativa alta, o que representa um risco para a segurança do mesmo ao permitir a multiplicação de microrganismos. A humidade relativa também está relacionada com a temperatura, quanto maior a temperatura de armazenagem, menor será a humidade relativa (e o contrário também se verifica), e com a composição da atmosfera, a sua alteração pode protelar a multiplicação de microrganismos sem ser necessária uma diminuição da humidade relativa (QUALI, 2018b).

4. Influência do consumo de queijo no consumidor

Foi comprovado que o consumo de queijos tradicionais produzidos a partir de leite cru tem influência positiva no microbioma entérico humano tendo efeito probiótico, sendo que há que ter em conta que pode ter efeitos indesejáveis devido a alergias e baixa digestibilidade associadas às caseínas (FAO, 2013; Montel *et al.*, 2014; Albenzio *et al.*, 2015). No entanto, o consumo de produtos lácteos tem sido alvo de amplos debates nos últimos anos devido ao teor de gordura que pode conduzir ao aumento do colesterol e lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*- LDL) levando ao aumento de doenças cardiovasculares (Mozaffarian, 2011). Por outro lado, tem igualmente sido referenciado que a gordura proveniente da dieta é uma importante fonte de energia concentrada e serve como meio para vitaminas lipossolúveis, para além de conter vários ácidos gordos como por exemplo ácido linoleico e fatores bioativos benéficos para a saúde como fosfolípidos (German & Dillard, 2006; German *et al.*, 2009; Kris-Etherton, Fleming & Harris, 2010).

Por outro lado, o queijo é considerado como um alimento seguro e nutritivo, sendo uma fonte rica de cálcio, fósforo e proteínas, tendo sido demonstrado que reduz a incidência de diabetes tipo II (Mozaffarian *et al.*, 2010; *Institute of Medicine* [IOM], 2011; USDA, 2011; Choi, Lee, Lee, Kim, & Yoon, 2016;). Porém, apesar dos vários benefícios há várias doenças agudas relacionadas ao consumo do mesmo, estando relatados vários casos relacionados a doenças originadas por *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* (Choi *et al.*, 2016). A microbiota dos queijos pode conter microrganismos indesejáveis, mas contém, igualmente microrganismos desejáveis ou benéficos, sendo que estes últimos contribuem para as características organoléticas, conservação e condições higiénicas do produto final. É importante a biodiversidade durante o processo de maturação do queijo em que algumas espécies de BAL se tornam dominantes, visto que estas são responsáveis pelo aroma, textura e sabor do produto final, através da dinâmica e balanço dos compostos voláteis formados, nomeadamente aldeídos, cetonas e esterres. A presença de microrganismos patogénicos pode estar relacionada com higiene inadequada, no entanto as BAL são agentes de biopreservação do queijo ao produzirem substâncias antimicrobianas, consumirem a lactose e baixarem o pH (Montel *et al.*, 2014).

4.1. Microbiota benéfica

Em relação, especificamente, à microbiota natural benéfica do leite, esta é dominada pelas BAL, nomeadamente por *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp e *Enterococcus* spp. e ainda por espécies de *Leuconostoc*, as quais têm a capacidade de preservar o queijo e competir com bactérias patogénicas e, como atrás referido, são as responsáveis pelas características sensoriais típicas do queijo (Medici, Vinderola, & Perdigon, 2004; Montel *et al.*, 2014; O'Sullivan & Cotter, 2017). Embora sejam consideradas microbiota natural, a sua presença advém da contaminação da superfície do úbere, dos tetos, dos procedimentos e equipamento de ordenha, transporte, superfícies dos tanques e ambiente da fábrica de laticínios (Gaglio *et al.*, 2019).

As BAL estão distribuídas na natureza, em nichos ecológicos diversos, em alimentos vegetais e animais, fermentados ou não (Booyensena, Dicks, Meijering & Ackermann, 2002; Adnan & Tan, 2007; Hwanhlem *et al.*, 2011; Suhartatik, Cahyanto, Rahardjo, Miyashita & Rahayu, 2014) e particularmente no leite, podendo estar presentes no trato digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (Hove, Nùrgaard, & Mortensen, 1999; Rubio, Jofré, Martín, Aymerich & Garriga, 2014). O grupo das bactérias ácido lácticas inclui bastonetes e cocos Gram-positivos, não esporulados, estritamente fermentativas, mas aerotolerantes, cujo principal produto do metabolismo dos açúcares é o ácido láctico (Bjorkroth & Koort, 2011; von Wright & Axelsson, 2019).

Podem ser consideradas como microrganismos meso ou termófilos, com temperaturas ótimas (dependendo da espécie) entre os 30 e 42 °C, apresentando bastante tolerância a ambientes ácidos (Hutkins, 2006; von Wright & Axelsson, 2019).

Este grupo de bactérias, muitas das quais são consideradas probióticas, pode produzir várias substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, bacteriocinas e ácidos orgânicos, nos quais se inclui o ácido láctico (Naidu, Bidlack & Clemens, 1999; Gaglio *et al.*, 2019). Tais substâncias vão inibir microrganismos patogénicos deteriorantes tais como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli* O157:H7 e coliformes (Caridi, Micari, Caparra, Cufari, & Sarullo, 2003; Santos *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). Produzem também, a partir da caseína, amino-ácidos livres e posteriormente compostos aromatizantes, degradam a gordura em ácidos gordos livres através de atividades enzimáticas diversas, contribuindo assim para a qualidade do queijo. Tem sido referido na literatura que *Lactococcus*, em particular *L. lactis* ssp. *cremoris* e *L. lactis* ssp. *lactis* são microrganismos importantes para melhorar o sabor devido ao seu comportamento autolítico inato (O'Sullivan & Cotter, 2017).

Há estudos que revelam que a dose mínima diária de culturas probióticas que é considerada terapêutica corresponde a 100 g de produto contendo 6 a 7 log ufc/g (Talwalkar & Kailasapathy, 2004).

4.2. Microbiota de deterioração

A qualidade de higiénica do queijo é sem dúvida influenciada pela qualidade do leite a partir do qual é fabricado. (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020; Montel *et al.*, 2014; O'Sullivan & Cotter, 2017).

Para avaliar a qualidade higiénica são usados microrganismos indicadores de qualidade, que são espécies ou grupos de microrganismos que quando presentes indicam uma evidência indireta da deterioração potencial do produto e podem ser usados para prever o prazo de validade (Jay, Loessner & Golden, 2005). Os microrganismos indicadores fornecem informações rápidas e simples sobre falhas na produção, processamento ou após o processamento, ou seja, as condições gerais de higiene em que os alimentos foram manipulados e armazenados (Montville & Mathews, 2008). Neste trabalho foram avaliados os microrganismos a 30 °C e *Enterobacteriaceae* como microrganismos indicadores de qualidade.

4.2.1. Microrganismos totais a 30 °C

A contagem de microrganismos totais a 30 °C ou microrganismos aeróbios totais é o indicador de qualidade mais extensivamente usado e permite determinar o número “total” de microrganismos num género alimentício. Estes microrganismos são um grupo numeroso englobando bactérias, bolores e leveduras capazes de crescerem a temperatura de 30 °C em condições de aerobiose. Permitem avaliar a qualidade higiénica, determinando a aceitabilidade dos produtos, pois podem ser responsáveis por alterações de odor, sabor ou aspeto, bem como o respeito pelas BPH e BPF (Montville & Mathews, 2008; Gorris & Cordier, 2019). No caso de se verificarem contagens elevadas de microrganismos totais a 30 °C, estas podem indicar condições de higiene deficientes ou falta de controlo na cadeia do processo de fabrico ou na própria matéria-prima (Downes & Ito, 2001).

4.2.2. Bactérias da família *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família formada por bacilos Gram-negativos, aeróbios / anaeróbios facultativos, oxidase negativos, fermentadores de glucose e produtores de catalase. Os principais géneros de bactérias desta família são *Citrobater*, *Edwarddsiella*, *Enteobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (Adams & Moss, 2008; Todd, Greig, Bartleson & Michaels, 2009).

Estas bactérias caracterizam-se por serem ubiqüitárias podendo encontrar-se no solo, água, plantas e, igualmente, na microbiota intestinal humana e animal, estando presentes em alimentos crus (Ray & Bhljnia, 2014).

Destas bactérias, é de destacar a *Escherichia coli* que indica se existe contaminação fecal no produto e se foram respeitadas as BPH. Esta bactéria em particular encontra-se no trato gastrointestinal, sendo benéfica para o seu hospedeiro ao produzir vitamina K2 ou prevenir a colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogénicas ao competir com as mesmas (*International Dairy Federation* [IDF], 2016; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [INSA], 2019). Porém, há estirpes de *E. coli* que são patogénicas para os humanos, como é o caso da *E.coli* O157:H7 classificada como verotoxinogénica (IDF, 2016).

4.3. Microrganismos Patogénicos

Como referido anteriormente, os produtos lácteos podem ser contaminados por vários microrganismos, incluindo patogénicos, nomeadamente, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* verotoxigénico (VTEC) e algumas espécies do género *Bacillus* (Pintado, Gomes & Malcata, 2008; Panthi, Jordan, Kelly & Sheehan, 2017) sendo que *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *L.monocytogenes*, e VTEC representam o maior risco para a segurança do queijo (D'Amico & Donnelly, 2017).

4.3.1. *Salmonella* species

Os microrganismos pertencentes ao género *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* sendo por consequência, anaeróbios facultativos, em forma de bastonete, Gram-negativos, não esporulados, fermentadores da glucose. São encontrados no trato intestinal de certos vertebrados incluindo aves, répteis, animais de consumo e Homem, sendo excretados pelas fezes e, como consequência, encontram-se largamente disseminadas no meio ambiente. Podem ainda ser encontrados em plantas e protozoários (Jay *et al.*, 2005; *Food Standards Australia New Zealand* [FSANZ], 2013; Lewis, Melendrez & FinK, 2019). O seu crescimento pode ocorrer a temperaturas entre 5 e 47 °C e pH entre 3 e 9 com uma a_w mínima de 0,93, podendo sobreviver meses ou até mesmo anos em alimentos com baixa humidade e alimentos congelados a -20 °C (FSANZ, 2013; Lewis *et al*, 2019).

Estas bactérias são agentes de toxinfecções alimentares, constituindo um perigo ao originarem uma doença incapacitante, geralmente não fatal, de duração moderada, sendo as sequelas raras (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods* [ICMSF], 2013). É o agente responsável como primeira causa dos surtos de toxinfecções alimentares reportados na Europa e como segundo agente zoonótico causador de doença diarreica em humanos (*European Food Safety Authority* [EFSA], 2019). Todas as pessoas são suscetíveis de desenvolverem salmonelose, sendo os mais vulneráveis os idosos, lactentes e indivíduos imunocomprometidos, os quais apresentam, por norma, sintomas mais graves (*Food and Drug Administration* [FDA], 2012; FSANZ, 2013). A nível dos sintomas os principais são dores abdominais, náuseas, diarreia, febre, vómitos, desidratação, dores de cabeça e/ou prostração. O início dos sintomas ocorre, normalmente, 24-48 h após a infeção, os quais persistem por 2 a 7 dias. Há casos em que

ocorre septicemia, predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (FDA, 2012; FSANZ, 2013).

A contaminação do queijo pode advir do uso de leite contaminado e posterior sobrevivência do microrganismo durante o processo de fabrico. Pode também ocorrer contaminação durante o processo de fabrico se as medidas de higienização não forem as adequadas (D'Amico & Donnelly, 2017). Se se verificar a presença de *Salmonella* spp. num lote, que já se encontre no mercado, isto vai implicar a retirada ou recolha de todo o lote do produto (Regulamento 2073/2005).

Já foram associados vários serovares de *Salmonella* a surtos de toxinfecção alimentar atribuídos ao consumo de leite não pasteurizado ou queijo produzido com este tipo de leite (D'Amico & Donnelly, 2017). De um modo geral, estes surtos associados ao consumo de queijo são frequentemente atribuídos ao uso de leite cru proveniente de um rebanho infetado (Austin *et al.*, 2008; D'Amico & Donnelly, 2017). Austin *et al.* (2008), relataram um surto que envolveu 85 casos atribuído a *Salmonella* Newport, a qual foi isolada dos doentes, de um queijo tipo Mexicano feito de leite cru de um produtor local. Em 1999, ocorreu um surto por consumo de queijo produzido com leite cru por *Salmonella* Oranienburg não tendo sido detetada a estirpe no leite cru. A investigação concluiu que a contaminação foi originada em aves com fezes positivas e que circulavam nas imediações da zona de fabrico, sendo por conseguinte, devido a contaminação ambiental durante o processamento (Allerberger *et al.*, 2000). Nos EUA, entre 1998 e 2011, ocorreram 38 surtos que tiveram como veículo queijo produzido com leite não pasteurizado, 13 destes surtos correspondentes a 34%, foram causados por diferentes serovares de *Salmonella* (Gould, Mungai & Behraves, 2014). Na Europa foram reportados 9 surtos atribuídos ao consumo de queijo no ano de 2018, representando cerca de 3% da totalidade dos surtos por *Salmonella* spp.. No período entre 2010 e 2017 foram 100 os surtos reportados na Europa (EFSA, 2019).

4.3.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva que pertence à família *Listeriaceae*, é anaeróbia facultativa em forma de bastonete. Apresenta atividade hemolítica em agar sangue sendo uma das características que permite distinguir esta espécie de outras pertencentes ao género *Listeria*. Tem a capacidade de sobreviver em pH de 4,4 a 9,6, temperatura de 0 a 45 °C e a_w baixa, 0,90 (Carpentier & Cerf, 2011; Lianou & Koutsoumanis, 2013; ASAE, 2019a; Ryser *et al.*, 2019). Apresenta uma distribuição ubiquitária podendo ser encontrada no solo, pastagens, vegetação, esgotos, água superficial, fezes de animais e humanos, doentes ou portadores assintomáticos (Donnelly, 2001; Ryser *et al.*, 2019; Papić, Kušar, Zdovc, Golob & Pate, 2020). Além do referido anteriormente, as bactérias do género *Listeria* toleram condições de altas concentrações de cloreto de sódio, cerca de 10 a 12%, sobrevivendo a 25,5% de NaCl (Donnelly, 2001; Ryser *et al.*, 2019). Todas estas características explicam a sua presença nos mais variados alimentos (Ryser *et al.*, 2019).

É o agente que causa listeriose nos humanos e nos animais, uma infeção com um elevado grau de fatalidade associada com a ingestão de alimentos contaminados (Melo, Andrew, & Faleiro, 2015; Papić *et al.*, 2020).

A listeriose é uma doença que constitui um problema grave em saúde pública devido à severidade da doença que se manifesta por septicémia, meningite, aborto, elevada taxa de letalidade, 20 a 30%, e que apresenta um período de incubação que pode ir até 70 dias (Ryser *et al.*, 2019). É uma doença que ocorre em grupos de risco bem definidos que incluem mulheres grávidas, recém-nascidos, adultos imunocomprometidos e idosos, sendo que nos adultos e recém-nascidos, as manifestações desta doença são, frequentemente, de septicemia e infeções meníngeas, nos casos mais graves. Nos casos menos severos causa sintomas semelhantes a gastroenterite. Nas grávidas, a infeção ocorre geralmente no terceiro trimestre de gestação, com sintomas ligeiros, confundindo-se com os da gripe, mas muito graves para o feto, podendo resultar em aborto ou nado morto. (ASAE, 2019a; Ryser *et al.*, 2019). O grau de virulência e consequentemente a gravidade da infeção, pode variar entre diferentes estirpes da bactéria, não estando determinada a dose mínima infecciosa para humanos, dependendo da estirpe e do estado imunitário do hospedeiro e da composição do alimento nomeadamente, teor de sal, a_w e acidez (McLauchlin, Mitchell, Smerdon, & Jewell, 2004).

A contaminação de matérias-primas utilizadas na produção de certos produtos alimentares e de alimentos não processados é frequente, sendo a contaminação pós-processo na fábrica muito importante. É particularmente relevante em produtos que não sofrem processos térmicos, nomeadamente, derivados lácteos. É de salientar a capacidade que esta bactéria tem de formar biofilmes nos ambientes de processamento, quer seja nas superfícies de trabalho quer nos equipamentos utilizados, dificultando, desta forma, a sua eliminação no decorrer dos processos de limpeza e de desinfeção (ASAE, 2019a).

Este agente emergiu como um importante patogénico de origem alimentar na última metade do século 20, sendo hoje reconhecido que o consumo de alimentos contaminados constitui a principal via de transmissão ao Homem. Tal facto ficou a dever-se a vários surtos atribuídos ao consumo de alimentos que revelaram a presença desta bactéria, ocorridos nos Estados Unidos, Canadá e Europa, na década de 1980 (Farber & Peterkin, 1991). Um destes grandes surtos ocorreu entre Janeiro e Agosto de 1985 em Los Angeles, o qual envolveu 142 casos dos quais 48 mortais (20 fetos, 10 recém-nascidos e 18 adultos). O alimento implicado foi um queijo tipo mexicano tendo sido isolada uma estirpe de *L. monocytogenes* 4b a partir do alimento e do ambiente da fábrica (Santos & Novais, 1991; Linnan *et al.*, 1998; Ryser *et al.*, 2019).

Posteriormente, diversos surtos de listeriose com elevada morbidade e mortalidade têm sido associados ao consumo de leite cru ou produtos fabricados com leite cru, nomeadamente queijos de pasta mole (Lundén, Tolvanen & Korkeala, 2004). De facto, inúmeros estudos têm demonstrado a presença de *Listeria* spp. incluindo *L. monocytogenes*, no ambiente de fábricas de laticínios, em cubas, paredes das câmaras de frio, escovas de lavagem dos queijos, drenos, tapetes, botas (D'Amico & Donnelly, 2017; Ferraz, 2017; Sonnier *et al.*, 2018), motivo pelo qual podem ocorrer contaminações nos produtos alimentares ao longo do processo de fabrico.

Entre 1983 e 1987, na Suíça, ocorreu um surto, o qual envolveu 122 casos, 31 dos quais morreram, por contaminação do queijo Mont d'Or, levando ao encerramento desta fábrica (Santos & Novais, 1991; Ryser *et al.*, 2019). Um outro surto ocorreu em 2000, nos USA, afetou 13 pessoas, 12 das quais eram mulheres grávidas, tendo ocorrido 5 nados mortos, 3 partos prematuros e 3 recém-nascidos infetados. O surto foi associado a queijo tipo mexicano processado a partir de leite cru (MacDonald *et al.*, 2005). Para além dos referidos, em França, em 1995, verificou-se um surto associado a queijo de pasta mole fabricado com leite não pasteurizado (Lundén *et al.*, 2004). Em 2001, na Suécia, 48 pessoas adoeceram tendo o surto sido associado ao consumo de queijo fresco produzido

a partir de leite cru (Carrique-Mas *et al.*, 2003). Em 2003 nos USA, Texas um surto que envolveu 12 pessoas foi devido a queijo fresco mexicano (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Em 2006, através do consumo de queijo de pasta mole, na República Checa, adoeceram 78 pessoas, as quais foram todas hospitalizadas e 13 faleceram (EFSA, 2007). No ano seguinte, na Noruega, igualmente pelo consumo de queijo de pasta mole, ocorreram 21 casos, 5 dos quais mortais (EFSA, 2009). Em Portugal foi realizado um estudo retrospectivo o qual envolveu 25 hospitais e que conduziu à deteção de um surto que ocorreu entre março de 2009 e Fevereiro de 2012. O surto envolveu 30 casos maioritariamente em Lisboa e Vale do Tejo, 11 dos quais faleceram. O alimento associado foi queijo fabricado com leite de vaca e cabra pasteurizado. A fábrica suspendeu a laboração durante 15 dias. Após a aplicação de adequadas medidas de limpeza e desinfeção, foram colhidas amostras que não voltaram a apresentar-se positivas (Magalhães *et al.*, 2015).

4.3.3. Estafilococos coagulase positiva

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* sendo constituído por cocos Gram-positivos, que vistos ao microscópio surgem aos pares, pequenas cadeias e, mais frequentemente em forma de cacho (FDA, 2012). São imóveis, capsulados e não esporulados, sendo anaeróbios facultativos, produtores de catalase e de ácidos por degradação da glucose em aerobiose ou anaerobiose. Dentre as espécies pertencentes a este género, valorizam-se os estafilococos produtores de coagulase que maioritariamente pertencem à espécie *Staphylococcus aureus*, a qual está frequentemente presente no nariz, garganta, pele e cabelo de seres humanos saudáveis e animais (Bell, Neaves & Williams, 2005; Adams & Moss, 2008; ASAE, 2019b;). Esta bactéria apresenta algumas características de resistência únicas que facilitam a sua contaminação e multiplicação nos alimentos (Park & Seo, 2019).

No que se refere às bactérias patogénicas, *Staphylococcus aureus* é das mais resistentes ao stress ambiental tendo a capacidade de sobreviver por extensos períodos a um estado de secura, sendo disseminadas por partículas de poeira que se encontram no ar e nas mais diversas superfícies e a elevadas temperaturas, podendo sobreviver a condições de temperaturas de 60 °C por 15 min (FDA, 2012; ASAE, 2019b; Park & Seo, 2019)

A bactéria referida consegue desenvolver-se em ambientes com temperaturas entre 6 e 48 °C, tendo, no entanto, uma temperatura ótima de crescimento máximo entre

35 e 37 °C. Caracteriza-se, ainda, por sobreviver a períodos de congelação, a temperaturas inferiores a -20 °C. Consegue crescer, ainda, em ambientes com pH de 4 a 10, com um pH ótimo a 6-7, a_w inferior a 0,86 e concentração de NaCl entre 5 e 7%, sendo que algumas estirpes resistem a concentrações de 20% (European Commission [EC], 2003; ASAE, 2019b; Park & Seo, 2019).

Estafilococos coagulase positivas são ubiqüitárias, estando presentes no meio ambiente, mais especificamente no ar, água, esgotos, poeira, superfícies ambientais e, naturalmente, nas mucosas de animais e humanos, sendo estes últimos o principal reservatório de estirpes produtoras de enterotoxinas. Deste modo, o Homem constitui uma fonte importante na disseminação para os alimentos (Pereira, Pereira, Serreno & Bergdoll, 2000; EC, 2003; ASAE, 2019b; Park & Seo, 2019). Os manipuladores de alimentos podem ser portadores desta bactéria, não apresentar sintomas e são uma importante fonte da sua disseminação para outros humanos e para os alimentos (Park & Seo, 2019). Tendo em conta que os humanos são o maior reservatório, a transmissão desta bactéria para os alimentos ocorre, maioritariamente, através da manipulação dos mesmos, podendo feridas infectadas ser um veículo importante de contaminação. Igualmente, pode colonizar equipamentos utilizados no processo de produção em zonas que se caracterizam por se apresentarem mais difíceis de realizar a limpeza. Adicionalmente ao referido anteriormente, acrescenta-se ainda a má utilização da temperatura no processo de transporte e conservação do alimento que pode levar à multiplicação de microrganismos como Estafilococos coagulase positivos, sendo, desta forma, um fator de controlo para verificar a qualidade dos produtos alimentares (ASAE, 2019b; Park & Seo, 2019).

Algumas estirpes apresentam a capacidade de produzir enterotoxinas (SE), proteínas extracelulares hidrossolúveis, termoestáveis e resistentes à ação proteolítica de enzimas digestivas, as quais constituem o agente causal da intoxicação provocada por este microrganismo (Park & Seo, 2019). A bactéria pode ser destruída pelo processo de pasteurização, porém as enterotoxinas já formadas são resistentes aos processos térmicos.

Os sintomas dependem da quantidade de toxina que foi ingerida, surgindo entre 1 e 7 horas após o consumo, considerando-se que tem de estar presente numa concentração mínima de 10^5 a 10^6 ufc/g de alimento para que exista toxina suficiente para causar doença, 100 a 200 ng. Os sintomas mais relatados são náuseas e vômitos compulsivos, podendo ser acompanhados de diarreia e dores abdominais, sendo a evolução clínica favorável com os sintomas a desaparecer ao fim de 48 h (Forsythe, 2002; Ray & Bhljnia, 2014; ASAE, 2019b).

É de extrema importância o controlo desta intoxicação através do controlo da temperatura dos vários processos, higiene do pessoal e cumprimento de BPH para que, mesmo presente em baixas concentrações, não se multiplique nem produza toxinas (ASAE, 2019b).

Os queijos tradicionais produzidos a partir de leite de ovelha cru, muitas vezes apresentam níveis de contaminação microbiológica elevada, a qual inclui *S. aureus*, e que é inerente à origem e ao processo de produção destes géneros alimentícios. Este agente é o responsável mais importante por mastites em animais produtores de leite, sendo isolado em taxas de 20%-30% em leite de vaca e 30%-40% em leite de cabra e ovelha (D'Amico & Donnelly, 2017).

Foram reportados vários casos de toxinfecção em vários países europeus tendo como um exemplo o caso de França, país onde em 2009, ocorreram 6 surtos em que adoeceram 26 pessoas, pelo consumo de queijo de pasta mole fabricado com leite de vaca não pasteurizado (Osty *et al*, 2010).

Capítulo III – Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

1. Objetivos

Dentro do contexto apresentado, a presente dissertação foi realizada com o intuito de analisar as alterações verificadas no crescimento de microrganismos ao longo do processo de maturação de queijos de Azeitão. Pretende-se relacionar o desenvolvimento de microrganismos ao longo da maturação do queijo com o pH verificado no decorrer da mesma, assim como os potenciais danos que podem advir para o ser humano.

Assim, o presente estudo teve como objetivos gerais:

- Avaliar a variação nos níveis de microrganismos existente, em três tempos diferentes, ao longo do processo de maturação;
- Determinar qual o pH mínimo que o queijo analisado atinge durante o processo de maturação;
- Determinar a possível correlação entre a variação de pH e a variação do nível de microrganismos presentes.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Determinar a presença dos microrganismos patogénicos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp e contagens de estafilococos coagulase positiva ao longo do processo de maturação;
- Avaliar os níveis dos indicadores de qualidade, microrganismos a 30 °C e *Escheria coli* ao longo do processo de maturação;
- Determinar a qualidade final do queijo perante critérios microbiológicos;
- Verificar o cumprimento da legislação nos parâmetros aplicáveis.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras em estudos

As amostras foram recolhidas de forma o mais aleatória possível, para não haver possibilidade de falsear resultados, com o principal intuito de entender e caracterizar não só os potenciais microrganismos existentes como a sua possível correlação à variação do pH do queijo analisado durante a sua fase de maturação.

As amostras de queijo foram provenientes de uma unidade fabril de produção de queijos de Azeitão, onde se produz queijos DOP (Denominação de origem protegida) e queijos não DOP, em número de 125. Efetuaram-se determinações de pH na própria fábrica, na totalidade das amostras (37 DOP e 89 não DOP) ao longo de 20 dias, que correspondem ao período da cura do queijo.

Em 31 queijos de lotes diferentes (11 DOP e 20 não DOP) foram efetuadas determinações microbiológicas, estas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P (INSA), entre os meses de Outubro de 2017 e Fevereiro de 2018. As amostras foram transportadas numa mala isotérmica, seguindo o preconizado na norma ISO 7218.

As análises microbiológicas foram realizadas nos 31 queijos, em 3 períodos de tempo diferentes, sendo a primeira efetuada no dia de elaboração do queijo, a segunda a meio do período de cura do queijo e a última, no último dia de cura do mesmo. Efetuou-se a quantificação de microrganismos totais a 30C°, estafilococos coagulase positivo e *Escherichia coli*. A deteção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foi efetuada em 25 queijos, no primeiro e no último dia de cura. Foi também analisada microbiologicamente uma amostra de leite da região e de leite de fora da região, neste foi feito apenas uma única análise, efetuada no dia da receção do leite.

2.2. Análise Físico-química

2.2.1. Medição do pH

A medição de pH foi efetuada com o auxílio de um potenciómetro pH portátil (HI 99165, Hanna Instruments, Limena, Itália) com eléctrodo de sólidos, previamente calibrado com soluções padrão pH=4 e pH=7. A medição foi efetuada nas instalações da queijaria, diariamente, durante um período de 20 dias, por introdução direta do eléctrodo no produto, exceto nos dias não úteis, em que as instalações fabris se encontravam encerradas.

2.3. Análises Microbiológicas

2.3.1. Preparação das amostras

De cada queijo foi realizada uma toma homogénea, em condições de assepsia e de forma aleatória, de diversos locais (10% de casca e 90% de massa), para um saco esterilizado e devidamente identificado com o número da amostra e a data da execução da análise. Dessa amostra, foi pesada numa balança digital PM 2000 (Mettler-Toledo AG, Laboratory and Weighing Technologies, Greifensee, Switzerland), com a ajuda do abre sacos, uma toma de 25g. De seguida, foi adicionada Água Peptonada Tamponada (APT) (bioMérieux[®], SA, Marcy l'Étoile, França), de forma a perfazer uma diluição inicial 10⁻¹, tendo-se procedido à homogeneização da mesma durante 1 min, no agitador peristáltico (Stomacher[®], modelo 400 Circulator, Seward Limited, London, UK), a 230 batimentos por minuto, sendo que esta diluição se destina à contagem de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* spp. A APT é um meio não seletivo rico em nutrientes que permite que células de microrganismos em baixo número ou lesadas recuperem antes de serem introduzidas num meio seletivo (bioMérieux, 2016).

De seguida, foi realizado o mesmo procedimento com uma toma de 25 g da amostra, às quais se adicionaram 225 ml de Frazer ½ (bioMérieux[®], SA, Marcy l'Étoile, França), meio de enriquecimento seletivo primário, para pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Esta suspensão, foi colocada na estufa a 30 °C±1 °C durante 24/26 h (Sanyo, modelo MIR-153, Gunma, Japão). Trata-se de um meio de pré-enriquecimento seletivo que contém uma base nutritiva com uma mistura de peptonas, um tampão para a estabilização do pH favorável à multiplicação das espécies de *Listeria* e os agentes seletivos cloreto de lítio, acriflavina e ácido nalídixico (bioMérieux, 2014a).

O remanescente da amostra inicial, foi reservado no frigorífico (Fiocchetti, Lobar 140, Luzzara, Itália) a uma temperatura de 3 °C±2 °C, até à obtenção dos resultados.

2.3.2. Preparação das diluições decimais

As diluições decimais sucessivas têm como objetivo reduzir quantitativamente (10x) o número de unidades formadoras de colónias (ufc) presentes na amostra até nível que permita a sua contagem. Para a preparação das diluições foi usado o diluente Triptona Sal (TS) (Biokar, DiagnosticsTM, Beauvais, França), o qual foi formulado para assegurar uma perfeita dispersão dos microrganismos sem os inibir e sem promover multiplicação. É constituído por triptona e por cloreto de sódio que o torna numa solução isotónica (BIOKAR Diagnostics, 2018). Foi retirado 1 ml da suspensão inicial, com a ajuda de um auxiliar de pipetagem elétrico (Brand, Accut-jet pró) e uma pipeta esterilizada de 2 ml e transferido para um tubo, contendo 9 ml de triptona sal e homogeneizou-se no vortex (Janke e Kunkel, VF2, Ika, Staufen, Alemanha), obtendo-se desta forma a diluição 10^{-2} . Este processo foi repetido sucessivamente, até se obter a diluição 10^{-7} , de acordo com o ilustrado na Figura 3. A pipeta esterilizada foi trocada entre cada diluição.

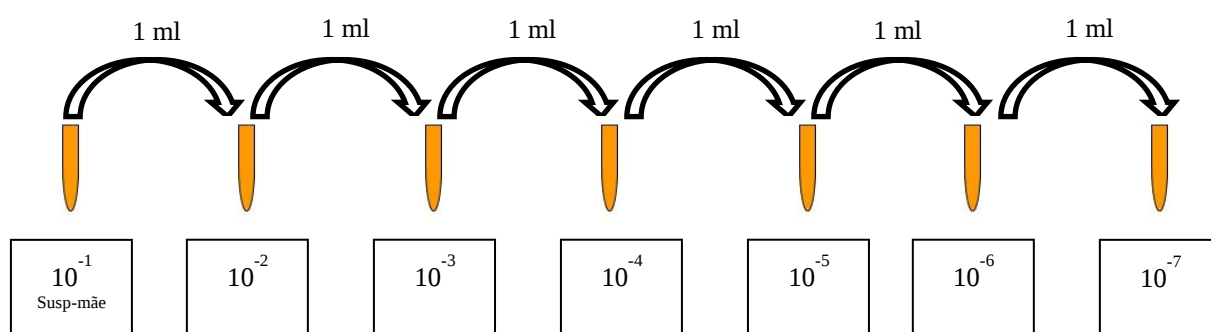


Figura 3 - Diagrama esquemático das diluições decimais sucessivas

2.4. Ensaio Microbiológicos

2.4.1. Fundamento da metodologia utilizada

Para a realização da contagem de microrganismos totais a 30 °C, *Estafilococos* coagulase positiva e *Escherichia coli* foi utilizada a metodologia TEMPO® (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). O teste TEMPO® é composto por um frasco contendo o meio de cultura desidratado e uma carta, específicos para cada teste. O meio de cultura é semeado com a amostra a testar. O conjunto é transferido para os 48 poços de três volumes diferentes da carta, graças ao equipamento TEMPO Filler, o qual permite que a carta seja cheia e hermeticamente selada, para garantir a manipulação posterior sem risco de contaminação. A carta foi concebida com base no método de Número Mais Provável (NMP). O sistema TEMPO Reader, deduz o número de microrganismos presentes inicialmente na amostra, através do número de poços positivos obtidos, em relação ao volume dos poços e à diluição da amostra, após incubação, segundo um cálculo baseado no método do NMP.

Para a realização da pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* foi utilizado o teste qualitativo automatizado VIDAS® (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França), o qual permite a deteção presuntiva de cada um destes patogénicos. Este teste é um teste imunoenzimático, que possibilita a deteção de antígenos de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* pelo método ELFA (*Enzyme Linked Flurescent Assay*) no aparelho VIDAS®. Este necessita da utilização de um cone (SPR®), de utilização única, o qual serve de fase sólida visto que o interior do mesmo, está coberto por anticorpos anti-*Salmonella* (kit VIDAS® SLM) ou anti-*L. monocytogenes* (kit VIDAS® LMO2), respetivamente, adsorvidos na sua superfície e de sistema de pipetagem para o teste. Para a realização deste teste, é necessário também a utilização de uma barrete, composta por 10 poços, em que o primeiro apresenta a parte perfurada de forma a facilitar a introdução da amostra, o último é uma cuvette que permite a leitura por fluorimetria e os poços intermédios contêm os diferentes reagentes necessários à análise. Os reagentes do teste, estão prontos a ser utilizados e pré-repartidos nas barretes seladas. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente pelo equipamento. O meio da reação é aspirado e dispensado várias vezes através do cone. Uma alíquota do caldo de enriquecimento é colocada no primeiro poço da barrete. Os antígenos eventualmente presentes vão fixar-se aos anticorpos anti-*Salmonella* spp. ou anti-*L. monocytogenes*, fixados no interior do cone. Os elementos livres são eliminados por lavagem. Em seguida, os anticorpos

conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e dispensados no cone, fixando-se aos antígenos, que já se encontram fixados aos anticorpos presentes na parede do cone. As etapas de lavagem seguintes removem o conjugado livre. Durante a etapa de conjugação final, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é submetido a um ciclo de aspiração e dispensação do cone. A enzima do conjugado catalisa a hidrólise deste substrato, num produto final fluorescente (fosfato de 4-metil-umbeliferona), cuja fluorescência é medida a 450 nm.

Terminado o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo equipamento, que fornece um valor de teste para cada amostra. O aparelho efetua duas medições de fluorescência, na cuvete de leitura das barretes de reagente, para cada amostra testada. A primeira leitura, corresponde ao branco da cuvete, antes do substrato entrar em contacto com o cone. A segunda leitura é efetuada após a reação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do RFV (*Relative Fluorescence Value*) é o resultado da diferença das duas medições. Os resultados são expressos em positivo ou negativo (bioMérieux, 2018a; bioMérieux, 2018b).

$Valor\ do\ teste = \frac{RFV\ amostra}{RFV\ calibrador}$	Valor do teste	Interpretação
	<0.05	Negativo
	>0.05	Positivo

Tabela 7 – Interpretação do resultado do teste RFV.

2.4.2. Contagem de microrganismos totais a 30 C°, estafilococos coagulase positivos e *Escherichia Coli*

A metodologia TEMPO foi validada de acordo com o indicado nos Regulamento (CE) 2073/2005 e Regulamento (EU) 2019/229, tendo com referência as respetivas normas ISO.

Para a realização da contagem de microrganismos totais a 30 C° utilizou-se o teste TEMPO® AC (Flora total), o qual é um teste automatizado no sistema TEMPO®, que permite a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos presentes nos produtos alimentares. Este teste foi desenvolvido para obter desempenhos análogas aos da norma ISO 4833-1.2013 (bioMérieux, 2014b),

Para a realização deste teste, TEMPO®AC, foi separado um frasco de meio de cultura específico que se encontrava à temperatura ambiente antes da utilização. A amostra a testar no TEMPO® foi identificada, através da introdução da referência no teclado ou utilizando o leitor de código de barras do posto de preparação. O meio de cultura foi hidratado, por adição de 3.9 ml de água destilada esterilizada. Com uma pipeta estéril de 2 ml e com um piptador automático (Brand, Accut-jet pró) foi retirado 0,1 ml do compartimento com filtro do saco TEMPO®, onde se encontrava a suspensão inicial sendo de seguida transferido para o frasco do meio de cultura. Esta mistura foi homogeneizada no agitador vortex (Janke e Kunkel, VF2, Ika, Staufen, Alemanha) durante, aproximadamente 5 s. Os 4 ml de meio semeados corresponderam a uma diluição de 1/400 da amostra. O frasco, foi então colocado, semeado num suporte de enchimento e em frente, com o tubo de transferência imerso no frasco, a respetiva carta. O suporte foi introduzido no TEMPO® Filler e iniciou-se o ciclo de enchimento. O meio semeado, foi aspirado na totalidade da carta. Após o enchimento da carta, o equipamento TEMPO® Filler cortou e selou os tubos de transferência. O suporte de enchimento foi retirado do equipamento tendo o cuidado de, visualmente, confirmar que os frascos se encontravam vazios. Todo este processo foi repetido a partir das diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} . As cartas foram então transferidas para suportes de incubação, os quais foram colocados na estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas (Sanyo, MIR-153, Gunma, Japão). Durante a incubação, os microrganismos presentes na carta, degradam o substrato do meio de cultura e permitem o aparecimento de um sinal fluorescente, detetado pelo equipamento TEMPO® Reader.

Terminado o tempo de incubação, o suporte de incubação foi colocado no TEMPO® Reader, o qual associa automaticamente a identificação da amostra com o tipo

de teste, a diluição e os resultados da contagem. Os resultados foram expressos em ufc/g de produto inicial. Na Figura 4 pode observar-se a representação esquemática da metodologia.

Para a realização da contagem de *Estafilococos* coagulase positiva (Figura 4), foi utilizada a mesma metodologia com o teste TEMPO® STA. Este teste foi desenvolvido de forma a obter desempenhos análogos aos da norma ISO 6888-2 (bioMérieux, 2019).

Neste teste, a hidratação do meio de cultura foi efetuada com 3 ml de água destilada esterilizada, sendo a restante metodologia igual à referida para o teste AC. Neste caso, os 4 ml de meio semeado obtidos, corresponderam a uma diluição de 1/40 de amostra. Tal como para o teste AC, foram igualmente inoculadas as diluições 10^3 , 10^{-5} e 10^7 . As cartas incubaram durante 24/27 h na estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sanyo, MIR-252, Gunma, Japão). Este meio de cultura tem um indicador de pH fluorescente, a um pH neutro há emissão de um sinal detetado no TEMPO® Reader. No decurso da incubação, os estafilococos presentes na carta assimilam os elementos nutritivos do meio de cultura, originam uma diminuição de pH e o desaparecimento do sinal fluorescente.

Para a realização da contagem de *Escherichia coli* foi utilizado o teste TEMPO® EC, que foi desenvolvido para obter o desempenho análogo ao da norma ISO 16649-2 (bioMérieux. 2018c).

Este teste foi elaborado exatamente como o anterior (Figura 4), mas apenas a partir da diluição 10^{-1} . A reação que ocorre durante a incubação, é devida à atividade da β -glucuronidase presente nas bactérias *Escherichia coli*, as quais degradam o substrato do meio de cultura e permitem o aparecimento de um sinal fluorescente, detetado pelo aparelho TEMPO® Reader.

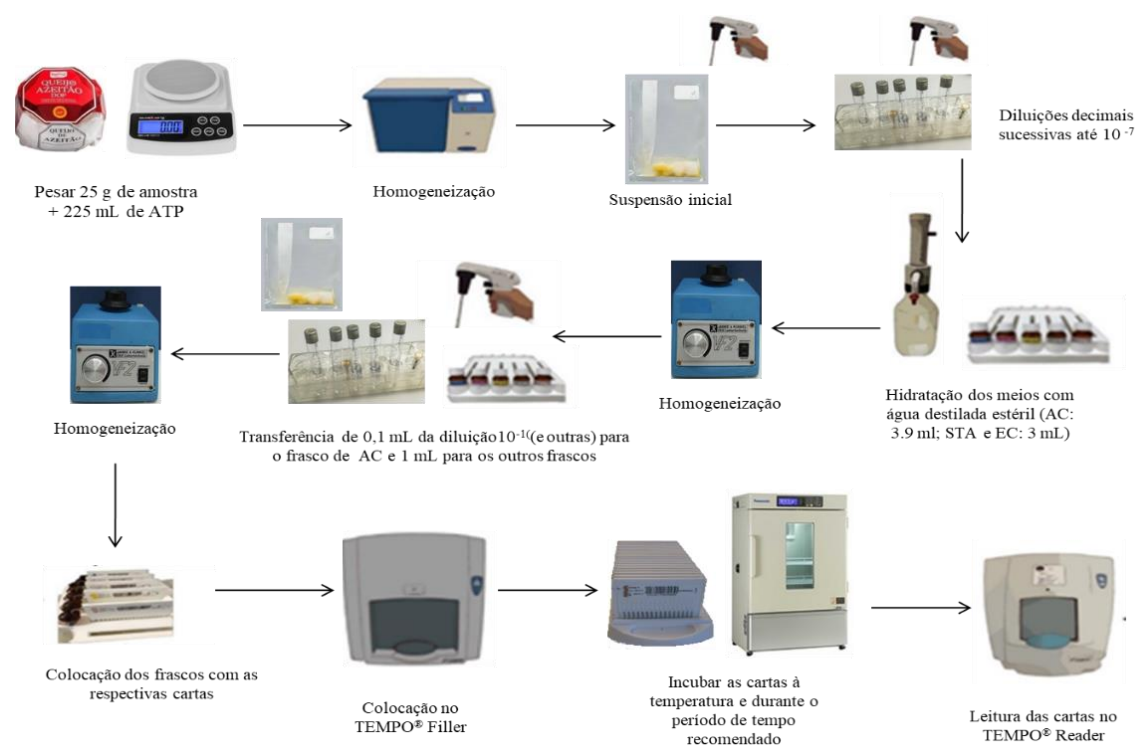


Figura 4 - Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de AC ST e EB, através do método automatizado TEMPO®

2.4.3. Pesquisa de *Salmonella species*

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. utilizou-se o método VIDAS® SLM, cujo diagrama esquemático pode ser observado na Figura 5. Este teste foi desenvolvido de modo a obter desempenho análogo ao da norma ISO 6579-1: 2017 (bioMérieux 2018a). Primeiramente, foi necessário incubar o saco com a suspensão inicial em estufa (Sanyo, MIR-154-PE, Gunma, Japão) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 16/20 h. Após a incubação, foram transferidos com uma pipeta esterilizada de 1 mL, 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento para um tubo contendo o meio de SX2 (bioMérieux®, Marcy, l'Étoile, França), o qual foi homogeneizado no agitador vortex (Janke e Kunkel, VF2, Ika, Staufen, Alemanha). O tubo de ensaio foi devidamente identificado com o número da amostra e a data de execução e colocou-se na estufa (Panasonic, MIR-154-PE, PHC Europa, Holanda) a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 h. O meio SX2 (bioMérieux®, SA, Marcy, l'Étoile, França) é o meio de enriquecimento seletivo usado nesta metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp., sendo que a sua composição favorece a multiplicação das bactérias deste gênero e inibe

a microbiota competitiva, aumentando assim as hipóteses de detecção (bioMérieux, 2014c).

No fim do período de incubação, efetuou-se o teste VIDAS[®]. Para isso, utilizaram-se barretes do VIDAS[®], para as quais foram transferidas 500 µl com a ajuda de uma micropipeta (Gilson, P1000, Middleton, EUA), a partir do meio SX2, para o primeiro poço existente na barrete. Esta foi a inativar no bloco térmico VIDAS[®] *Heat and Go* (Techne, DB-3D, bioMérieux[®], SA, Marcy l'Etoile, França), durante 15 min a uma temperatura de 131 °C sendo de seguida arrefecida durante 10 min, após o que foi colocada no equipamento VIDAS[®]. Os resultados obtidos fornecidos pelo equipamento, foram expressos em positivo ou negativo.

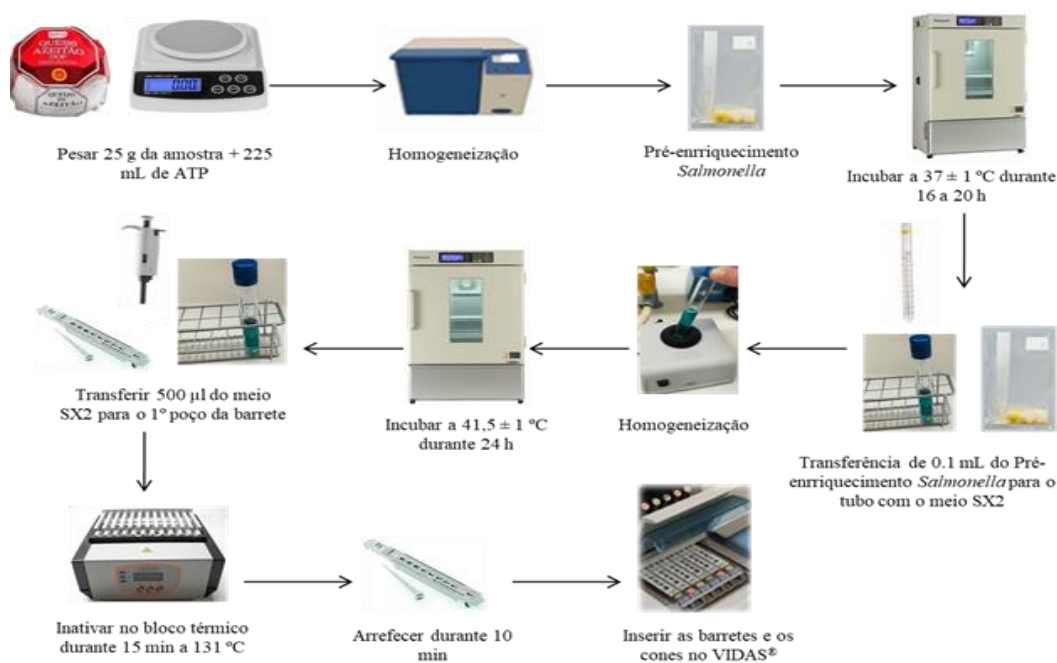


Figura 5 - Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de *Salmonella* spp. através do método imunoenzimático VIDAS[®]

2.4.4. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para a pesquisa de *L. monocytogenes* utilizou-se o método VIDAS[®] LMO2, sendo que teste foi desenvolvido de modo a obter desempenho análogo ao da norma ISO 11290-1: 2017 (bioMérieux 2018b). Como se pode verificar na Figura 6, a diluição inicial com o meio de enriquecimento seletivo primário, foi incubada a 30 °C±1 °C durante 24 h (Sanyo, MIR-153, Gunma, Japão), após o que se passou 0,1 ml, com a ajuda de uma

pipeta estéril de 1 ml, para um tubo com 10 ml de meio de Fraser meio de enriquecimento seletivo secundário (bioMérieux®, SA, Marcy, l'Étoile, França). O meio foi homogeneizado no agitador vortex (Janke e Kunkel, VF2, Ika, Staufen, Alemanha), sendo posteriormente incubado durante 24 horas a $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sanyo, MIR-252, Gunma, Japão). O meio Fraser apresenta uma constituição semelhante ao meio Fraser $\frac{1}{2}$ com a diferença de que o segundo apresenta metade da concentração dos inibidores do primeiro, permitindo desta forma, durante o primeiro enriquecimento, um melhor crescimento das células eventualmente lesadas (bioMérieux, 2014d).

No dia seguinte, foram transferidos 500 μl , com a ajuda da micropipeta (Gilson, P1000) para o primeiro poço da barrete a qual foi seguidamente introduzida no equipamento VIDAS®. Os resultados obtidos foram expressos em positivos e negativos.

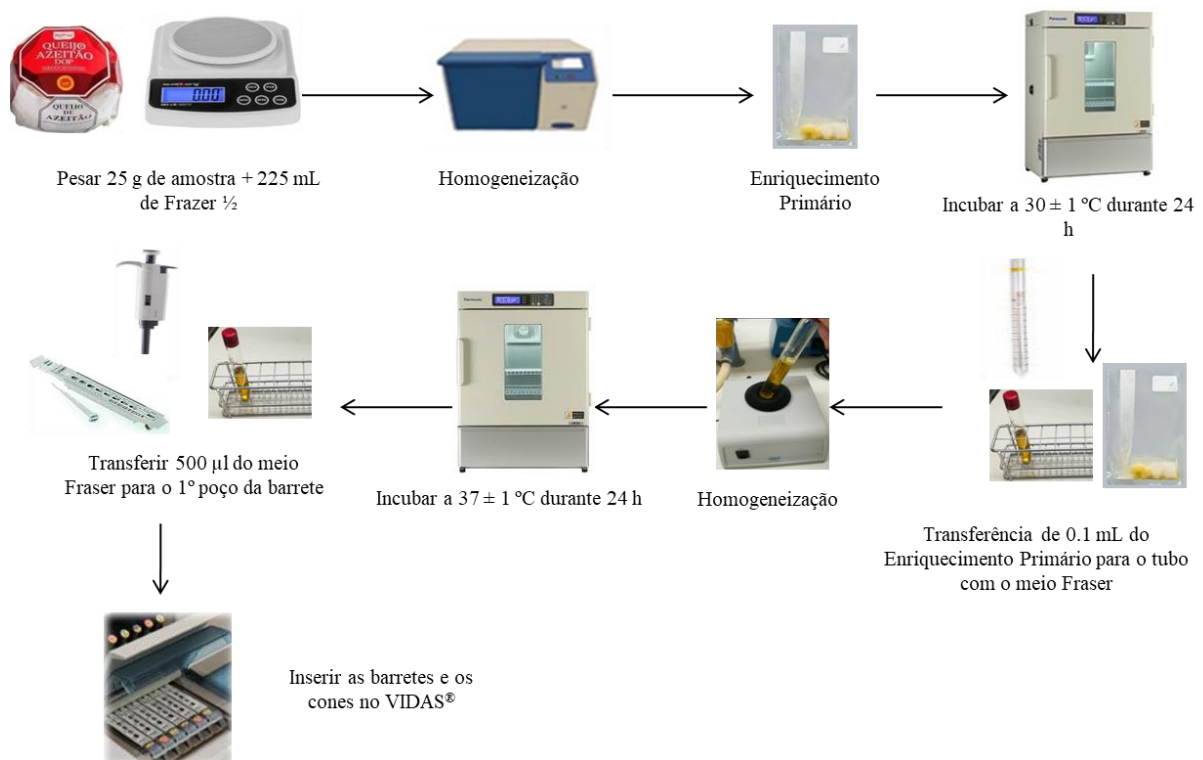


Figura 6 - Diagrama esquemático do procedimento para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* através do método imunoenzimático VIDAS®

2.4.5. Pesquisa de Enterotoxina Estafilocócica

A pesquisa de enterotoxina estafilocócica (tipos A a E) foi efetuada de acordo com o método descrito na norma ISO 19020:2017, método horizontal para a detecção imunoenzimática de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, com concentração por diálise (Silva *et al.*, 2018). Este método é o recomendado pelo Laboratório e Referência da União Europeia (EURL) e o indicado no Regulamento (CE) 2073/2005, alterado pelo Regulamento (UE) 229/2019. Esta pesquisa foi efetuada em 13 amostras, pertencentes a lotes de queijo que revelaram contagens de estafilococos coagulase positiva $>10^5$ ufc/g, em pelo menos uma das amostras efetuadas em 3 períodos diferentes. De cada lote, foi selecionada a amostra correspondente ao último dia do período de maturação, dado que estas correspondem às amostras que poderão ser comercializadas e disponibilizadas aos clientes, de acordo com o preconizado no Regulamento (CE) 2073/2005.

2.4.5.1. Preparação da amostra

Foram pesadas na balança digital PM 2000 (Mettler-Toledo AG, Laboratory and Weighing Technologies, Greifensee, Switzerland), 25 g de cada amostra de queijo, para um saco próprio para o homogeneizador peristáltico, às quais se adicionaram 40 ml de água destilada previamente aquecida até $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo depois colocadas no agitador peristáltico (Stomacher[®], modelo 400 Circulator, Seward Limited, London, UK), a 230 BPM durante 3 min. Posteriormente, o saco com a amostra foi colocado em agitador orbital VXR Basic durante 30 min, à temperatura ambiente, para permitir a difusão das toxinas.

2.4.5.2. Extração

A porção líquida da amostra, foi então pipetada para tubos de centrífuga e foi acidificada até pH a $3,5 \pm 0,5$ com ácido clorídrico (1M) após o que foi a centrifugar a 3100 rpm durante 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de centrífuga e o pH foi neutralizado a pH 7,4-7,6 com hidróxido de sódio (1M), indo novamente a centrifugar nas mesmas condições. No final da centrifugação, retira-se a fase aquosa, estando assim concluída a etapa de extração.

2.4.5.3. Diálise - Concentração

Antes de utilizar a membrana de diálise foi necessário mergulhá-la em água destilada à temperatura ambiente durante um mínimo de 30 min, sendo posteriormente lavada, exterior e internamente, igualmente com água destilada. Seguidamente, uma das extremidades foi fechada com dois nós, para que a membrana pudesse ser cheia com o extrato obtido, com o auxílio de um funil com filtro adequado. Após o enchimento, a membrana foi colocada no interior de uma proveta, sendo a sua outra extremidade selada com uma mola que, em simultâneo, prendia a membrana à entrada da proveta, permitindo mantê-la esticada em posição vertical. A proveta foi cheia com uma solução de Poli Etileno Glicol (PEG) a 30%, até que toda a membrana ficasse submersa na solução, como se pode observar na Figura 7.



Figura 7 - Concentração do extrato através de membrana de diálise submersa em PEG
(Fonte: Laboratório de Microbiologia, DAN, INSA)

Os extratos foram então colocados em refrigeração a 5 ± 3 °C, onde permaneceram até ao dia seguinte, de forma a permitir a concentração das toxinas. As membranas de diálise foram então retiradas das provetas e lavadas por fora com água destilada para remover todos os resíduos de PEG. A membrana foi aberta numa das extremidades tendo sido colocados, no seu interior, com auxílio de uma pipeta, pequenas porções de Tampão Fosfato (PBS), até um total de cerca de 5 ml, tendo o cuidado de ir lavando as paredes internas de modo a arrastar o seu conteúdo para o fundo da membrana. Quando as paredes da membrana se revelaram limpas e transparentes, o seu conteúdo foi transferido para um tubo. A partir deste, 500 µl do extrato concentrado foram pipetados para barrete VIDAS® SET2, para realização do teste no equipamento VIDAS® (Figura 8) (bioMérieux, 2018d).



Figura 8 - Equipamento VIDAS (Fonte: Laboratório de Microbiologia, DAN, INSA)

2.4.6. Análise de Dados e Tratamento Estatístico

Os valores médios obtidos nos ensaios, foram comparados por análise de variância com um fator a vários níveis (*Two-way ANOVA*), sendo esses fatores o tipo de queijo (DOP ou não DOP) e o estado de maturação (dia 1, 10 e 20). Diferenças estatisticamente significativas, definiu-se a menor diferença significativa (LSD), para um nível de significância igual a 5% ($\alpha=0,05$). Usou-se o teste de Cochran e de Levene para testar a homogeneidade das variâncias. Sempre que surgiu heterogeneidade das variâncias das distribuições, o significado estatístico das diferenças foi avaliado recorrendo ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o *software Statistica v. 8* (Statsoft Ibérica, Lisboa, Portugal) para a realização de todos os testes estatísticos. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $p < 0,05$.

3. Apresentação de Resultados

3.1. Resultados das Análises Microbiológicas

3.1.1. Contagens dos Microrganismos Totais, EC e STA

A tabela 8 mostra as médias com os respetivos desvios padrão e amplitudes encontradas nas contagens de microrganismos totais a 30 °C (AC), *E. coli* (EC) e *Estafilococcus coagulase positiva* (STA) para o total de queijos analisados e tendo em conta o facto de serem queijos DOP e não DOP (NDOP). As contagens foram efetuadas em 3 diferentes tempos ao longo dos 20 dias do processo de maturação, nomeadamente no dia 1, dia 2 e dia 3, correspondentes ao dia da laboração, dia 10 e dia 20 do período de maturação, respetivamente. Os resultados originais das contagens são apresentados no Apêndice 1.

Tabela 8 - Médias, desvio padrão e amplitudes das contagens de microrganismos totais a 30 °C, *Escherichia coli* e *Estafilococos* coagulase positiva para total de Queijos, DOP e NDOP (log)

		DIA 1				DIA 10				DIA 20			
		Méd	Dp	Min	Max	Méd	Dp	Min	Max	Méd	Dp	Min	Max
TOTAL	AC	7,93	0,52	6,83	9,04	9,32	0,33	8,18	9,98	9,22	0,18	8,89	9,69
	EC	4,04	0,70	2,85	6,18	4,49	0,97	2,08	6,69	4,52	1,00	2,34	6,57
	STA	4,90	0,72	3,89	6,57	5,14	0,84	4,04	6,69	4,55	0,88	2,98	6,48
DOP	AC	7,74	0,49	6,83	8,53	9,43	0,24	8,96	9,98	9,23	0,20	8,89	9,69
	EC	4,08	0,60	3,23	5,28	4,85	0,75	3,53	6,69	4,94	0,79	3,00	6,57
	STA	4,86	0,71	3,89	6,57	5,07	0,76	4,04	6,69	4,50	0,90	2,98	6,48
N-DOP	AC	8,26	0,42	7,69	9,04	9,09	0,38	8,18	9,52	9,21	0,13	8,96	9,34
	EC	3,97	0,89	2,85	6,18	3,76	0,99	2,08	5,53	3,76	0,92	2,34	5,38
	STA	4,97	0,77	4,32	6,57	5,29	0,99	4,48	6,69	4,65	0,86	3,78	6,23

As amostras de leite da região que foram usada para o fabrico de queijos DOP, e leite de fora da região para o fabrico de queijo NDOP, analisadas no dia da receção do leite, revelaram os valores que podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das contagens de microrganismos a 30°C, *E. coli* e estafilococos coagulase positiva no leite

Tipo de Leite	Microrganismos		
	AC	EC	STA
Leite da Região	7,18	4,20	4,97
Leite de fora da Região	7,40	4,20	3,57

Nos gráficos 6, 8 e 10 podem observar-se as médias e respetivo desvio padrão em log, dos resultados das contagens de microrganismos a 30 °C, *E. coli* e estafilococos coagulase positiva respetivamente, por dia de análise e por tipo de queijo. As distribuições dos resultados das referidas contagens podem ser analisadas nos gráficos 7, 9 e 11.

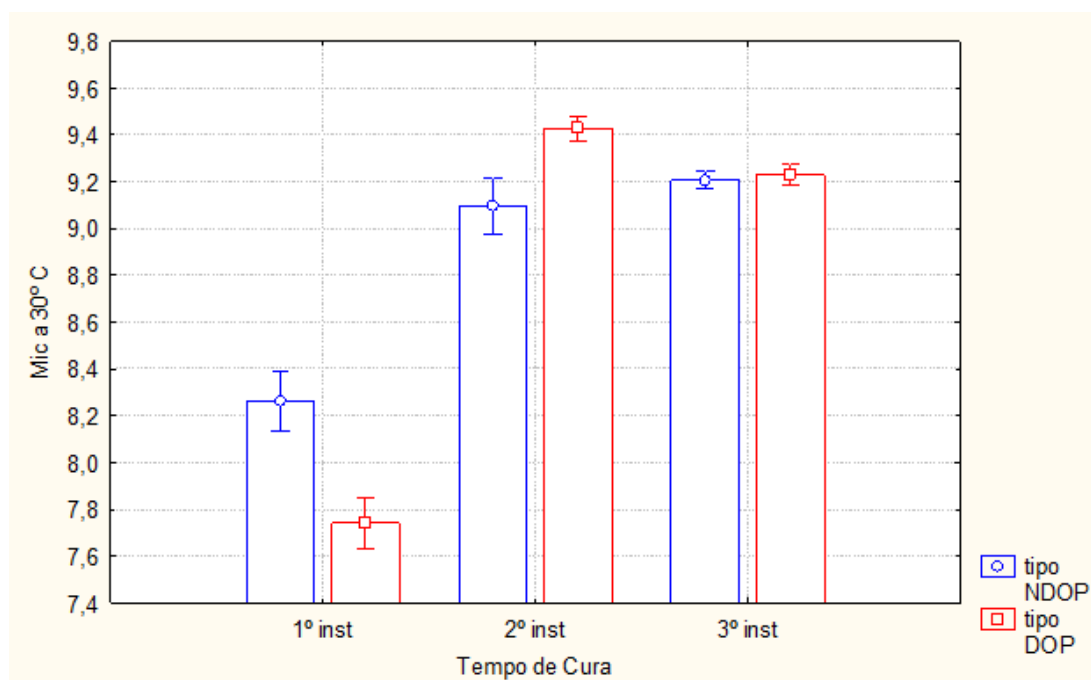


Gráfico 6 – Contagens de microrganismos a 30°C por tipo de queijo (valores médios ± desvio padrão)

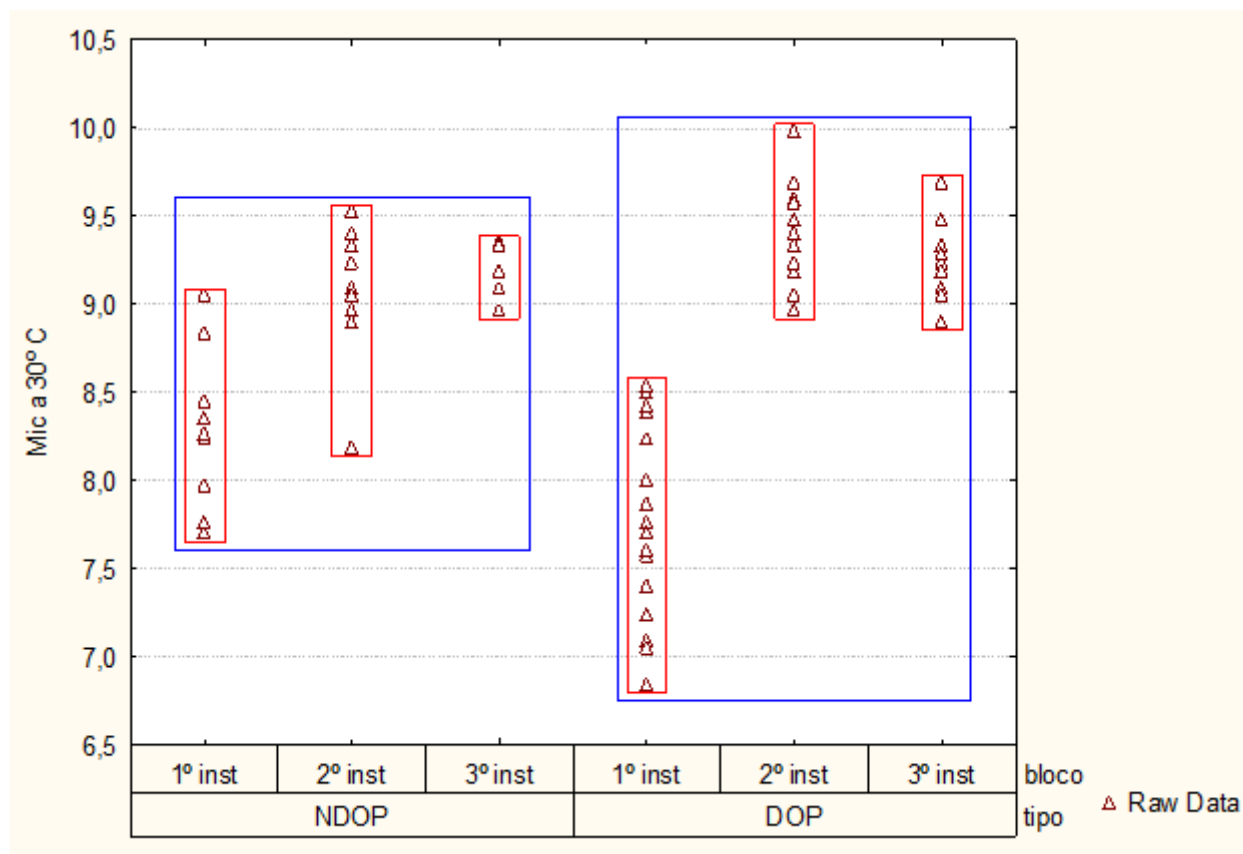


Gráfico 7 – Distribuição dos resultados das contagens (log) de Microrganismos a 30 °C por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)

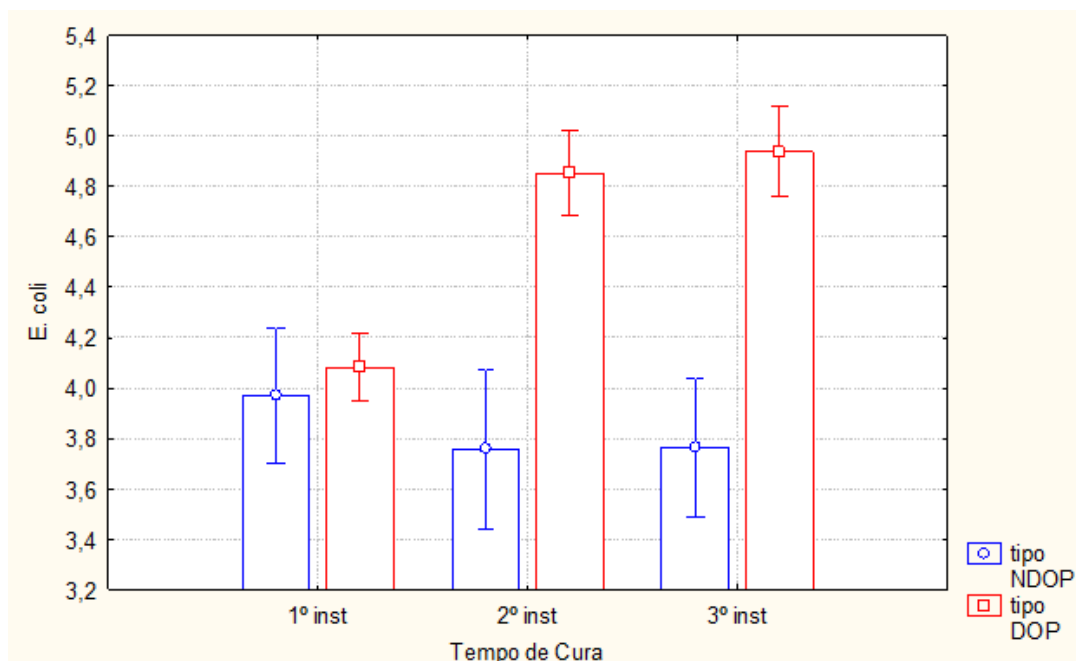


Gráfico 8- Contagens de *Escherichia coli* por tipo de queijo (valores médios ± desvio padrão)

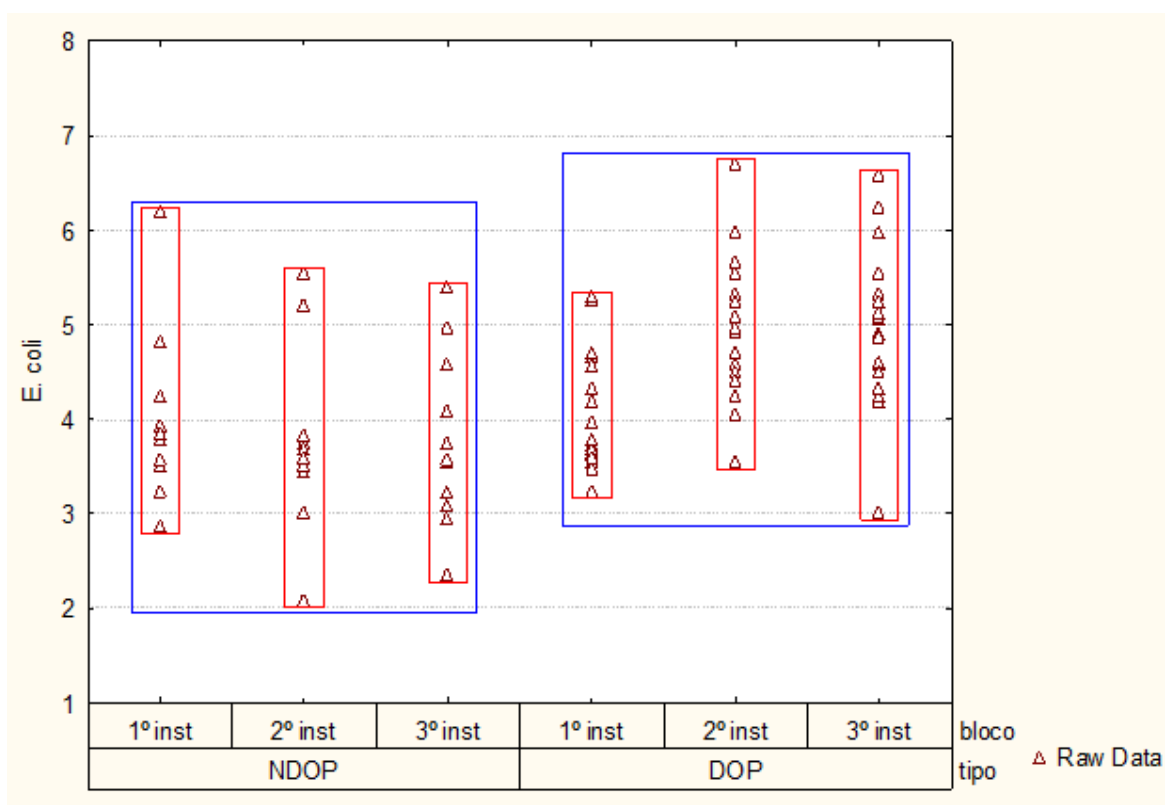


Gráfico 9 -Distribuição dos resultados das contagens (log) de *Escherichia coli* por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)

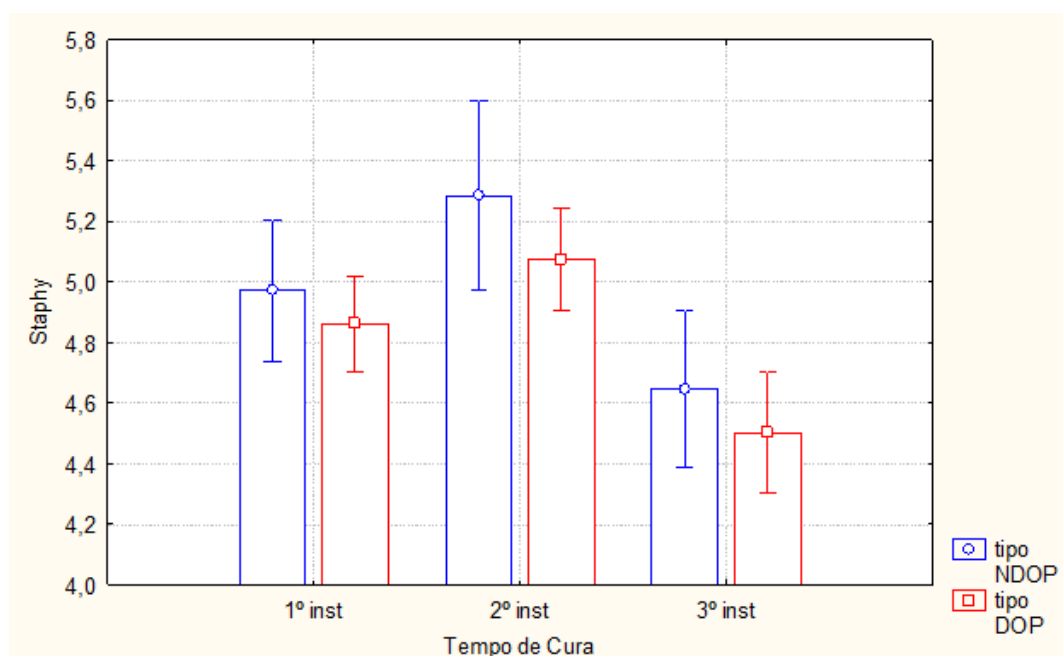


Gráfico 10 - Contagens de *Estafilococcus coagulase positiva* por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão)

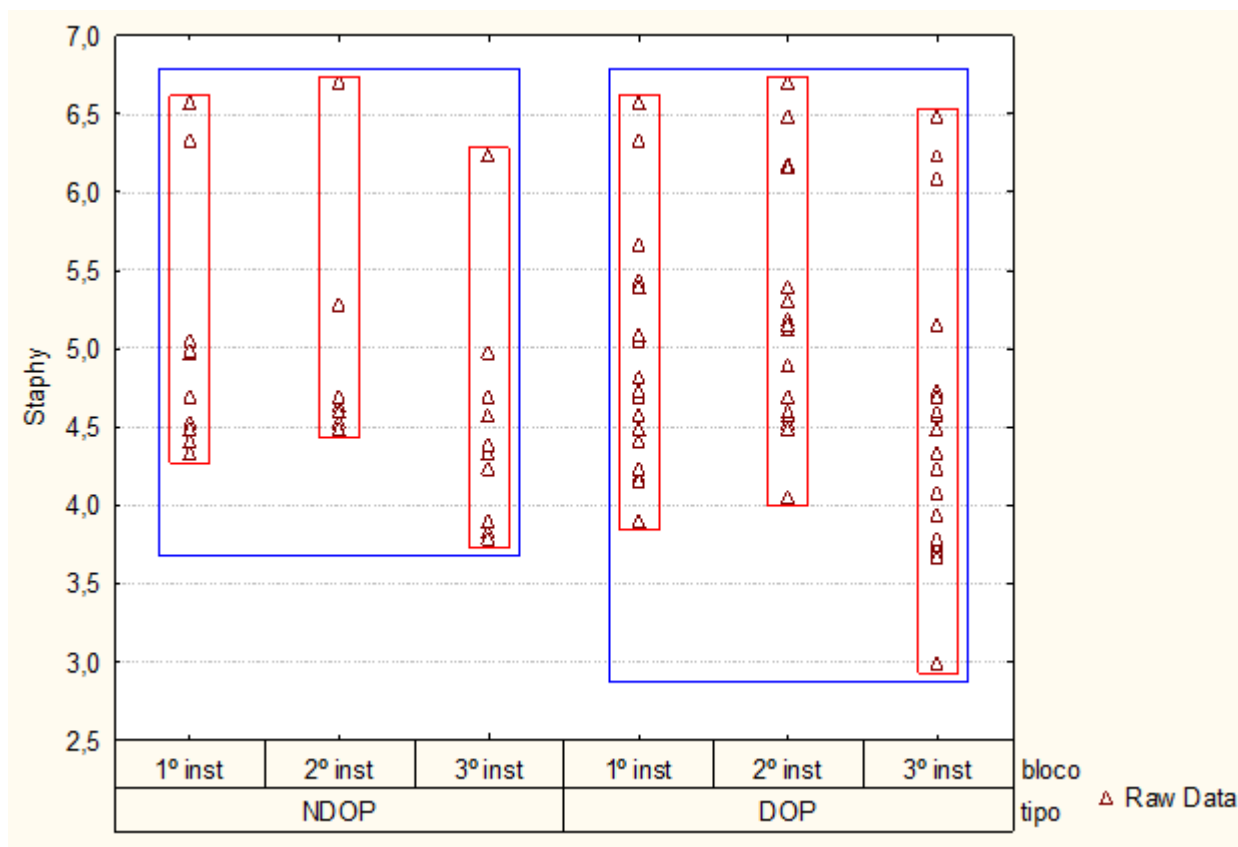


Gráfico 11 – Distribuição dos resultados das contagens (log) de Estafilococos coagulase positiva por dia de análise e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)

3.1.2. Pesquisa dos Microrganismos Patogénicos

Foram efetuadas as pesquisas de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* não tendo sido detetada a sua presença em nenhuma das amostras.

3.1.3. Pesquisa de Enterotoxina Estafilocócica

Não foi detetada a presença de enterotoxina estafilocócica nas 13 amostras com contagens de Estafilococos coagulase positiva $>10^5$ ufc/g, nas quais foi efetuada a pesquisa enterotoxinas estafilocócicas (tipos A a E) de acordo com o Regulamento (CE) 2073/2005, alterado pelo Regulamento (UE) 229/2019 apresentaram resultado negativo.

3.2. Resultados das Análises Físico – Químicas: pH

No Gráfico 12 podem ser observadas as médias e o respetivo desvio padrão das medições de pH, apresentadas por intervalos de tempo. A variabilidade da distribuição dos valores está apresentada no Gráfico 13.

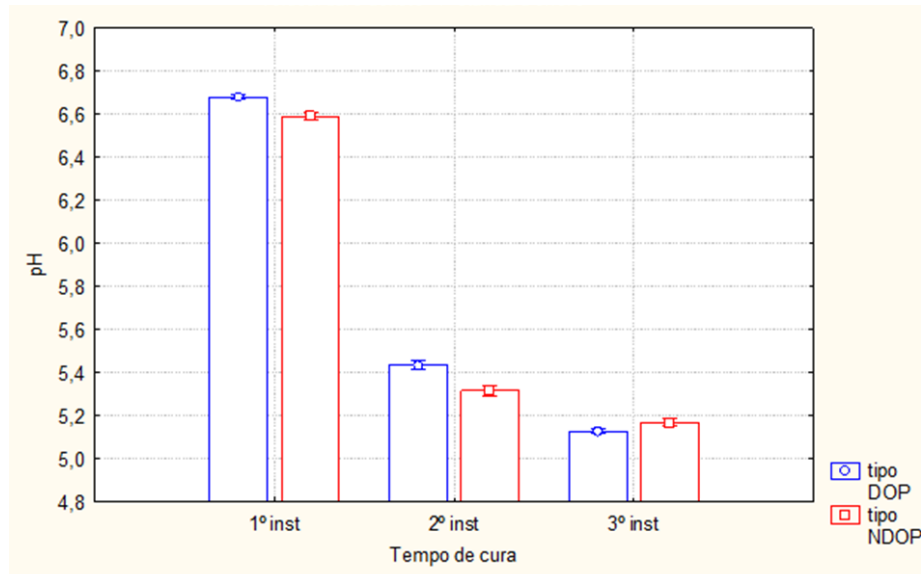


Gráfico 12 – pH por tipo de queijo (valores médios $\pm$ desvio padrão)

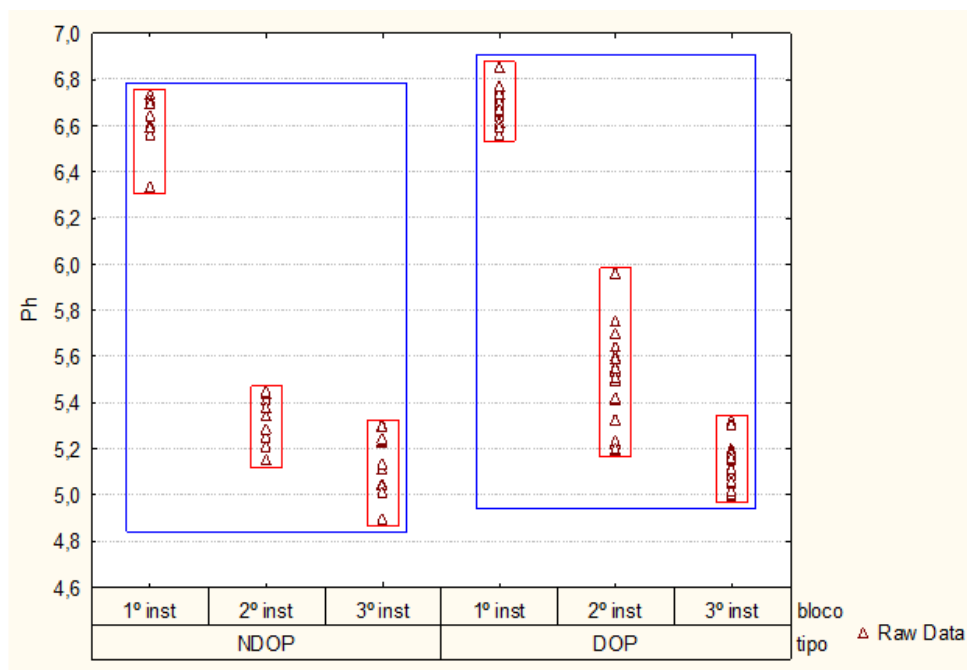


Gráfico 13- Distribuição dos valores de pH por intervalo de tempo e por tipo de queijo (DOP: denominação de origem protegida, n=20; NDOP: não DOP, n=11)

3.3. Correlação entre os Valores de pH e as Contagens de Microrganismos

Na Tabela 10 encontram-se os resultados das diferentes correlações entre os diferentes e microrganismos e o pH.

Tabela 10 – Correlações entre o pH e os microrganismos

	Mean	SD	Mic a 30° C	E. coli	Staphy	pH
Mic a 30° C	8,788170	0,843011	1,000000	0,475413	0,030904	-0,848500
E. coli	4,625018	0,823146	0,475413	1,000000	0,329601	-0,492021
Staphy	4,729494	0,747571	0,030904	0,329601	1,000000	0,115810
pH	5,772478	0,683802	-0,848500	-0,492021	0,115810	1,000000

4. Discussão

4.1. Discussão dos Resultados das Análises Microbiológicas

4.1.1. Contagem de Microrganismos

No decorrer do processo de maturação, que tem um período de 20 dias, analisou-se a evolução dos teores em Microrganismos Totais a 30 °C, *E. coli* e Estafilococos coagulase positiva, efetuando contagens em 3 tempos diferentes, 1º, 10º e 20º dia de maturação, tendo em conta o facto de serem queijos DOP e não DOP.

A produção de queijo é uma indústria de grande dimensão em todo o mundo e muita da sua produção é, ainda, realizada em pequena escala, o que representa a rica diversidade de queijos disponíveis (Fox *et al.*, 2017). O leite e os produtos lácteos podem adquirir a sua microbiota a partir de uma diversidade de fontes, tais como a ordenha e outras máquinas agrícolas, contacto humano e animal e da superfície dos tetos, tendo o próprio leite, características que permite a esses microrganismos multiplicarem-se podendo veicular bactérias patogénicas (Zottola & Smith, 1991; O’Sullivan & Cotter, 2017). Como existem vários riscos, é necessário implementar um sistema que garanta a segurança ao longo de toda a cadeia de produção alimentar (Carrascosa *et al.*, 2016). O fabrico de queijo deve respeitar certas regras que não podem ser ignoradas tais como o respeito pelos procedimentos de fabrico e maturação e aspetos de higiene ao longo do processo. A sanidade dos rebanhos, ordenha higiénica, licenciamento das queijarias e um

controlo no fabrico de acordo com o programa HACCP são, igualmente, de extrema importância (Noronha, 2003).

4.1.1.1. Microrganismos Totais a 30°C

Pela observação da Tabela 8 verificamos que as contagens de AC apresentam uma média de 7,93 log ufc/g no 1º dia, no dia 10 a média foi de 9,32 log ufc/g e no dia 20 a média foi inferior à verificada no dia 10, 9,22 log ufc/g. Ao observarmos os resultados dos queijos DOP, constatamos que a média para o dia 1 foi 7,74 log ufc/g, no dia 10 foi de 9,43 log ufc/g e no dia 20, 9,23 log ufc/g. No que respeita aos queijos NDOP verifica-se que se obteve uma média de 8,26 log ufc/g para o dia 1, para o dia 10 9,09 log ufc/g, enquanto no dia 20 registou-se uma ligeira subida sendo a média 9,21 log ufc/g.

No Gráfico 6 podemos observar as médias e desvio padrão dos valores das contagens de AC, por dia de análise e por tipo de queijo, enquanto no Gráfico 7 verificamos a variabilidade e distribuição dos resultados das contagens igualmente por dia de análise e por tipo de queijo.

Pela observação quer da Tabela 8 quer dos Gráficos 6 e 7, podemos concluir que ocorreu sempre um aumento do nível de microrganismos do dia 1 para o dia 10 sendo que deste para o 20 houve um ligeiro decréscimo, exceto nos queijos NDOP onde os valores se mantiveram sem diferenças significativas. As diferenças foram observadas apenas entre o primeiro instante e os instantes 2 e 3 ($p < 0,05$).

A análise multifatorial pretendia, fundamentalmente, detetar diferenças significativas na média das contagens de Microrganismos Totais a 30°C, consoante quer o tipo de queijo, quer o dia de análise. Para tal foram realizados testes Two Way ANOVA com 2 fatores a 3 e 2 níveis, respetivamente para os dias e para o tipo de queijo. Foi encontrado um efeito significativo quer do tipo de queijo ($F(2, 92) = 31.623, p < 0,001$), quer do dia de medição ($F(1, 92) = 4.724, p = 0,032$), e, mais relevante, da interação entre eles ($F(2, 92) = 4.841, p = 0,01$).

A análise dos efeitos detetados mostra que a média das contagens de AC no queijo DOP, embora as contagens sejam inferiores no início, quando comparada com a mesma média para o queijo NDOP, no tempo, essa diferença é menor, com a média do queijo DOP a ultrapassar a média do queijo NDOP. Assim, o queijo DOP parece ter um comportamento diferente em termos de contagem de AC ao longo do tempo de análise, com um crescimento bacteriano muito mais rápido e intenso no 1º período de maturação, seguindo-se um decréscimo de contagens para o dia 20. O queijo NDOP apresenta um

aumento de contagens menos acelerado, mas constante. Claramente o leite regional apresenta características diferentes do leite não regional. O aumento das contagens para o 10º dia pode ser explicado pelas bactérias do ácido láctico, as *non-starter lactic acid bacteria* (NSLAB) que têm importância extrema na fermentação e produção de compostos voláteis, textura, sabor, valor nutricional e segurança do produto final, sendo que os valores iniciais são da ordem dos 10^3 ufc/g, aumentando inicialmente no processo de maturação, podendo ter um aumento de 4 a 6 ordens de grandeza (log ufc/g) (Settanni & Moschetti, 2010; Rocha & Cruz, 2018). De acordo com trabalhos realizados por Mimoso *et al.* (1990 e 1992), citados por Freitas & Malcata (2000), os níveis de NSLAB atingiram 8 log ufc/g.

Os resultados encontrados neste trabalho para AC estão bastante acima dos valores considerados como limite aceitável nos Valores Guia do INSA (INSA, 2019), que apresentam um valor Satisfatório para resultados $<10^6$ ufc/g para queijos fabricados com leite cru, à semelhança do indicado pela *Health Protection Agency* (HPA, 2009). De acordo com a *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA, 2008), este parâmetro não foi considerado para avaliação da qualidade de queijos laborados com leite cru.

Esta contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C é considerada como um indicador de qualidade, podendo indicar deficiência na qualidade higiénica dos queijos, devido a uso de matérias primas de má qualidade, contaminação cruzada ou não cumprimento das BPF (Veiga, 2012; INSA, 2019). Na realidade o leite cru analisado, como indicado na Tabela 9, ultrapassa os limites da legislação para o leite cru de ovelha de $\leq 1\,500\,000$ ufc/ml, sendo aqui um fator importante. Contudo, devemos ter atenção a estes valores pois podem estar sobrestimados, pelo facto de se tratar de um produto fermentado e não fresco uma vez que a contagem dos microrganismos a 30 °C inclui as NSLAB. De acordo com Franciosi, Settanni, Carlin, Cavazza, & Poznanski (2007) as NSLAB encontram-se no queijo italiano *Puzzzone di Moena* ao longo do processo de maturação em quantidade semelhante às BAL do *starter*, e muitas destas bactérias revelam-se nas contagens dos microrganismos a 30°C. De igual modo atingem níveis de 8 log ufc/g constituindo a microbiota dominante de queijo Cheddar e algumas variedades de queijo alemãs e italianas (Gobbetti, Di Angelis, Cagno & Rizzello, 2007).

Os níveis de AC constatados neste trabalho, embora elevados, estão de acordo com outros estudos efetuados, tal como o estudo realizado por Mimoso *et al.* (1990 e 1992), citados por Freitas & Malcata (2000), na primeira semana do processo de

maturação encontraram valores entre 9 e 10 log ufc/g e ao fim dos 20 dias de maturação situaram-se por volta de 9 log ufc/g. As BAL constituíam a maioria desta microbiota sendo *Lactobacillus* o género predominante. Num outro estudo realizado por Veiga (2012) em diferentes tipos de queijos adquiridos no retalho, obtiveram-se contagens de 2,45 ufc/g (uma única amostra), tendo as restantes variado entre 7,04 e 9,28 ufc/g. Guterres (2013), efetuou um trabalho em queijos de mistura de leite de cabra e ovelha com 42 dias de maturação e encontrou valores um pouco inferiores de 8,41 ufc/g. Outros autores, realizaram um estudo em queijos fabricados com leite pasteurizado proveniente de duas quintas, colhido em 4 anos, e os valores obtidos variaram entre 8,43 e 8,86 ufc/g numa das quintas e na outra variaram entre 8,23 e 9,08 ufc/g (Kalhotka *et al.*, 2019). Num outro estudo realizado em Portugal, em queijo Terrincho, os valores obtidos em amostras provenientes de 5 fábricas variaram entre 8,54 e 9,57 ufc/g (Pintado *et al.*, 2008). No Brasil, Silva *et al.* (2018), em 36 amostras de queijo coalho, referem que os valores encontrados variaram entre 10,79 e 11,11 ufc/g.

4.1.1.2. *Escherichia coli*

Em relação aos resultados das contagens de EC, como se pode constatar pela observação da Tabela 8, a média foi de 4,04 log ufc/g no dia 1, no dia 10 de 4,49 log ufc/g, enquanto no dia 20 a média foi de 4,52 log ufc/g. Para queijos DOP no primeiro dia de contagem, a média foi de 4,08 log ufc/g, aumentando para 4,85 log ufc/g no décimo dia, e foi de 4,94 log ufc/g no último dia de maturação. Relativamente aos queijos NDOP, os valores foram de 3,97 log ufc/g no primeiro dia de contagem, 3,76 log ufc/g no segundo dia e de 3,76 log ufc/g no terceiro dia de contagem. No Gráfico 8 podemos observar as médias e respetivo desvio padrão dos valores das contagens de EC, por dia de análise e por tipo de queijo, enquanto no Gráfico 9 verificamos a distribuição dos resultados das contagens igualmente por dia de análise e por tipo de queijo e podemos verificar uma grande dispersão dos resultados.

A análise do Gráfico 8 permite-nos concluir que nos queijos DOP do dia 1 para o dia 10 ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de contagem deste microrganismo, e que para o dia 20 se verificou uma estabilização. No que respeita aos queijos NDOP houve uma diminuição não significativa ($p > 0,05$) dos níveis de contagem do dia 1 para o dia 10 e uma estabilização para o dia 20.

Podemos considerar que os resultados indicam uma contaminação elevada, tendo em conta que o limite preconizado nos Valores Guia para que o produto seja qualificado

como aceitável é 10 ufc/g, sendo que será qualificado como insatisfatório a partir de 100 ufc/g, apresentando uma qualidade questionável, que podemos inferir como aceitável, entre estes dois valores (INSA, 2019). No entanto, de acordo com a HPA (2009), esta bactéria pode, por vezes, encontrar-se em queijos de pasta mole produzidos a partir de leite cru. Por outro lado, o Regulamento (CE) 2073/2005 apresenta, como critério para queijo fabricado com leite que tenha sido submetido a tratamento térmico, 100 ufc/g podendo, 2 em 5 amostras do mesmo lote terem valores superiores, desde que < 1000 ufc/g. A IDF (2016), refere que é provável que o leite cru contenha *E. coli* que pode crescer para números relativamente altos na coalhada fresca de queijo cru. Refere ainda que a utilidade de usar *E. coli* como um indicador de higiene para queijo de leite cru é questionável e, embora com tendência a declinar durante o período de maturação, a taxa de declínio de patogénicos tende a ser maior para *Listeria* e *Salmonella* do que para *E. coli*. Alexandre, Silva, Souza & Santos (2002) efetuaram um estudo com 129 estirpes de bactérias lácticas isoladas de queijo tendo verificado que exibiam capacidade inibitória frente a diversos patogénicos, mas não evidenciaram qualquer poder inibitório perante *E. coli*.

A presença de *E. coli* indica contaminação de origem fecal bem como de más práticas de higiene na manipulação de alimentos, não sendo, no entanto, fiável como indicador de patogénicos da mesma origem, *e.g.* *Salmonella* spp., e a sua ausência não garante a ausência destes (Martins & Martins, 2013; INSA, 2019). A maioria das estirpes de *E. coli* são consideradas comensais inofensivas, porém há estirpes patogénicas que podem causar doenças graves (FDA, 2016).

Pela observação da Tabela 9 podemos verificar que a matéria prima já estava bastante contaminada sendo um fator importante para os resultados encontrados no queijo. Embora a presença deste microrganismo não constitua um problema de segurança alimentar, é importante conhecer o seu teor no sentido da promoção da melhoria, quer da qualidade higiénica do leite, quer da higiene dos processos de fabrico, dado que em níveis elevados, pode ter reflexos importantes na qualidade do produto final. O metabolismo deste microrganismo e outros coliformes, pode alterar significativamente os atributos físico-químicos e bioquímicos o que se irá refletir nas propriedades sensoriais como textura, aroma e sabor do queijo. Estes microrganismos toleram a acidez e temperaturas baixas do processo de maturação, e um dos efeitos que provocam é o opado ou “flato” precoce devido à produção de CO₂ (Martins & Martins, 2013). De acordo com estes autores, para garantir a qualidade do queijo, seria uma prática adequada limitar os níveis

de *E. coli* a 10^2 - 10^3 ufc/g, valor superior ao referido anteriormente, mas ainda assim abaixo dos resultados obtidos neste trabalho. Apesar disso, a qualidade do queijo não se revelou comprometida, tendo o produto no final as características adequadas de textura, aroma e sabor.

Os resultados encontrados por Veiga (2012) nas amostras de queijo produzidos a partir de leite cru, foram todos < 1 log ufc/g. Foi realizado também em Portugal um outro trabalho, o qual consistiu na avaliação da contaminação por *Escherichia coli* dos queijos produzidos com leite cru, com base na interpretação de dados laboratoriais de 196 amostras de queijos diferentes, obtidos por diferentes metodologias de fabrico, tendo por base o banco de dados do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) e que envolveu queijos nacionais e estrangeiros. Foram encontradas 4 amostras com valores entre 1 e 2 log ufc/g, 28 de 2 e 3 log ufc/g, 17 de 3 e 4 log ufc/g, 20 de 4 a 5 log/g, 13 de 5 a 6 log ufc/, 4 de 6 a 7 log ufc/g, e 1 de 7 a 8 log ufc/g. Seis das amostras correspondiam a queijo de Azeitão sendo que 4 apresentavam valores > 5 log ufc/g, 1 > 6 log ufc/g e a restante > 3 log ufc/g, resultados muito idênticos aos encontrados neste trabalho (Fernandes, 2017). Este mesmo autor compilou os dados das características físico-químicas dos diferentes queijos para poder concluir se influenciariam os resultados. Concluiu que os queijos com uma percentagem de humidade mais elevada (61 a 69%), onde se inclui o queijo de Azeitão, apresentavam também as contagens mais elevadas. Relativamente ao teor de sal, ligado diretamente à a_w , verificou que o queijo de Azeitão apresentava o teor mais baixo (4%). E no que respeita ao período de maturação, é um dos que tem o período mais curto (20 dias), verificando-se que nos queijos com períodos de maturação mais elevados são raras contaminações altas (Fernandes, 2017).

Resumindo, o queijo de Azeitão DOP apresenta um conjunto de características que não dificulta o crescimento dos microrganismos. Comparando os resultados do presente trabalho, verifica-se que o microrganismo *E. coli* desenvolve-se mais ativamente no queijo DOP do que no queijo NDOP, existindo, muito provavelmente, algumas características específicas no leite regional que favorecem a sua proliferação.

Almeida *et al.* (2007), em 70 amostras de diferentes tipos de queijo, encontraram valores de < 1 a 6,18 log ufc/g, o que não difere muito dos valores do presente trabalho. Já os valores encontrados por Guterres (2013), situaram-se entre 6,31 e 6,83 log ufc/, superiores aos do presente estudo. Outro trabalho realizado em 45 amostras de queijo Minas frescal, evidencia que a maioria das amostras, 19, apresentou contagens em níveis baixos de 2,7 log ufc/g, até 3 log ufc/g 8 amostras, entre 4 e 5 log ufc/g 14 amostras e

entre 6 e 7 log ufc/g 4 amostras (Passos, Ferreira, Juliani, Santana & Alegro, 2009). Rosengren, Fabricius, Guss, Sylvén & Lindqvist (2010), efetuaram um estudo em 131 amostras, 44 das quais revelaram contagens de *E. coli*, sendo que 14 amostras revelaram níveis entre 3 e 5 log ufc/g e 2 >5 log ufc/g. Em 2016, a FDA efetuou um estudo com 1606 amostras de queijo fabricado com leite cru e com um período da maturação de 60 dias, tendo como critério 10 log ufc/g. Apenas 5,4% correspondentes a 87 amostras excederam o critério, sendo que 5 amostras eram de queijos portugueses (FDA, 2016). Estes resultados apontam no sentido de que um período de maturação mais longo leva a um decréscimo de microrganismos (Kongo, Gomes, Malcata & McSweeney, 2009).

Nos resultados registados no presente estudo constata-se que os valores se encontram acima do limite considerado satisfatório, devendo-se, desta forma, rever os processos de higiene a nível da produção dos queijos, e cuidados ao nível da contaminação cruzada.

4.1.1.3. **Estafilococos coagulase positiva**

Como se pode observar na Tabela 8, a média foi para o dia 1 de 4,90 log ufc/g, no dia 10 de 5,14 log ufc/g e no dia 20 de 4,55 log ufc/g. Relativamente aos queijos DOP a média do dia 1 foi de 4,86 log ufc/g. No que respeita ao dia 10 a média foi de 5,07 log ufc/g e para o dia 20 foi obtida uma média de 4,50 log ufc/g. Para o queijo NDOP a média do dia 1 foi 4,97 log ufc/g, para o dia 10 foi 5,29 log ufc/g e no dia 20 obteve-se uma média de 4,65 log ufc/g.

No Gráfico 10 podemos observar as médias e o respetivo desvio padrão dos valores das contagens de STA, por dia de análise e por tipo de queijo, enquanto no Gráfico 11 verificamos a distribuição dos resultados das contagens igualmente por dia de análise e por tipo de queijo sendo possível verificar uma grande dispersão dos resultados.

A análise do Gráfico 10 e do Gráfico 11 permite-nos concluir que nos queijos DOP, do dia 1 para o dia 10 ocorre um aumento não significativo nos níveis de contagem deste microrganismo, e para o dia 20 verificou-se uma redução significativa ($p=0.031$). No que respeita aos queijos NDOP não ocorreram diferenças significativas ($p>0,05$).

Os limites para a contagem de *Estafilococos coagulase positiva* estão estabelecidos na legislação (Regulamento 2073/2005) sendo de 4 log ufc/g, com 2 amostras num total de 5 do mesmo lote poderem situar-se entre 4 e 5 log ufc/g. A grande maioria dos resultados obtidos no presente estudo foram superiores a este limite, havendo indicação no regulamento das medidas a tomar no caso de resultados insatisfatórios,

nomeadamente de melhoria da higiene na produção e da seleção de matérias-primas. De referir que o leite cru da região revelou uma contagem de 4,97 log ufc/g e o leite de fora da região 3,57 log ufc/g. A legislação refere ainda que no caso de amostras com contagens > 5 log ufc/g deve ser efetuada a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, o que neste estudo foi efetuado em 13 amostras com resultados deste nível. Estafilococos coagulase positivos podem ser associados a surtos de intoxicação pela capacidade de produzirem enterotoxinas (CDC, 2020). É necessário um nível de Estafilococos coagulase positiva de cerca de 10^5 ufc/g para a produção de 100 a 200 ng de enterotoxina, quantidade capaz de provocar doença (Forsythe, 2000; Ray & Bhljnia, 2014).

Embora os resultados sejam elevados encontram-se em ordens de grandeza semelhantes às referidas por outros autores. Oliveira, Carvalho, Ramos & Gelatti (2015), realizaram um estudo em queijos artesanais, obtiveram uma média de 5,71 log ufc/g com um mínimo de 5,08 e um máximo de 6,00 log ufc/g. Outros autores, Komatsu, Rodrigues, Loreno & Santos (2010), num trabalho realizado em 50 amostras de queijo Minas frescal, encontraram resultados mais baixos, já que as amostras se situaram todas em níveis < 1 log ufc/g e < 6 log ufc/g. Um outro estudo refere contagens >3,70 log ufc/g em 82,14% das amostras (Antonello, Kupkovski & Bravo, 2012). A maior parte das 19 amostras estudadas por Passos *et al.* (2009), num total de 45 amostras de queijo Minas frescal, apresentaram contagens < 2,79 log ufc/g (42,2%). De 2,70 a 3 log ufc/g foram 8 amostras (17,8%), entre 4 e 5 log ufc/g (31,1%), de 6 a 7 log ufc/g 4 amostras (8,8%). Embora com alguns resultados baixos, muitas amostras do estudo destes autores, apresentaram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Um outro estudo realizado em 181 amostras de diversos tipos de queijo, encontrou estafilococos coagulase positiva em apenas 14 amostras com valores entre 1 e 5,93 log ufc/g (Akineden, Hassan, Schneider & Usleber, 2008). Pintado *et al.* (2008), encontraram valores entre 4,13 e 4,89 ufc/g, em queijo Terrincho. Já Almeida *et al.* (2007) encontraram valores mais baixos, de <1 a 3,86 log de ufc/g. No trabalho realizado por Guterres (2013) foram obtidos valores entre 3,16 e 4,09 ufc/g. Rosengren *et al.* (2010), verificaram que 88 amostras eram positivas mas apenas 30 com valores entre 3 e 5 log ufc e apenas 6 >5 log ufc/g, enquanto no presente estudo foram 15 as amostras com resultado >5 log ufc/g num total de 92. Por outro lado, Jakobsen, Heggeb, Sunde & Skjervheim (2011) encontraram resultados inferiores num estudo de acompanhamento em 9 quintas diferentes com uma média de 3,22 log ufc/g após 1 dia de maturação e 0,80 log ufc/g após 30 dias de maturação. Borges, Nassu, Pereira, Andrade & Kuaye (2008) observaram em amostras de uma linha de

processamento, valores entre <1 e $3,41 \log \text{ ufc/g}$. Num trabalho de revisão que refere vários estudos efetuados em diferentes tipos de queijo, os níveis encontrados variaram entre 4 e $> 8 \log \text{ ufc/g}$ (Reis & Malcata, 2011). Kousta *et al.* (2010), também num trabalho de revisão, referem vários trabalhos que detetaram *Estafilococos* coagulase positiva em elevadas percentagens embora sem referir os níveis encontrados. De igual modo, Varreas *et al.* (2015) citam vários trabalhos que encontraram esta bactéria em níveis de $< 3, 4$ ou $5 \log \text{ ufc/g}$.

4.1.2. Pesquisa de Microrganismos patogénicos

A ausência de microrganismos patogénicas em queijo pode ser relacionada com a presença de BAL no processo de maturação, que inibem a sua presença (Ortolani, Yamazi, Moraes, Viçosa, & Nero, 2010). As BAL podem inibir a presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ao possuírem atividade antimicrobiana devido à produção de ácido láctico e péptidos antimicrobianos, havendo vários estudos publicados que o comprovam (Neto *et al.*, 2005; Martins, Mendonça & Silva, 2006; Chioda *et al.*, 2007; Akineden *et al.*, 2008; Nero *et al.* 2008; Ortolani *et al.*, 2010). Tem sido evidenciado que produtos com uma fraca qualidade higiénica apresentam uma tendência de menor contaminação por patogénicos, o que se configura como um paradoxo que pode ser explicado pela presença de microbiota autóctone, que inclui as BAL, a qual interfere e inibe a proliferação de patogénicos (Jay, 1995; Jay, 1996; Nero *et al.*, 2008; Ortolani *et al.*, 2010). Apesar desta relação entre a microbiota própria e a competição direta com alguns patogénicos, é de extrema relevância que haja boas práticas em relação à obtenção e processamento do leite e produtos lácteos, para que os mesmos tenham alta qualidade, quer microbiológica quer organolética, e também segurança. No entanto, à medida que melhora a qualidade microbiológica do leite e produtos lácteos, as contagens da microbiota competitiva e a produção de substâncias antagonistas dos patogénicos de origem alimentar baixam, indicando a necessidade de alto controle higiénico para manter e garantir a qualidade microbiológica e a segurança dos produtos lácteos (Ortolani *et al.*, 2010).

De acordo com Noronha (2003), o crescimento de bactérias é prevenido quando se atinge pH entre 4,5 e 5,5.

Observando os resultados do presente trabalho, constata-se que, apesar de não existir a presença de microrganismos patogénicos como *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, verifica-se a presença de Microrganismos Totais a 30°C , *E. coli* e

Estafilococos coagulase positiva, mesmo em valores de pH aos quais não seriam expectáveis, o que indica que as condições de higiene envolvidas em todo o processamento, desde a matéria-prima até à finalização do queijo, devem ser melhoradas.

4.1.2.1. *Salmonella species*

No que se refere à pesquisa de *Salmonella* spp. não foram encontrados resultados positivos, o que está de acordo com a maioria da bibliografia consultada (Akineden *et al.*, 2008; Kongo, Gomes & Malcata 2008; Nero *et al.*; 2008; Ortolani *et al.*, 2010; Veiga, 2012; Guterres, 2013).

Verifica-se assim que todas as amostras analisadas neste trabalho estão de acordo com o Regulamento (CE) 2073/2005 relativamente a este parâmetro.

No entanto, outros autores encontraram resultados positivos. Num estudo desenvolvido por Almeida *et al.* (2007), em 70 amostras de diferentes tipos de queijo, foram detetadas 3 amostras positivas. Antonello *et al.* (2012) encontraram 17,85% das suas amostras positivas para esta bactéria. Pelo contrário, no trabalho desenvolvido pela FDA (2016), apenas 3 amostras testaram positivas para *Salmonella* spp..

Listeria monocytogenes

Relativamente à pesquisa de *L. monocytogenes*, não foram encontrados resultados positivos e, por consequência, todas as amostras cumprem o Regulamento (CE) 2073/2005. De igual modo, Ortolani *et al.* (2010) e Veiga (2012) não detetaram nenhuma amostra positiva.

A maioria dos trabalhos consultados revelam a deteção desta bactéria. Num estudo realizado em Portugal em 30 amostras de queijos de pasta mole foram detetadas 4 amostras positivas, sendo que 3 destas estavam num nível $> 2 \log \text{ ufc/g}$ (Gonçalves, Furtado, Coelho, Correia & Valente, 2017). Também Almeida *et al.* (2007) encontraram 8 amostras positivas, das quais 7 revelaram nível $< 2 \log \text{ ufc/g}$. Num estudo realizado pela FDA (2016) foram encontradas 10 amostras positivas (0,62%). Em Portugal, num trabalho realizado em queijo da Serra, foram detetadas 29 amostras positivas (Pintado, Oliveira, Pampulha & Ferreira, 2005). Outros autores, num outro trabalho realizado na Grécia, detetaram 4 amostras positivas (8%) em queijos de pasta mole (Filiossis, Johansson, Frey & Perreten, 2008). Karadal & Yildirim (2014) detetaram apenas 2 amostras positivas (1%) num trabalho levado a cabo na Turquia. Também Manfreda, De Cesare, Stella, Cozzi & Cantoni (2005), encontraram uma baixa percentagem de amostras

contaminadas, 2,1%, logo após o embalamento e 4,8% no final do prazo de validade em queijo Gorgonzola. Um outro trabalho encontrou 6,7% de 90 amostras de queijo de vários tipos contaminadas com esta bactéria (Abrahão, Abrahão, Monteiro & Pontarolo, 2008). Num artigo de revisão encontram-se referências a vários estudos recentes que apontam prevalências a variar de 0 a 37,5% em queijo fresco. Em queijo de pasta mole e semi mole a percentagem situou-se entre 0 e 14% (Gerard, El-Hajjaji, Niyonzima, Daube & Sindic, 2018).

As bactérias do género *L. monocytogenes*, pelas suas características, instalam-se facilmente e multiplicam-se nas instalações industriais alimentares, alojando-se em locais de difícil acesso aos desinfetantes, aderindo às superfícies e formando biofilmes, podendo permanecer por muito tempo, sendo difíceis de eliminar. Estas bactérias são resistentes a pH ácido (4,3), concentrações de NaCl superiores a 10%, baixas tensões de oxigénio e multiplicam-se a temperaturas de refrigeração (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Ferreira, 2010). Daqui ressalta a importância da aplicação das BPH e do sistema de segurança HACCP, bem como a combinação adequada dos fatores intrínsecos e extrínsecos, nomeadamente pH, aw, concentração de NaCl e condições de tempo/temperatura ao longo de todo o processamento (Gonçalves et al., 2015).

4.1.2.2. Pesquisa de Enterotoxinas Estafilocócicas

Nenhuma das amostras se revelou positiva para a enterotoxina estafilocócica. De igual modo, Lindqvist, Sylven & Vagsholm (2002) e Cremonesi *et al.* (2007) não detetaram enterotoxina nas amostras de queijo.

Delbes, Alomar, Chougui, Martin & Montel (2006), identificaram 5 amostras com toxina positiva. No estudo de De Reu, Debeuckelaere, Botteldoorn, De Block & Herman (2002) apenas 1 amostra (1,4%) se revelou positiva. Borges *et al.* (2008) detetaram a presença de enterotoxina em 20% (4/20) das amostras analisadas, no leite cru e, consequentemente, também detetadas no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo obtido a partir desse leite. Vários estudos, embora sem detetar enterotoxina nas amostras de queijo, verificaram que as estirpes de estafilococos isoladas eram produtoras de toxinas visto possuírem os genes que as codificam, nomeadamente SEs e SEls (Cremonesi *et al.*, 2007; Akineden, *et al.*, 2008; El-Sharoud & Spano, 2008).

De acordo com Baird-Parker, T., Lund. B. & Gould, G. (2000), a produção de enterotoxina ocorre a pH superior a 5,0, sendo o ideal entre 7,0 e 8,0, e a temperatura

superior a 10 °C até 45-46 °C, não existindo no queijo condições favoráveis à sua produção.

4.2. Discussão dos Resultados da Análise de pH

Para o tratamento estatístico os dados foram agrupados em 3 períodos de tempo.

Pela observação dos Gráficos 12 e 13, verifica-se que o pH dos queijos DOP, apresentam valores mais altos comparativamente aos queijos NDOP, exceto no período final em que o DOP se apresenta ligeiramente mais baixo (5,16).

No gráfico 12 constata-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de pH no dia 1 e durante a evolução da cura após 10 dias e 20 dias. Existem também diferenças entre DOP e Não DOP no 1º dia e nos 10 dias seguintes, sendo que após 20 dias as diferenças já não são significativas.

No decorrer dos 20 dias de maturação verificaram-se variações nos valores médios de pH das amostras de queijo analisadas, sendo o pH bastante elevado inicialmente (6,65), terminando em valores médios aproximados de (5,32). No presente estudo constatou-se que os valores mais reduzidos de pH se verificaram no dia 11 de maturação, 4,96 no queijo DOP (Apêndice 2), possivelmente devido à presença e desenvolvimento das BAL presentes, com a consequente produção de ácido láctico, ao longo do processo de maturação, assim como da formação de aminoácidos resultantes da atividade proteolítica que se verifica no processo de maturação. A acidez dos queijos é bastante importante pelo facto de poder inibir o crescimento de microrganismos. As BAL têm extrema importância pelo facto de produzirem péptidos antimicrobianos e serem as responsáveis pela fermentação da lactose e redução do pH entre valores de 4,5 e 5,5, determinando a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos, que dependem, igualmente, de outros fatores como a atividade da água (Cabezas *et al.*, 2007; Settanni & Moschetti, 2010). Num estudo realizado por Veiga (2012) em Lisboa, registaram-se valores finais de pH entre 4,76 e 6,06, semelhantes aos registados na presente dissertação. Outros estudos como Alves *et al.* (2003) e Freitas & Malcata (2000) revelaram valores semelhantes.

4.3. Discussão dos Resultados da Correlação entre os Valores de pH e as Contagens de Microrganismos

Como se pode observar na Tabela 10, verificou-se uma forte correlação negativa (coeficiente de correlação -0,848) entre os valores de pH e os valores de Microrganismos Totais a 30 °C, indicando que as contagens aumentam quando o pH desce. Esta correlação pode ser explicada pelo facto das BAL fazerem parte deste conjunto de microrganismos, e é devido ao seu desenvolvimento e produção de ácidos, principalmente ácido láctico, que ocorre a descida do pH. Podemos dizer que o pH está dependente da contagem de microrganismos a 30 °C. O mesmo se verifica com os níveis de *Escherichia coli*, embora a correlação seja mais fraca (coeficiente de correlação -0,492). A correlação com os valores de Estafilococos coagulase positiva é próximo de 0 não existindo correlação entre eles.

Entre os níveis dos diferentes microrganismos, constata-se que os Microrganismos a 30 °C e *E. coli* se encontram correlacionados positivamente embora a correlação não seja muito forte (coeficiente de correlação -0,475). Entre *E. coli* e Estafilococos coagulase positiva, embora exista uma correlação, verifica-se que é fraca (coeficiente de correlação 0,329).

5. Conclusão

A presente dissertação teve como principal objetivo avaliar os níveis de microrganismos no queijo de Azeitão, ao longo do processo de maturação, assim como relacionar a sua presença com as variações do pH, tendo sido os objetivos atingidos, conseguindo compreender-se que a carga microbiana foi elevada. Não existem muitos estudos desta natureza sobre o queijo de Azeitão, por isso este trabalho vem contribuir para a compreensão geral do comportamento deste queijo ao longo do processo de maturação (20 dias).

Não foi detetada nenhuma amostra com *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* nem enterotoxina estafilocócica. As contagens efetuadas revelaram níveis elevados de Microrganismos Totais a 30°C, *Escherichia coli* e Estafilococos coagulase positiva, com valores superiores aos valores limite, mas, de um modo geral, comparáveis com outros trabalhos publicados.

Verificou-se que as contagens variam ao longo do tempo e de modo diferenciado para os queijos DOP e NDOP. No queijo DOP, para os Microrganismos Totais a 30 °C,

verifica-se um aumento acentuado das contagens do 1º para o 10º dia com uma diferença significativa ($p < 0,05$), devido à multiplicação intensa das BAL, e um ligeiro abaixamento no 20º dia. No queijo NDOP verifica-se uma contagem à partida mais elevada, um aumento menos acentuado no 10º dia e continua a aumentar no 20º dia, mas sem diferenças significativas ($p > 0,05$). Verificou-se uma diferença significativa entre as contagens dos dois tipos de queijo. Estes resultados elevados vão potencialmente influenciar as características finais deste queijo, devido aos processos microbiológicos, químicos e bioquímicos que ocorrem durante o processo de maturação. No que respeita a contagem de *E. coli*, nos queijos DOP ocorreu um aumento significativo do dia 1 para o dia 10, com estabilização para o dia 20, enquanto nos NDOP, houve uma diminuição não significativa para o dia 10 e manteve-se igual no dia 20. Já a contagem de *Estafilococos coagulase positiva* verificou um aumento não significativo do dia 1 para o dia 10 e redução significativa para o dia 20. No que respeita aos queijos NDOP não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os valores de pH apresentaram uma forte correlação negativa com os valores da contagem de microrganismos totais a 30 °C, indicando que o pH desce quando as contagens aumentam devido à produção de ácido láctico pelas BAL. Verificou-se uma correlação mais fraca com os valores de *E. coli* e não se verificou correlação com os valores de *Estafilococos coagulase positiva*. Verificou-se relação entre a variação de pH e a presença de microrganismos, constatando-se que, a meio do processo de maturação do queijo, atingem-se os valores médios mais elevados de microrganismos, podendo-se relacionar com a presença das bactérias do ácido láctico.

O queijo em estudo é produzido a partir de leite cru, sendo que a utilização deste leite pretende oferecer uma complexidade de atributos que vão definir a tipicidade do produto, que são difíceis de reproduzir em situações controladas, mas contribuem para a qualidade final do queijo. É verdade que a qualidade do queijo depende da qualidade do leite, do seu microbioma e das suas propriedades intrínsecas, mas depende igualmente das operações de preparação e transformação da matéria prima. Assim as contagens encontradas, sobretudo de *E. coli* e *Estafilococos coagulase positiva*, podem dever-se a deficiências higiénicas nos vários processos de fabrico do queijo. Deve-se assim, devido ao referido anteriormente, melhorar o processamento do mesmo para que se consigam reduzir as cargas dos microrganismos encontradas em contagens superiores ao considerado satisfatório para que os queijos se considerem com qualidade microbiológica e seguros do ponto de vista da saúde pública.

Estudos como o realizado na presente dissertação são de extrema importância para que se consiga compreender quais as medidas a tomar de modo a que o número de microrganismos potencialmente prejudiciais à saúde pública possa ou ser reduzido para valores aceitáveis ou evitar a sua existência no caso de serem patogénicas. Deve-se, desta forma, adotar medidas higiénicas, com consciencialização e educação das pessoas participantes no processo de fabrico do queijo para os riscos que comportam as falhas nas medidas de higiene a ser tomadas e o risco que os microrganismos comportam.

6 - Bibliografia

- Abrahão, W., Abrahão, P., Monteiro, C., & Pontarolo, R. (2008). Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos e sorvetes produzidos no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 289-296.
- Adams, M.R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiol.* (3^a ed.) p. 36, 47, 218. Guildford: The Royal Society of Chemistry.
- Adnan, A.F.M. & Tan, I.K.P. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technol.*, 98, 1380–1385.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments [AFSSA] (2008). Avis relatif à la demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes utilisables en tant qu'indicateurs d'hygiène des procedes. AFSSA, *Saisine 2007-SA-0215*. Acedido em 6 de maio de 2020 em: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2007sa0174.pdf>
- Akineden, O., Hassan, A.A., Schneider, E. & Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 124, 211–216.
- Albenzio, M., Santillo, A., Marino, R., Malva, A.D., Caroprese, M. & Sevi, A. (2015). Identification of peptides in functional Scamorza ovine milk cheese. *Int. J. Dairy Sci.* 98, 8428–8432
- Alexandre, D.P., Silva, M.R., Souza, M.R. & Santos, W.L.M. (2002). Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 54, 5-13.

- Allerberger, F., Kreidl, P., Dierich, M.P., Klingsbichel, E., Jenewein, D., Mader, C., *et al.* (2000). Salmonella enterica serotype Oranienburg infections associated with consumption of locally produced tyrolean cheese. *Euro Surveill.* 5, 123–126.
- Almeida, G., Figueiredi, A., Rôla, M., Barros, R.M., Gibbs, P., Hogg, T. & Teixeira, P (2007). Microbiological Characterization of Randomly Selected Portuguese Raw Milk Cheeses with Reference to Food Safety. *J Food Prot.* 70, 1710–1716
- Alvarenga, N., Silva, P., Garcia, J.R. & Isabel Sousa (2008). Estimation of Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR) considering rheological, physical and chemical data. *J Dairy Sci* 75, 233–239.
- Alves, M.M., Martins R.B., Raymundo, A. & Barbosa, M. (2003). Queijo de Cabra Transmontano. Aprofundamento da caracterização do leite de cabra Serrana, ecotipo transmontano e respectivo Queijo DOP - Caracterização Preliminar do Queijo. *Acta do 6º Encontro de Química de Alimentos*. Lisboa, 22-25 de Junho de 2003.
- Andrade, J.C., Deliza, R., Yamada, E.A., Galvão, M.T.E.L., Frewer, L.J. & Beraquet, N.Y. (2013). Perceção do consumidor frente aos riscos associados aos alimentos, sua segurança e rastreabilidade. *Braz J Food Technol*, 16, 184-191.
- Antonello, I., Kupkovski, A. & Bravo, C.C. (2012). Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. *Revista Thema*, 9, 1-6.
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F.K., Santos, M.T.P.G., Alvarenga, N. & Pintado, M.M. (2020). A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese. *Int. Dairy J.*
- Argyri, A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J., Panagou, E. & Tassou, C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol.*, 33, 282–291.
- Austin, C., Saathoff-Huber, L., Bordson, M., Dobbins, C., Gross, C., Marishta, K., *et al.* (2008). Outbreak of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Newport infections associated with consumption of unpasteurized Mexican-style aged cheese—Illinois, March 2006–April 2007. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 57, 432–435.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2013). *Riscos e Alimentos. Leite e produtos lácteos.*
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2019a). *Segurança alimentar riscos biológicos Listeria monocytogenes.* Acedido a 12 de maio de 2019 em:

<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/listeria-monocytogenes.aspx>.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2019b). *Segurança alimentar riscos biológicos Staphylococcus aureus*. Acedido a 12 de maio de 2019 em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE] (2009). *Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*. Lisboa: Ministério da Economia e Inovação. Acedido em 3 de maio de 2019 em: <http://www.asae.gov.pt/noticias/noticias-de-2012-e-anteriores/anteriores-a-2012/perfil-de-risco-dos-principais-alimentos-consumidos-em-portugal.aspx>

Bachmann, H., Kruijswijk, Z., Molenaar, D., Kleerebezem, M. & van Hylckama Vlieg, J. (2009). A high-throughput cheese manufacturing model for effective cheese starter culture screening. *J Dairy Sci.* 92(12):5868-82.

Bachmann, H.P., Frohlich-Wyder, M.T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuvier, E., et al. (2011). Raw milk cheeses. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (Vol. 1, pp. 652-660).. London, UK: Academic Press.

Baião, A. (2007). Acompanhamento do Processo de Fabrico do Queijo Serpa. Relatório de trabalho de fim de licenciatura em Engenharia Técnica Alimentar. Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Beja. Beja. (p.30).

Baird-Parker, T., Lund. B. & Gould, G. (2000). *Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publication.

Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., et al. (2017). Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* Vol 00, 1-16.

Bell, C., Neaves, P. & Williams, A.P. (2005). *Food microbiology and Laboratory Practice*. Carlton: Blackwell Publishing.

Bergdoll, M.S. (1990). Staphylococcal food poisoning. Cliver, D.O.(Ed.) *Foodborne Diseases*. Academic Press. USA. 85-106 .

BIOKAR Diagnostics (2018). *Fiche technique – Bouillon Tryptone-Sel*. In www.biokar-diagnostics.fr. Acedido em 10 de junho de 2019 em: http://www.solabia.com/Produto_162,9/BIOKAR-Diagnostics/TRYP-TONE-SEL---Bouillon-.html

- bioMérieux (2018d). VIDAS® *Staph enterotoxin II* (SET2). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 3 de fevereiro de 2020 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/95138001-95139000/Package_Insert_-_12095_-_K_-_pt_-_30705.pdf
- bioMérieux, (2014a). Caldo FRASER ½ In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 21 de Janeiro de 2020 https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/44340001-44341000/Package_Insert_-_08491_-_I_-_pt_-_42048_-_42112_-_42627_-_42727.pdf
- bioMérieux, (2014b). Tempo® AC (Flora total). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/41105001-41106000/Package_Insert_-_9301732_-_C_-_fr_-_411113.pdf
- bioMérieux, (2014c). Caldo SX2 (SX2-T). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/52818001-52819000/Package_Insert_-_13882_-_C_-_pt_-_42121.pdf
- bioMérieux, (2014d). Caldo FRASER - (FRASER T). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/52809001-52810000/Package_Insert_-_12560_-_C_-_pt_-_42072.pdf
- bioMérieux, (2016). *Água peptonada tamponada* . In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 2 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/66084001-66085000/Package_Insert_-_08441_-_H_-_pt_-_42042_-_42043_-_42111_-_42729.pdf
- bioMérieux, (2018a). VIDAS® *Salmonella* (SLM). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/94456001-94457000/Package_Insert_-_06984_-_Y_-_pt_-_30702.pdf
- bioMérieux, (2018b). VIDAS® *Listeria monocytogenes II* (LMO2). In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em:

- https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/104314001-104315000/Package_Insert_-_11600_-_R_-_pt_-_30704.pdf
bioMérieux, (2018c). *Tempo® EC (E. coli)*. In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/108476001-108477000/Package_Insert_-_12597_-_M_-_pt_-_80004.pdf
bioMérieux, (2019). *Tempo® STA*. In <https://www.mybiomerieux.com>. Acedido em 5 de junho de 2019 em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/111226001-111227000/Package_Insert_-_12595_-_I_-_pt_-_80002.pdf
- Bjorkroth J. & Koort, J. (2011). Lactic acid bacteria: Taxonomy and Biodiversity. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Sciences*. Academic Press, London, pp. 45-48.
- Blom, U. N. & Weréen, P. (2002). Cheese and cheese-making – with special emphasis on Swedish cheeses. *Bioscience explained*. 1(2).
- Booyensa, C., Dicks, L., Meijering, I. & Ackermann, A. (2002). Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *Int. J. Food Microbiol.*, 76, 63–73.
- Borges, M.F., Nassu, R.T., Pereira, J.L., de Andrade, A.P.C. & Kuaye, A.Y. (2008). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438
- Brasil, R.B., Nicolau, E.S., Cabral, J.F. & Silva, M.A.P (2015). Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. *Cienc Animal* 25 (2): 71-80
- Burkhalter, G. (1981). Catalogue of Cheese, (141). *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.
- Cabezas, L., Sanches, I., Poveda, J. M., Seseña, S. & Palop, M.L.L. (2005). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchvgo cheeses from two dairies. *Food Control*.
- Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A. & Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *Int Dairy J*, 191–200.
- Carpentier, B. & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipments and premises. *Int. J. Food Microbiol.*, 145, 1–8

- Carrascosa, C., Millán, R., Saavedra, P., Jaber, J.R., Raposo, A. & Sanjuán, E. (2016). Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. *J Dairy Sci*, Vol. 99 No. 4, 2606-2616.
- Carrique-Mas, J.J., Hökeberg, I., Andersson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-Tham, M.L., *et al.* (2003). Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese--an outbreak of listeriosis? *Epidemiol Infect*, 130, 79–86.
- Center for Disease Control. [CDC]. (2020). Game Day Food Safety Tips: Keep it safe. *Food Safety*. Acedido em 3 de fevereiro de 2020 em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/rules-of-game.html>
- Chioda, T.P., Schocken-Iturrino, R.P., Garcia, G. R., Pigatto, C.P., Ribeiro, C.A.M.R. & Ragazzani, A. V. F. (2007). Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo Minas Frescal por *Lactobacillus acidophilus*. *Cien Rural*, 37(2) Acedido a 15 de Abril de 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n2/a48v37n2.pdf>.
- Choi, K.H., Lee, H., Lee, S., Kim, S. & Yoon, Y. (2016). Cheese Microbial Risk Assessments - A Review. *Asian Austral J Anim*, 29 (3), 307-314.
- Codex Alimentarius (2003). *Higiene dos Alimentos, Textos Básicos*.
- Codex Alimentarius Commission (2011). Codex Alimentarius Procedural Manual. (20th ed.) Roma. FAO/WHO. Acedido em Nov. 1, 2011, disponível em ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf
- Coton E. & Leguerinel, I. (2014). Ecology of Bacteria and Fungi in Foods. Effects of pH. In: Batt, C.A. & Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2ª Ed. Vol. 1, pp. 577- 586,. Oxford, Elsevier.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M & Castiglioni, B. (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Applied Microb* 0266-8254.
- Crispim, G. (2014). Controlo do Crescimento Bacteriano. Acedido a 20 de Maio de 2019. Disponível em <https://pt.slideshare.net/gildocrispim/controle-crescimentomicrobiano-esterilizao>.
- Cruz, A.D.G., Buriti, F.C.A., Souza, C.H.B., Faria, J.A.F. & Saad, S.M.I. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspect. *Trends in Food Sci Technol*, 20 (8): 344-354.

- D'Amico, D.J. & Donnelly, C.W. (2017). Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D. & Everett, D.W (Eds.), Cheese: chemistry, physics, and microbiology. (4th ed., pp 23-50). San Diego, USA: Academic Press.
- De Reu, K., Debeuckelaere, W., Botteldoorn, N., Block, J., & Herman, L. (2002). Hygienic parameters, toxins, and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *J Food Saf*, 22, 183–196.
- Decreto Regulamentar nº49/86. Diário da República nº 140, I série, de 2 de outubro de 1986.
- Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Marti, J.F. & Montel, M.C (2006). *J Food Prot* 69 (9): 2161–2167.
- Despacho nº6400/2003, 1986 de 1 de Abril de 2003. Diário da República – II série.
- Despacho Regulamentar nº49/86 de 2 de Outubro de 1986. Diário da República – I série.
- Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR] (2016). Inquérito aos Agrupamentos de Produtores de Produtos com DOP/IGP/ETG. Dados sobre a produção, preços e comercialização de produtos agrícolas e géneros alimentícios com nomes registados como Denominação de Origem Protegida, Indicação Geográfica Protegida ou Especialidade Tradicional Garantida.
- Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR] (2017). Inquérito aos Agrupamentos de Produtores de Produtos com DOP/IGP/ETG. Dados sobre a produção, preços e comercialização de produtos agrícolas e géneros alimentícios com nomes registados como Denominação de Origem Protegida, Indicação Geográfica Protegida ou Especialidade Tradicional Garantida.
- Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR] (2018). Inquérito aos Agrupamentos de Produtores de Produtos com DOP/IGP/ETG. Dados sobre a produção, preços e comercialização de produtos agrícolas e géneros alimentícios com nomes registados como Denominação de Origem Protegida, Indicação Geográfica Protegida ou Especialidade Tradicional Garantida.
- Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural [DGADR] (2019). Queijo de Azeitão DOP. Acedido a 18 de Abril de 2019. Disponível em <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/33-queijo-de-azeitao>.
- Direção Geral de Veterinária (2012). Programa de Erradicação da Brucelose de Pequenos Ruminantes.

- Donnelly, C. W. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: Hui, Y. H.; Pierson, M.D.; Gorham, J. R.(Ed.). *Foodborne disease handbook*. (2nd ed.). (pp.213-246). New York: M. Dekker.
- Downes, F. P. & Ito, K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th Ed.). Washington: American Public Health Association.
- El-Sharoud, W. & Spano, G.(2008). Diversity and Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. Associated with Domiati Cheese. *J Food Prot* 71 (12): 2567–2571.
- Espitia, P., Soares, N., Coimbra, J., Andrade, N., Cruz, R. & Medeiros, E. (2012). Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 11, 187–204.
- European Commission [EC] (2003). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health: Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products, Particularly Cheeses. *Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate C - Scientific Opinions C2 - Management of scientific committees; scientific co-operation and networks*. Acedido em 18 novembro 2019 em https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scv_out61_en.pdf
- European Food Safety Authority [EFSA] (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic 533 Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. 534 *EFSA Journal*, 130, 1–352. Acedido em 22 de maio de 2019 em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-of-zoonoses-zoonotic-agents-food-borne-outbreaks-in-2006.pdf>.
- European Food Safety Authority [EFSA] (2009). The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007, *EFSA Journal* (2009), 271
- European Food Safety Authority [EFSA] (2019). Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926
- Fagan, C.C., O’Callaghan, D. J., Mateo, M.J. & Dejmek, J. (2017). The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D. & Everett, D.W (Eds.), *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. (4th ed., pp 145-177). San Diego, USA: Academic Press.

- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, 55, 476–511.
- Fernandes, F. (2017). *Escherichia coli* em queijos produzidos com leite cru. Relatório apresentado no âmbito do Estágio do curso de Engenharia Alimentar - Escola Superior Agrária de Coimbra. Orientado por Maria Paula Pinto Amador.
- Ferraz, A. (2017). Estudo das vias de contaminação de *Listeria monocytogenes* numa queijaria. PFGE, serotipagem, WGS e resistência a desinfetantes. Tese apresentada para obtenção do grau de mestre, Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Ferreira, E.S.V. (2010). Implementação da norma ISO 22000:2005 numa Indústria de produção de queijo de Azeitão – DOP. Tese apresentada para obtenção do grau de mestre, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera.
- Filioussis, G., Johansson, A., Frey, J. & Perreten, V.(2009). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control* 20(3):314-317
- Food & Drug Administration [FDA] (2016). *Raw Milk Cheese Aged 60 Days. Microbiological Sampling Assignment, Summary Report*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Acedido em 14 de abril e 2019 em: <https://www.fda.gov/media/99340/download>
- Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization [FAO/WHO] (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper 85*, FAO/WHO: Rome. Acedido em 9 de abril de 2019 em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2013). *Milk and dairy products in human nutrition* (pp. 106-111, 214). Rome: Nutrition Division. Acedido em 9 de abril de 2019 em: <http://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>
- Food and Drug Administration [FDA] (2012). *Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook*. (2nd Ed.). US Food and Drug Administration, Silver Spring.
- Food Standards Australia New Zealand [FSANZ] (2013) *Agents of foodborne illness*. 2nd ed, Food Standards Australia New Zealand, Canberra.
- Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar* (1ª ed., pp. 172). Porto Alegre: ArtMed Editora.

- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese: An Overview. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D. & Everett, D.W (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. (4th ed., pp 5-21). San Diego, USA: Academic Press.
- Fox, P.F., Cogan, T.M., Timothy, P & Guinee, T.P. (2017). Factors That Affect the Quality of Cheese. In: P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett, editors. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. (4th ed., pp 617–641) San Diego: Academic Press.
- Fox, P.F., McGuffey, R.K., Shirley, J.E. & Cogan, T.M. (2011). History of Dairy Science and Technology. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 1.
- Franciosi, E., Settanni, L., Carlin, S., Cavazza, S.A. & Poznanski, E. (2007). A Factory-Scale Application of Secondary Adjunct Cultures Selected from Lactic Acid Bacteria During Puzzone di Moena Cheese Ripening. *J. Dairy Sci*, 91, 2981–2991.
- Franco, F.P.S. (1981). Processo de Fabrico Queijo de Azeitão. Acedido a 5 de maio de 2019. Disponível em http://www.azeitao.net/azeitao/queijo/processo_fabrico.htm.
- Freitas, C. & Malcata, F.X. (2000). Our Industry Today. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *J Dairy Sci* 83, 584-602.
- Gaglio, R., Todaro, M., Scatassa, M.L., Franciosi, E., Corona, O., Mancuso, I., et al. (2019). Transformation of raw ewes' milk applying “Grana” type pressed cheese technology: Development of extra-hard “Gran Ovino” cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 307, 108277
- Ganesan, B., Brown, K., Irish, D.A., Brothersen, C. & McMahon, D.J. (2014). Manufacture and sensory analysis of reduced- and low-sodium Cheddar and Mozzarella cheeses. *Journal Dairy Science*, 97(4):1970-82.
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol*, 44, 220–225.
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G. & Sindic, M. (2018). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—a review. *Int J Dairy Technol*, 71, 825–843.
- German, J. B. & Dillard, C. J. (2006). Composition, Structure and Absorption of Milk Lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46, 57–92.

- German, J. B., Gibson, R. A., Krauss, R. M., Nestel, P., Lamarche, B., van Staveren, W. A., et al. (2009). A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur J Clin Nutr*, 48, 191–203.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R. & Rizzello, C.G. (2007). The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In B.C. Weimer (Ed), *Improving the Flavour of Cheese* (1ª Ed., pp. 121-156). Boca Raton: CRC.
- Godfrey, T. & West, S. (1996). *Industrial Enzymology*. 2ª Ed. The Macmilhan Ltd.
- Gomes, S., Belo, A.T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., et al. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *Int Dairy J*, 91, 178-184.
- Gómez, R., Tejada, L., Sánchez, E., Vioque, M., Ferreiras, J. & Fernandez-Salgueiro, J. (2001). Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. 56(1):16-19
- Gonçalves, M., Furtado, R., Coelho, A., Belo Correia, C & Valente, A (2017). Presença de *Listeria monocytogenes* em Queijos de Pasta Mole da Região a Sul do Tejo. *Revista Portuguesa de Saúde Pública* 35 (1).
- Gorris, L.G.M. & Cordier, J.L. (2019). Microbiological Criteria and Indicator Microorganisms. In Doyle, M.P., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C. (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*. (5th Ed., pp. 65-77). Washington, DC: ASM Press.
- Gould, L.H., Mungai, E. & Behraves, C.B. (2014). Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 545–551.
- Grandpierre, C., Ghilsofi, J. & Thouvenot, J.P. (1988). Etude biochimique du lait de chèvre. *Cah.Nutr.Diet*, 23(5), 367-374.
- Guinee, T.P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *Int. J. Dairy Technol.*. Vol 57, No 2/3, 99-109.
- Guterres, P. (2013). *Caracterização do Queijo de Mistura com Adição de Orégãos* (Dissertação de Mestrado). Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco.
- Health Protection Agency [HPA] (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London: Health Protection Agency. Acedido em 5

- de janeiro de 2020 em: <https://www.gov.uk/government/publications/ready-to-eat-foods-microbiological-safety-assessment-guidelines>
- Hove, H., Norgaard, H. & Mortensen, H.B. (1999). Review: Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Nutr*, 53, 339-350.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. (1st Ed.). Blackwell Publishing.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. & Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22, 401–407.
- Institute of Medicine [IOM] (2011). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* (pp. 517). Washington, DC: The National Academies Press.
- Instituto Nacional de Estatística. [INE] (2019a). Estatísticas da Produção de Leite. Acedido em 23 de março de 2020 em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000918&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística. [INE] (2019b). Estatísticas da Produção de Queijo. Acedido em 23 de março de 2020 em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000920&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [INSA] (2019). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: Valores-Guia. Lisboa: INSA IP. Acedido em 5 de janeiro de 2020 em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (ICMSF) (2013). *Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in Food Safety Management*. 2nd Ed. Springer.
- International Dairy Federation [IDF] (2016). *Escherichia coli as indicator in cheese processing*. Acedido a 20 de Abril de 2019. Disponível em <https://www.idf.org/>.
- International Dairy Foods Association [IDFA] (2019). *History of cheese*. Acedido a 10 de Abril de 2019. Disponível em <https://www.idfa.org/news-views/media-kits/cheese/history-of-cheese>.

- International Organization for Standardization [ISO] 19020 (2017). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- International Organization for Standardization [ISO] 21528-2 (2017). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- International Organization for Standardization [ISO] 4833-1 (2013). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- International Organization for Standardization [ISO] 6579-1 (2017). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella —Part 1: Detection of Salmonella spp. International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- International Organization for Standardization [ISO] 6888 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- International Organization for Standardization [ISO] 7218 (2007/Amd 1 2013) Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance of microbiological examinations, International Organization for Standardization, Geneve, Suíça.
- Jay, J.M. (1995). Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? *Dairy Food Environ Sanit*,15:674–677.
- Jay, J.M. (1996). Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci*,43:S59–S66.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7^a ed., pp. 49-51). Nova Iorque: Springer.

- Johnson, M.E. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *J. Dairy Sci.* 100:9952–9965.
- Kalhotka, L., Přichystalová, J., Dostálová, L., Šustová, K., Hůlová, M., Burdová, E. & Kuchtík, J. (2019). Comparison of Microbiological Parameters of Fresh Goat Cheeses Produced on Farms in the Czech Republic Using Conventional and Organic Farming Method. *Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun*, 67, 695-704.
- Kamala, K., Kumar, V.P. (2018). Food Products and Food Contamination. In: A.M. Holban & A.M. Grumezescu (Eds), *Handbook of Food Bioengineering, Microbial Contamination and Food Degradation* (Vol 10, Chapter 1, pp.1-19). Londres: Academic Press.
- KARADAL, F. & YILDIRIM, Y.. (2014). Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw milk cheese samples sold in Nigde. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* , 61, 255-260.
- Komatsu, R.S., Rodrigues, M.A.M., Borges, Loreno, W.B.N., Santos, K.A. (2010). Occurrence of *Staphylococcus* coagulase positive in fresh Minas cheese produced in Uberlândia-MG. *Bioscience Journal* 26, 316-321.
- Kongo J.M., Gomes A.P. & Malcata, F.X. (2008) Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *J Food Prot*;71:986–992.
- Kongo, J. M., Gomes, A. M., Malcata, F. X., & McSweeney, P. L. H. (2009). Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chem*, 112(1), 131–138.
- Korakhashvili, A. & Jeiranashvili, G. (2016). Food Safety Hazards in Georgian Tushuri Guda Cheese. *Ann. Agrar. Sci.*, 14 (3).
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. & Drosinos, E.H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21, 805–815.
- Kris-Etherton, P., Fleming, J., & Harris, W. S. (2010). The Debate about n-6 Polyunsaturated Fatty Acid Recommendations for Cardiovascular Health. *J Am Diet Assoc*, 110, 201–204.
- Le Jaouen, J.C. (1990). Le Lait: sa production. La fabrication du fromage de chèvre fermier (pp. 15-47).

- Lewis, A.M., Melendez, M.C. & Fink, R.C. (2019). Salmonella. In Doyle, M.P., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C. (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and Frontiers (5th Ed., pp. 225-262). Washington, DC: ASM Press.
- Lianou, A. & Koutsoumanis, K.P. (2013). Strain variability of the behavior of foodborne pathogens: A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 167, 310–321.
- Lindqvist, R., Sylvén, S. & Vagsholm, I.(2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by Staphylococcus aureus in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol* 78 (1-2), 155-170.
- Linnan, M.J.; Mascola, M.D.L.; Lou, M.D.L.; Goulet, V.; May, S.M.D.; Salminen, C., et al., (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl J Med*, 29, 823-828.
- Lopez-Kleine, L. & Monnet, V. (2011). Proteolytic Systems. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (pp. 3:45-55). London, UK: Academic Press.
- Lundén, J., Tolvanen, R. & Korkeala, H. (2004) Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Sci*, 87, E6–E12.
- Luquet, F. M. (1985). O Leite - Do úbere à fábrica de laticínios. Mem-Martins: Europa América.
- MacDonald, P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., et al. (2005). Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese. *Clin Infect Dis*, 40, 677–682.
- Magalhães R, Almeida G, Ferreira V, Santos I, Silva J, Mendes MM, et al. (2015). Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. *Euro Surveill*, 20: pii=21104. Acedido em 4 de dezembro 2019 em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21104>.
- Manfreda, G., De Cesare, A., Stella, S., Cozzi, M. & Cantoni, C. (2005). Occurrence and ribotypes of Listeria monocytogenes in Gorgonzola cheeses. *Int J Food Microbiol*, 102(3):287-93.
- Manual Forvisão – SAAIA (2017). Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. Acedido em 9 de Abril de 2019. Disponível em <http://www.forvisao.pt/saiaa---seguranca-alimentar-na-industria-agroalimentar.html>

- Martins, A.D.O., Mendonça, R.C.S. & Silva, D.L. (2006). Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. *Rev. Ciênc. Agrovet.*, 5(1), 53-59.
- Martins, A.P.L. & Martins, M.P.V. (2013). A avaliação da qualidade do queijo: diversidade de produtos e o significado dos critérios de segurança e dos critérios de higiene. *Riscos e Alimentos*, 5, 8-11.
- Martins, A.P.L. & Vasconcelos, M.M. (1993). Alguns aspectos da qualidade do leite e fabrico de queijos regionais. *Revista Via Láceta*, vol. 2, 73-79.
- Martins, A.P.L. & Vasconcelos, M.M. (2004). A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos. XXIV Reunião de Primavera da SPPF. Palmela, Abril de 2003. 15, 1-16.
- Mašková, E. & Paulíčková, I. (2006). PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.* Vol. 24, No. 3: 127–132.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W. J & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 92: 15-33.
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G. & Fox, P.F. (2017). Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview. Chapter 31, 781-808.
- Medici, M., Vinderola, C. G. & Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J*, 14 (7), 611-618.
- Medina, M. & Nuñez, M.M. (2017). Cheeses from ewe and goat milk. In: McSweeney, P.H.L., Fox, P.F., Cotter, P. & David, W. Cheese. Chemistry. Physics and Microbiology, 4ed. pp 1069-1091
- Melo, J., Andrew, P.W. & Faleiro, M.L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* 67, 75–90
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. & Ferrero, M. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J Funct Food*, 4, 531–541.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D., Desmasures, N., et al. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177 (2014) 136–154.

- Montville, T. J. & Matthews, K. R. (2008). Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. *Food Microbiology: An Introduction* (pp. 77-83). Washington, USA: ASM Press.
- Mortimore, S. & Wallace, C. (2013). *HACCP A Practical Approach* (3ª ed., p. 72-108). Londres, Springer.
- Mozaffarian, D. (2011). The Great Fat Debate: Taking the Focus Off of Saturated Fat. *J Am Diet Assoc*, 111, 665–666.
- Mozaffarian, D., Cao, H., King, IB., Lemaitre, R.N., Song, X., Siscovick, D.S., et al (2010). Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: A cohort study. *Ann Intern Med.* (153) 790–799.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. & Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Ver. Food Sci. Nutr.*, (38) p.13-126.
- Nero, L.A., Mattos, M.R., Ortolani, M.B.T., de Aguiar Ferreira Barros, M., Beloti, V. & de Melo Franco, B.D.G. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses Public Health* (55) 299–305.
- Neto, L.G.G., Souza, M.R., Nunes, A.C., Nicoli, J.R. & Santos, W.L.M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 57(2), 245-25.
- Noronha, J. (2003). *Manual segurança alimentar, Queijos Tradicionais*.
- O'Connor, C. (1993). Traditional cheesemaking manual. *ILCA* (International Livestock Centre for Africa) Addis Ababa. Ethiopia.
- O'Sullivan, O. & Cotter, P.D. (2017). *Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses*. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: (4th. Ed.) 301-316.
- Oliveira, K.M.L., Carvalho, J.B., Ramos, L.P.S. & Gelatti, L.C. (2015). Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais comercializados na cidade de Uruaçu-Goiás. *Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia*, 8 (2), 63-72.
- Oliveira, M.E.G., Garcia, E.F., Oliveira, C.E.V., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Madureira, A.R.F., Conceição, M.L., Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, R.C.E. & Souza, E.L. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat

- cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Res. Int* 64, 241-247.
- Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Viçosa, G.N. & Nero, L. (2010). Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Spp.*, and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7 (2), 175-180.
- Ostyn, A., De Buyser, M.L., Guillier, F, Groult J., Felix, B., Salah, S., *et al.* (2010). First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveill*, 15 (13).
- Panthi, R.P., Jordan, K.N., Kelly, A.L., Sheehan, J.J. (2017). Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D. & Everett, D.W (Eds.), *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. (4th ed.) pp 23-50). San Diego, USA: Academic Press.
- Papić, B., Kušar, D., Zdovc, I., Golob, M. & Pate, M. (2020). Retrospective investigation of listeriosis outbreaks in small ruminants using different analytical approaches for whole genome sequencing-based typing of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evo*, (77) 104047.
- Park, Y.W & Seo, K.S. (2019). *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, (5th Ed.) ASM Press Washington DC.
- Park, Y.W. & Haenlein, G.F. (2006). *Handbook of milk non-boivne mammals*. Blackwel Publishing.
- Passos, A.D., Ferreira, G.K.L., Juliani, G.L., de Santana, E.H.W. & Alegro, L.C. (2009). Avaliação microbiológica de queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, 369, 48-54.
- Paula, J.C.J., Carvalho, A.F. & Furtado, M.M. (2009). Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Torres*, 64 (367).
- Pereira, M. L., Pereira, J. L., Serreno, A. M. & Bergdoll, M. S. (2000). Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? *Rev. Higiene. Alimentar.*, 44(68/69), 32-40.
- Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova.*; 27 (2).

- Pfeiffer, I., Burger, J. & Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genet.* 5, 30-36.
- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.O., Pintado, M.E., Gomes, A.P. & Malcata, F.X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int Dairy J*, 18 631–640
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21, 240–246.
- Pintado, M. E., Gomes, A. M. & Malcata, F. X. (2008). Lacticínios funcionais – Uma revisão sucinta. *ANIL Leite I + D + T*, 7, 8-10. Acedido em 3 de maio de 2019 em: <https://docplayer.com.br/74224133-Ano-2-numero-7-janeiro-2008.html>
- Pintado, C.M.B.S., Oliveira, A., Pampulha, M.E. & Ferreira, M.E. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology* 22(1):79–85.
- Pinto, A. (1996). Doenças de origem microbiana e transmitidas pelos alimentos. Acedido a 14 de Maio de 2019. Disponível em http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm.
- QUALI Segurança Alimentar (2018a). Perigos Alimentares. Acedido a 9 de Abril de 2019. Disponível em <https://www.quali.pt/seguranca-alimentar/206-perigos-alimentares>.
- QUALI Segurança Alimentar (2018b). Qualidade Microbiológica dos Alimentos. Acedido a 13 de Maio de 2019. Disponível em <https://www.quali.pt/seguranca-alimentar/209-qualidade-microbiologica-alimentos>.
- Ray, B. & Bhljnia, A. (2014). *Fundamental food microbiology*. (5ª ed., pp. 42, 427), Boca Raton, Taylor & Francis.
- Rayanal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I. & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Res.* 79 (2008) 57–72
- Reed, G. (1983). *Biotechnonology: A comprehensive treatise in 8 volumes. Volume 5: Food and Feed Production with Microorgisms*. Verlag Chemie GmbH.
- Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L338/1, Comissão Europeia, Bruxelas.

- Regulamento (CE) n.º 852/2004 de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L139/1, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, *Jornal Oficial da União Europeia*, L139/55, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Regulamento (CE) n.º 1107/96 de 12 de junho de 1996, relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17.º do Regulamento (CEE) n.º 2081/92 do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia* n.º L 148, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 1151/2012 de 21 de novembro de 2012, que dá execução ao artigo 2.º, n.º 3, do Regulamento (CE) n.º 2580/2001 relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L343/1, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Regulamento (UE) 2019/229 da Comissão de 7 de fevereiro de 2019 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no que diz respeito a certos métodos, ao critério de segurança dos géneros alimentícios relativo à *Listeria monocytogenes* em sementes germinadas, ao critério de higiene dos processos e ao critério de segurança dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L37/106, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, L304/18, Parlamento Europeu e do Conselho, Estrasburgo.
- Reis, P.J.M. & Malcata, F.X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Res* 101, 122– 133.
- Rocha, A.M.P. (2004). Controlo de fungos durante a maturação de queijos minas padrão. Tese apresentada para obtenção de grau de Mestre. Universidade Federal de Santa Maria.

- Rocha, R.D.S. & Cruz, A. G. D. (2018). Bactérias de auxílio na maturação dos queijos (NSLAB) e seus benefícios para a saúde. MilkPoint. Acedido a 12 de Maio de 2019. Disponível em <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria/bacterias-de-auxilio-na-maturacao-dos-queijos-nslab-e-seus-beneficios-para-a-saude-206803/>
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S. & Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int J Food Microbiol*, 144, 263-269.
- Ross, T. & Nichols, D.S. (2014). Influence of Temperature. Elsevier Ltd, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol 1, 602-609.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. & Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol*, 38, 303–311.
- Ryser, E.T., Buchanan, R.L. & Bakker, H.C. (2019). *Listeria Monocytogenes*. *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*, 5th Ed.
- Salvuccia, E., LeBlanc, J.G. & Pérez, G. (2016). Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT – Food Sci Technol* 70, 185-191
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B. & Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Res. Int.*, 63, 170–181.
- Sanders, M. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*, 46, S58–S61
- Sandine, W.E. & Elliker, P.R. (1970). Microbiologically induced flavours and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 18, 557–562.
- Santos, M.I. & Novais, M.R. (1991). Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos – Montagem da técnica. *Revista Portuguesa de Nutrição*, III, 39 – 47.
- Santos, M.I.S., Fradinho, P., Martins, S., Lima, A.I.G., Ferreira, R.M. S.B., Pedroso, L., Ferreira, M.A.S.S. & Sousa, I. (2019). A novel way for whey: cheese whey fermentation produces an effective and environmentally safe alternative to chlorine. *Appl Sci*, 9, 2800.
- Santos, M.I.S., Lima, A.I., Monteiro, S.A.V.S., Ferreira, R.M.S.B., Pedroso L., Sousa, I., Ferreira, M.A.S.S. (2016). Preliminary study on the effect of fermented cheese whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*

- Goldcoast populations inoculated onto fresh organic lettuce. *Foodborne Pathog Dis*, 13, 423-427.
- Settanni, L. & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol*, 27, 691-697.
- Sidira, M., Kandyli, P., Kanellaki, M. & Kourkoutas, Y. (2016). Effect of curing salts and probiotic cultures on the evolution of flavor compounds in dry-fermented sausages during ripening. *Food Chemistry* 201, 334-338. *J. Dairy Sci.*, 101:1943–1956.
- Silva, E., Furtado, R., Bragança, M., Correia, C.B., Pedrosa, L., Santos, M.I.S. (2018). Evaluation of the Adequacy of the Vidas® SET2 Kit in the Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Cheese of Portuguese Origin. *NFSIJ*, 5, 1-4.
- Silva, G.L., Coelho, C.C., Coelho, M.I., Libório, R.C., Amorim, I.S., Silva, G.C.S. (2018). Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 12, 2613-2626.
- Sonnier, J.L., Karns, J.S., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Haley, B.J. Kim, S-W. & Van Kessel, J.A.S. (2018). Prevalence of Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, and pathogenic Escherichia coli in bulk tank milk and milk filters from US dairy operations in the National Animal Health Monitoring System Dairy.
- Statista (2019a). Major cheese producing countries in 2018. Acedido em 13 de Abril de 2019. Disponível em <https://www.statista.com/statistics/195809/cheese-production-in-selected-countries-2009/>
- Statista (2019b). Industry revenue of “operation of dairies and cheese making” in Portugal from 2011 to 2023. Acedido em 14 de Abril de 2019. Disponível em <https://www.statista.com/forecasts/395033/operation-of-dairies-and-cheese-making-revenue-in-portugal>
- Suhartatik, N., Cahyanto, M.N., Rahardjo, S., Miyashita, M. & Rahayu, E.S. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria producing β glucosidase from Indonesian fermented foods. *Int. Food Res. J.* 21, 973-978.
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243.
- Talwalkar, A. & Kailasapathy, K. (2004). The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to L. acidophilus and Bifidobacterium spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5: 1-8.

- Todd, E. C. D., Greig, J. D., Bartleson, C. & Michaels, B. S. (2009) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *J. Food Prot.* 202–19.
- União Europeia [UE] (2019). *Eurostat Statistics Explained Agricultural products*. Acedido a 27 de dezembro de 2019. Disponível em http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/
- United States Department of Agricultura [USDA] (2011) – National nutrient database for standard reference.
- Veiga, S.N.T. (2012). Qualidade Microbiológica e Físico-Química de Queijos Comercializados em Portugal. Tese apresentada para obtenção de grau de mestre – Universidade Técnica de Lisboa.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M. *et al.* (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *Int Dairy J*, 50, 32-44.
- von Wright, A. & Axelsson, L. (2019). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In G.. Vinderola, A.C. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5^a ed., pp. 1-16). Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis.
- Zottola, E.A. & Smith, L.B. (1991). Pathogens in cheese. *J Food Microbiol*, 8, 71-182.

Apêndice I - Resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo analisadas

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas das amostras estudadas

Amostra	Medição	Região	Mic.30°C	E.coli	Estaf.	Salm.	L. monocy.
1	1	F	2,2x10 ⁸	8,3x10 ³	9,3x10 ⁴	Ausente	Ausente
1	2	F	1,7x10 ⁹	5,5x10 ³	3,3x10 ⁴	Ausente	Ausente
1	3	F	2,1x10 ⁹	3,4x10 ³	1,7x10 ⁴	Ausente	Ausente
2	1	R	1,0x10 ⁸	1,5x10 ⁴	4,5x10 ⁵	Ausente	Ausente
2	2	R	2,1x10 ⁹	4,9x10 ⁶	3,0x10 ⁶	Ausente	Ausente
2	3	R	1,2x10 ⁹	1,7x10 ⁶	1,2x10 ⁶	Ausente	Ausente
3	1	F	9,3x10 ⁷	1,5x10 ⁶	2,1x10 ⁴	NE	NE
3	3	F	2,1x10 ⁹	2,4x10 ⁵	6,7x10 ³	NE	NE
4	1	R	3,1x10 ⁸	4,9x10 ⁴	2,7x10 ⁵	Ausente	Ausente
4	2	R	4,9x10 ⁹	1,1x10 ⁴	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
4	3	R	3,0x10 ⁹	2,1x10 ⁵	5,3x10 ⁴	Ausente	Ausente
5	1	R	3,7x10 ⁷	4,1x10 ³	1,1x10 ⁵	Ausente	Ausente
5	2	R	2,5x10 ⁹	3,4x10 ⁵	1,3x10 ⁵	Ausente	Ausente
5	3	R	4,9x10 ⁹	1,3x10 ⁵	3,8x10 ⁴	Ausente	Ausente
6	1	R	3,4x10 ⁸	1,5x10 ⁴	3,0x10 ⁴	Ausente	Ausente
6	2	R	4,9x10 ⁹	3,7x10 ⁴	2,4x10 ⁵	Ausente	Ausente
6	3	R	1,2x10 ⁹	1,1x10 ⁵	8,6x10 ³	Ausente	Ausente
7	1	R	4,9x10 ⁷	3,4x10 ³	3,7x10 ⁴	Ausente	Ausente
7	2	R	9,1x10 ⁸	4,9x10 ⁴	7,6x10 ⁴	Ausente	Ausente
7	3	R	1,7x10 ⁹	3,7x10 ⁴	3,7x10 ⁴	Ausente	Ausente
8	1	R	3,7x10 ⁷	5,3x10 ³	2,4x10 ⁵	NE	NE
8	2	R	3,0x10 ⁹	4,5x10 ⁵	1,5x10 ⁶	NE	NE

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas das amostras estudadas (continuação)

Amostra	Medição	Região	Mic.30°C	E.coli	Estaf.	Salm.	L. monocy.
8	3	R	1,7x10 ⁹	3,9x10 ⁴	1,4x10 ⁵	NE	NE
9	1	R	7,3x10 ⁷	2,9x10 ³	1,2x10 ⁵	Ausente	Ausente
9	2	R	4,9x10 ⁹	4,9x10 ⁴	1,5x10 ⁵	Ausente	Ausente
9	3	R	1,2x10 ⁹	3,0x10 ⁴	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
10	1	R	5,7x10 ⁷	9,1x10 ³	7,8x10 ³	Ausente	Ausente
10	2	R	3,9x10 ⁹	8,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	Ausente	Ausente
10	3	R	3,0x10 ⁹	1,5x10 ⁴	5,5x10 ³	Ausente	Ausente
11	1	R	4,0x10 ⁷	4,1x10 ³	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
11	2	R	2,5x10 ⁹	1,1x10 ⁴	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
11	3	R	1,2x10 ⁹	1,7x10 ⁴	1,2x10 ⁴	Ausente	Ausente
12	1	F	6,8x10 ⁸	7,1x10 ²	2,5x10 ⁴	Ausente	Ausente
12	2	F	1,5x10 ⁹	1,2x10 ²	3,0x10 ⁴	Ausente	Ausente
12	3	F	2,1x10 ⁹	8,6x10 ¹	6,0x10 ³	Ausente	Ausente
13	1	R	2,4x10 ⁸	4,3x10 ³	1,5x10 ⁴	Ausente	Ausente
13	2	R	1,7x10 ⁹	3,4x10 ³	3,3x10 ⁴	Ausente	Ausente
13	3	R	1,7x10 ⁹	1,0x10 ³	2,1x10 ⁴	Ausente	Ausente
14	1	F	1,7x10 ⁸	3,1x10 ³	3,3x10 ⁴	NE	NE
14	2	F	9,1x10 ⁸	2,7x10 ³	3,9x10 ⁴	NE	NE
14	3	F	1,2x10 ⁹	1,6x10 ³	4,9x10 ⁴	NE	NE
15	1	F	2,8x10 ⁸	3,7x10 ³	3,0x10 ⁴	Ausente	Ausente

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas das amostras estudadas (continuação)

Amostra	Medição	Região	Mic.30°C	E.coli	Estaf.	Salm.	L. monocy.
15	2	F	2,5X10 ⁹	1,0X10 ³	4,3X10 ⁴	Ausente	Ausente
15	3	F	9,1x10 ⁸	2,2x10 ²	2,1x10 ⁴	Ausente	Ausente
16	1	R	1,7x10 ⁸	1,8x10 ⁵	2,1x10 ⁶	Ausente	Ausente
16	2	R	3,7x10 ⁹	9,1x10 ⁵	4,9x10 ⁶	Ausente	Ausente
16	3	R	7,8x10 ⁸	9,1x10 ⁵	1,7x10 ⁶	Ausente	Ausente
17	1	F	4,9x10 ⁷	6,0x10 ³	1,1x10 ⁵	Ausente	Ausente
17	2	F	3,3x10 ⁹	1,6x10 ⁵	4,9x10 ⁶	Ausente	Ausente
17	3	F	1,5x10 ⁹	3,7x10 ⁴	2,4x10 ⁴	Ausente	Ausente
18	1	R	2,6x10 ⁸	4,6x10 ⁴	3,7x10 ⁶	Ausente	Ausente
18	2	R	2,5x10 ⁹	1,1x10 ⁴	1,4x10 ⁵	Ausente	Ausente
18	3	R	1,5x10 ⁹	1,2x10 ⁵	3,0x10 ⁶	Ausente	Ausente
19	1	F	5,7x10 ⁷	6,0x10 ³	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
19	2	F	2,1x10 ⁹	4,7x10 ³	1,9x10 ⁵	Ausente	Ausente
19	3	F	1,2x10 ⁹	3,7x10 ³	9,3x10 ⁴	Ausente	Ausente
20	1	R	5,7x10 ⁷	1,9x10 ⁵	3,0x10 ⁴	NE	NE
20	2	R	1,5x10 ⁹	2,1x10 ⁵	1,1x10 ⁴	NE	NE
20	3	R	3,0x10 ⁹	7,9x10 ⁴	9,5x10 ²	NE	NE

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas das amostras estudadas (continuação)

Amostra	Medição	Região	Mic.30°C	E.coli	Estaf.	Salm.	L. monocy.
21	1	R	6,8x10 ⁶	4,8x10 ⁴	1,4x10 ⁴	Ausente	Ausente

21	2	R	2,5x10 ⁹	3,0x10 ⁴	3,7x10 ⁴	Ausente	Ausente
21	3	R	3,0x10 ⁹	3,4x10 ⁵	5,0x10 ³	Ausente	Ausente
22	1	F	9,3x10 ⁷	1,7x10 ³	3,7x10 ⁶	Ausente	Ausente
22	2	F	1,2x10 ⁹	3,1x10 ³	4,9x10 ⁶	Ausente	Ausente
22	3	F	1,5x10 ⁹	5,5x10 ³	1,7x10 ⁶	Ausente	Ausente
23	1	F	1,8x10 ⁸	6,8x10 ³	2,1x10 ⁶	NE	NE
23	2	F	2,1x10 ⁹	3,9x10 ³	4,9x10 ⁶	NE	NE
23	3	F	2,1x10 ⁹	1,2x10 ³	1,7x10 ⁶	NE	NE
24	1	R	4,9x10 ⁷	4,7x10 ³	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
24	2	R	9,5x10 ⁹	2,5x10 ⁴	3,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
24	3	R	1,1x10 ⁹	2,1x10 ⁴	4,5x10 ³	Ausente	Ausente
25	1	R	1,2x10 ⁷	2,1x10 ⁴	6,4x10 ⁴	Ausente	Ausente
25	2	R	2,5x10 ⁹	1,7x10 ⁵	4,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
25	3	R	2,1x10 ⁹	1,7x10 ⁵	1,2x10 ⁴	Ausente	Ausente
26	1	F	2,2x10 ⁸	1,7x10 ⁴	2,5x10 ⁴	Ausente	Ausente
26	2	F	7,8x10 ⁸	6,7x10 ³	3,9x10 ⁴	Ausente	Ausente
26	3	F	1,5x10 ⁹	9,3x10 ⁴	7,8x10 ³	Ausente	Ausente

Tabela 11 – Resultados das análises microbiológicas das amostras estudadas (continuação)

Amostra	Medição	Região	Mic.30°C	E.coli	Estaf.	Salm.	L. monocy.
27	1	R	1,1x10 ⁷	6,0x10 ³	1,7x10 ⁴	Ausente	Ausente
27	2	R	1,7x10 ⁹	9,3x10 ⁴	3,0x10 ⁴	Ausente	Ausente
27	3	R	1,1x10 ⁹	7,1x10 ⁴	6,0x10 ³	Ausente	Ausente
28	1	R	4,9x10 ⁷	3,6x10 ⁴	3,0x10 ⁴	Ausente	Ausente

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

28	2	R	$2,1 \times 10^9$	$1,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	Ausente	Ausente
28	3	R	$1,9 \times 10^9$	$3,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	Ausente	Ausente
29	1	F	$1,1 \times 10^9$	$6,4 \times 10^4$	$9,5 \times 10^4$	NE	NE
29	2	F	$1,1 \times 10^9$	$3,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	NE	NE
29	3	F	$2,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	NE	NE
30	1	R	$1,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	Ausente	Ausente
30	2	R	$1,1 \times 10^9$	$9,3 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	Ausente	Ausente
30	3	R	$1,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	Ausente	Ausente
31	1	R	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^3$	$5,3 \times 10^4$	Ausente	Ausente
31	2	R	$3,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	Ausente	Ausente
31	3	R	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$	Ausente	Ausente

Apêndice II – Resultados das medições de pH ao longo dos 20 dias de maturação das amostras de queijo analisadas

Lotes	Dias de maturação																			
*****	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
306 011 117	6,33			5,56	5,29	5,34	5,21				5,01	5,03	5,08	4,81				4,93	4,99	5,03
306 012 217	6,41			5,28	5,05	5,19	5,09				4,94	4,94	5	4,87				5,05	5,11	5,41
307 011 117	6,4			5,42	5,17	5,22	5,14				5,07	4,99	5,01	4,86				4,88	4,98	4,98
310 013 217	6,73	6,46	6,03	5,3				5,13	5,12	4,99	4,88				5	5,35	5,13	4,96	5	5,1
310 021 217	6,42	5,34	5,26	5,16				5,04	4,98	4,96	4,82				5,03	4,99	5,17	5,08	5,1	5,13
310 022 117	6,31	5,37	5,32	5,17				5,05	5,01	5,05	4,8				4,88	4,96	5,3	5,15	5,14	5,2
310 014 117	6,66	6,43	5,9	5,27				5,11	5,01	5,14	4,87				4,84	5,06	5,09	5,11	5,11	5,15
310 015 217	6,72	6,23	5,81	5,44				5,18	5,04	5,06	4,94				5,12	5,04	5,28	5,08	5,09	5,12
312 021 117	6,76	6,06				5,2	5,11	5,16	5,1				5,04	5,12	5,63	5,15			5,51	5,42
312 022 217	6,69	5,9				5,16	5,08	5,12	4,85				4,96	4,98	5,02	5,12			5,45	5,41
312 023 117	6,56	5,91				5,15	5,04	5,14	4,88				5,01	5,1	5,12	5,1			5,48	5,28
312 024 217	6,58	5,94				5,16	5,05	5,06	4,85				5,07	5,18	5,21	5,24			5,41	5,32

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

312 025 117	6,55	6,06				5,16			5,09	5,09	4,84			4,99	5,06	5,08	5,15		5,45	5,31	
312 026 217	6,56	5,89				5,17			5,06	5,07	4,78			4,95	5	5,07	5,1		5,25	5,25	
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
314 011 117	6,6			5,92	5,5	5,39			5,14			5,08	5,02	4,96	4,95				5,04	5	5,13
314 012 217	6,56			5,7	5,37	5,36			5,11			5,01	4,98	4,95	5,04				5,15	5,19	5,39
317 021 217	6,64	5,89	5,51	5,17					5	5	4,92	4,91				5,01	5,01	4,97	5,06	5,14	5,2
317 022 117	6,65	5,86	5,49	5,15					4,98	4,91	4,88	4,94				5,24	4,97	5,05	5,23	5,25	5,27
317 023 217	6,56	5,75	5,45	5,17					5,02	4,93	4,91	4,99				5,12	4,95	5,2	5,22	5,22	5,25
318 011 217	6,71	6,65	6,29						5,22	5,18	5,12	5,04			4,99	4,98	5,15	5,04			5,14
318 012 117	6,72	5,68	5,83						4,96	4,93	4,91	4,88			4,92	4,9	5,41	5,03			4,99
319 021 217	6,64	6,38				5,21			5,15	5,1	5,07			5,11	4,98	5,31	5,07			5,16	5,32
319 022 117	6,63	6,07				5,24			5,15	5,1	5,03			5,06	5,08	5,07	5,1			5,19	5,39
319 013 217	6,66	6,53				5,12			5,07	5,05	5,03			5,2	5	4,97	5,04			5,22	5,18
319 014 117	6,64	6,59				5,45			5,39	5,32	5,17			5,15	5,07	5,04	5,12			5,27	5,35
321 011 217	6,7		6	5,53	5,3	5,23					5,13	4,96	5,03	5,06				5,29	5,38	5,26	5,29

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

321 012 117	6,55		5,59	5,35	5,21	5,14					5,05	4,95	4,95	5,05				5,08	5,3	5,61	5,6
324 021 217	6,62	6,22	5,52	5,33				5,14	5	5,06	5,05				5,08	5,06	4,98	5,11	5,15	5,21	
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
324 022 117	6,59	6,04	5,53	5,3					5,15	4,99	5,09	5,05				5,07	5,05	5,07	5,11	5,2	5,24
324 023 217	6,55	6,2	5,59	5,36					5,17	5,02	5,14	5,11				5,17	5,12	5,24	5,36	5,35	5,36
325 011 117	6,62	6,57	6,12						5,45	5,31	5,32	5,31			5,18	5,26	5,15	5,34			5,73
325 012 217	6,64	6,52	6,07						5,33	5,15	5,25	5,23			5,28	5,2	5,08	5,38			5,85
325 013 117	6,64	6,5	5,81						5,18	5	5,07	5,07			4,97	5,05	5,01	5,12			5,86
325 024 217	6,5	5,96	5,53						5,1	4,92	4,98	4,98			4,99	5,07	5,05	5,24			5,77
326 023 217	6,46	5,89				5,16			4,97	5,02	5,04			5,09	5,21	5,1	5,35			5,5	5,65
326 022 117	6,38	5,72				5,07			4,93	5	5			4,98	5,07	4,96	5,14			5,52	5,72
326 021 217	6,33	5,8				5,15			4,97	5,1	5,03			5,03	5,17	5,17	5,23			5,39	5,8
327 012 217	6,66				5,47	5,34			5,36	5,29			5,08	5,11	5,07	5,21			5,28	5,28	5,28
327 011 117	6,66				5,44	5,25			5,27	5,21			5,02	5,04	5	5,11			5,16	5,2	5,31
328 011 117	6,5			5,62	5,31	5,28			5,21			5,08	5,09	5,04	5,07			5,09	5,05	5,24	5,28
328 012 217	6,65			5,42	5,17	5,16			5,15			5	5,01	4,95	5,07			5,22	5,19	5,39	5,39

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

331 011 117	6,71	6,53	6,52	6,1					5,11	5,17	5,06	5,03				5,11	5,12	5,1	5,05		5,51
331 012 117	6,73	6,47	5,84	5,41					5,19	5,06	4,95	4,95				5,1	5,01	5,01	4,96		5,38
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
331 013 217	6,69	6,48	5,86	5,53					5,13	5,15	5,06	5,01				5,16	5,07	5,06	5,09		5,35
333 011 117	6,67	6,46				5,26		5,21	5,13	5,15				5,13	5,06	5,04	5,06			5,37	5,68
333 012 117	6,73	6,55				5,34		5,29	5,16	5,13				5,14	5,03	5,16	5,12			5,84	5,62
335 011 217	6,66			5,5	5,35	5,26		5,19				5,08	5	4,94	4,88			5,47	5,3	5,3	5,38
335 012 217	6,78			5,52	5,34	5,2		5,19				5,11	5,1	5	5,03			5,05	5,21	5,29	5,28
338 011 217	6,7	6,54	6,28	6,03					5,21	5,08	4,96	4,91				5,14	5,15	5,21	5,22	5,55	5,57
338 012 117	6,76	6,52	5,2	5,55					5,16	5,06	4,98	4,88				4,94	5,09	5,03	5,09	5,32	5,36
338 013 217	6,6	6,45	5,98	5,65					5,15	5,07	5,01	4,9				5,03	5,12	5,15	5,26	5,3	5,33
341 011 217	6,79				5,2	5,23		4,94	4,84				4,96	5,03	5,12	5,16				5,13	5,2
342 011 217	6,7			5,66	5,35	5,19		4,92				4,97	5,1	4,93	5,06				5,15	5,23	5,5
342 012 117	6,78			5,46	5,23	5,13		5,03				4,95	5,05	4,98	5,09				5,03	5,12	5,26
346 011 117	6,68	6,39	5,74					5,07	5,13	5,03	5,1					5,17	5,13				5,28

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

346 012 217	6,68	6,48	5,98						5,08	5,24	5,05	5,25				5,1	5,12			5,35	
346 013 117	6,66	6,43	5,9						5,15	5,26	5,18	5,32				5,04	5,09			5,49	
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
348 011 217	6,57				5,33	5,29			5,13	5,23					4,94	5,02			5,13	5,43	
348 012 117	6,57				5,22	5,31			5,16	5,24					4,87	4,95			5,35	5,23	
348 013 217	6,56				5,22	5,26			5,17	5,22					4,91	5,17			5,43	5,24	
353 011 217	6,7	6,39	5,97						5,17	5,09					5,28	5,25	5,12			5,39	
353 012 117	6,7	6,3	5,92						5,09	5,08					5,28	5,1	5,39			5,44	
353 013 217	6,66	6,35	5,92						5,25	5,1					5,28	5,1	5,13			5,35	
353 014 117	6,67	6,18	5,81						5,06	5,06					5,28	5,15	5,49			5,45	
355 011 117	6,85								5,21	5,17				4,96	4,91	4,96		5,18	5,28	5,14	5,18
355 012 217	6,86								5,22	5,19				5,04	4,87	4,91		5,23	5,41	5,58	5,32
356 011 217	6,8					5,25			5,21				5	4,88	4,92		5,14	5,16	5	5,29	5,29
356 012 117	6,72					5,22			5,18				5,06	5,01	5,04		5,45	5,19	5,27	5,31	5,4
356 013 217	6,66					5,29			5,23				5,16	5,13	5,15		5,73	5,65	5,5	5,67	5,4
360 011 217	6,8	6,52	5,9							4,99	4,85	4,88			4,98	4,96	4,96	5,04		5,56	5,36

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

360 013 217	6,74	6,37	5,9						5,13	5,04	5,03				5,28	5,3	5,27	5,24		5,3	5,37
360 014 117	6,69	6,32	5,83						5,21	5,01	4,94				5,04	5,16	4,9	4,99		5,13	5,49
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
361 011 217	6,66	6,37							5,15	5,08	5,06			5	4,98	4,97	4,94		5,26	5,05	5,14
361 012 117	6,59	6,06							5,09	4,99	4,98			5,07	4,96	4,99	4,98		5,37	5,22	5,31
361 013 217	6,69	6,48							5,13	5,02	4,99			5,09	5,08	5	5,07		5,33	5,24	5,26
363 012 117	6,8					5,28			5,15	5,15		5,13	5,03	4,93	4,96			5,37	5,4	5,31	5,2
363 013 217	6,88					5,25			5,24	5,23		5,13	4,98	5,06	4,96			5,06	5,05	5,16	5,17
002 013 218	6,75	6,54	5,71	5,25					5,08	5,07	5	4,86			4,99	4,79	5	5,01			5,04
002 022 218	6,59	6,19	5,35	5,23					4,93	4,87	4,76	4,69			4,48	4,92	4,92	5,1			5,05
003 011 118	6,61	5,88	5,54			5,13			5,03	4,9	4,89			4,95	4,87	5,01	5,05		5,06	5,01	
003 012 218	6,62	5,85	5,38			5,08			5,12	4,92	4,92			4,88	4,78	4,89	5		5	5,05	
3 013 218	6,62	5,9	5,6			5,13			5,1	4,97	4,95			5,02	4,77	4,96	5,12		4,92	5,03	
004 021 218	6,64	6,17			5,33	5,3			5,05	5,01			4,98	4,91	5,05	5,13		5,25	5,41	5,51	
004 022 118	6,6	6,01			5,3	5,1			5,04	4,95			4,94	4,95	4,96	5,12		5,17	5,16	5,44	
004 023 218	6,63	6,22			5,35	5,25			5,14	5,12			5,02	5,06	5,05	5,18		5,17	5,1	5,5	

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

005 011 118	6,66			5,43	5,31	5,09		5,06			5,13	5,12	5,13	5,23				5,09	5,08	5,1	
005 012 118	6,64			5,36	5,19	5,04		5,01			5,01	4,89	4,9	4,99				4,97	5,06	5,29	
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
5 013 218	6,63			5,36	5,22	5,07		5,05				4,98	4,87	4,88	4,85				4,77	4,92	5,11
008 022 118	6,73	6,18	5,42	5,18					5	5	4,9	4,93				4,9	4,97			5,05	5,33
008 014 118	6,72	6,02	5,46	5,33					5,07	5,02	5,05	4,94				4,74	4,93			5,08	5,29
009 011 218	6,71	6,09	5,68					5,16	5,04	5,05	5,02				4,77	4,99	5	5,08			5,2
009 012 118	6,63	5,99	6,01					5,13	5,08	5,11	5,08				4,78	4,88	4,95	5,03			5,05
009 023 218	6,74	6,4	6,23					5,21	5,1	5,13	5,13				4,84	4,95	4,98	5,09			5,21
009 024 118	6,73	6,47	5,74					5,27	5,11	5,2	5,18				4,98	5,12	5,14	5,17			5,57
010 021 218	6,56	6,34				5,28		5,11	5,16	5,16				4,88	4,94	5,05	5,12			5,48	5,31
010 022 118	6,56	6,36				5,25		5,1	5,11	5,08				5,02	4,96	4,99	5,04			5,96	5,4
011 011 218	6,68				5,32	5,16		5,13	5,17				4,87	4,92	4,98	5,01			5,28	5,26	5,27
011 012 118	6,64				5,39	5,16		5,15	5,11				4,88	4,93	4,99	5,05			5,16	5,26	5,26
012 013 218	6,75			5,72	5,35	5,33		5,24				5,03	5,08		5				5,03	5,16	5,31
012 014 118	6,64			5,73	5,43	5,37		5,3				5,07	5,04		5,03				4,98	5,24	5,13

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

015 011 218	6,75	6,64	6,48	5,97					5,02	5,06	5,06	5,08				5,07	5,07	5,04	5,15	5,18	5,21
015 012 118	6,75	6,57	6,25	5,67					5,02	5,06	5,07	5,08				5,05	5,1	5,15	5,04	5,19	5,32
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
015 013 218	6,71	6,58	6,31	5,81					5,09	5,07	5,07	5,07				5	4,99	4,96	5,09	5,15	5,32
015 014 118	6,7	6,66	6,53	5,76					5,03	5,1	5,08	5,08				5,04	5,06	5,07	5,13	5,2	5,22
016 021 218	6,65	6,54	6,43						6,01	5,66	5,2	5,08			5,06	5,08	5,09	5,1		5,35	5,48
016 022 118	6,64	6,38	5,83						5,02	5,02	5,02	5			5,17	5,17	5,17	5,26		5,27	5,3
017 021 218	6,58	6,08				5			4,99	5	5,01			5,02	5,04	5,09	5,19		5,44	5,28	5,45
017 022 118	6,59	6,04				4,96			4,98	5,02	5,03			5,12	5,11	5,11	5,12		5,2	5,4	5,56
018 011 218	6,75				6,25	6,1			5,25	5,07			4,99	4,9	4,96	4,99		5,1	5,22	5,25	5,27
018 012 118	6,75				6,22	6,09			5,3	5,16			5,01	4,88	4,91	4,97		4,99	4,95	5,1	5,15
018 013 218	6,76				6,19	6,08			5,2	5,07			5,03	4,91	5,03	5,03		5,27	5,31	5,31	5,3
022 011 218	6,62	6,58	6,5	6,44					5,39	5,25	5,23	5,29				5,18	5,18	5,24	5,32		5,4
022 012 118	6,59	6,56	6	5,76					5,13	5,11	5,1	5,16				5,1	5,03	4,96	5,09		5,23
022 013 218	6,59	6,57	5,84	5,58					5,08	5,09	5,1	5,13				5,01	4,97	5,03	5,18		5,32
023 021 218	6,66	6,2	6,08						5,14	5,06	5,01	5,1			5,09	5,18	5,24	5,36			5,41

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

023 022 118	6,61	6,01	5,83					5,3	5,2	5,17	5,2				5,1	5,16	5,22	5,32			5,33
023 023 218	6,59	6,11	5,86					5,23	5,17	5,13	5,09				5,11	5,19	5,18	5,36			5,63
Lotes	Dias de Maturação																				
	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14	15	16	27	18	19	20
025 011 218	6,75				6,02	5,55		5,22	5,22				5,16	5,13	4,9	5,04			5,16	5,26	
025 012 118	6,72				6,1	5,83		5,36	5,32				5,16	5,18	5,01	5,07			5,08	5,2	
025 013 218	6,74				6,13	5,89		5,32	5,29				5,27	5,25	5,09	5,16			5,21	5,31	
029 011 2018	6,67	6,24	6,09	5,58					5,27	5,24	5,08	5,04	4,87					4,95	4,96	5,15	5,36
030 022 118	6,69	6,19	5,72					5,37	5,31	5,06	5,01	4,96					5,18	5,25	5,38	5,39	5,3
031 013 2018	6,73	6,73				5,54		5,45	5,27	5,05	4,99						5,16	5,18	5,14	5,19	5,21
036 011 218	6,77	6,87	6,56	6,41					5,36	5,3	5,24	5,15					5,03	5,04	5,15	5,21	5,33
036 013 218	6,61	6,59	5,96	5,67					5,39	5,27	5,22	5,16					5,02	5,03	5,12	5,19	5,27

Ana Beatriz Santo Machado: Avaliação do pH e a sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no Queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação

Quantificação de estafilococos coagulase positiva em queijo de leite cru de origem nacional

Silvia Marcos¹, Maria João Barreira¹, Ana Beatriz Machado², Rosália Furtado¹, Maria Isabel Santos³

¹ Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

² Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

³ Plants for Health and Nutrition, LEAF (Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food), ISA (Instituto Superior de Agronomia), Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal



INTRODUÇÃO

Queijos tradicionais fabricados a partir de leite cru de ovelha apresentam frequentemente contaminação microbiológica elevada inerente à origem e processo de produção destes géneros alimentícios. De entre a flora contaminante destaca-se a presença de estafilococos coagulase positiva, uma vez que muitas destas estirpes são potencialmente produtoras de enterotoxinas estafilocócicas (EES).

Os estafilococos coagulase positiva, maioritariamente da espécie *Staphylococcus aureus*, são microrganismos habitualmente presentes na pele e mucosas de animais de sangue quente podendo ser disseminados facilmente a partir de hospedeiros humanos e animais. Algumas destas bactérias possuem genes codificados para a enterotoxina, e capacidade de as produzirem no decurso da multiplicação nos alimentos, podendo ser um agente potencial de intoxicação alimentar. As EEs são proteínas de baixo peso molecular, extracelulares, hidrossolúveis, termostáveis e resistentes à ação das enzimas proteolíticas presentes no trato digestivo. A intoxicação alimentar estafilocócica resulta da ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas e os sintomas, que se manifestam poucas horas após a ingestão, incluem náuseas, vômitos e por vezes diarreia, sendo uma doença autolimitada.

O leite e os produtos lácteos crus provenientes de gado (bovino, ovino e caprino) infetado, têm sido implicados em intoxicações alimentares por enterotoxinas estafilocócicas



OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi efetuar a quantificação de estafilococos coagulase positiva/pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de queijos fabricados com leite cru de ovelha, de origem nacional, colhidas durante o processo de fabrico.



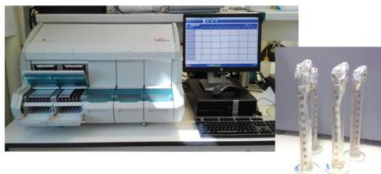
MATERIAL E MÉTODOS

Contagem estafilococos coagulase positiva

- Método TEMPO (TEMPO STA)

Pesquisa de enterotoxina estafilocócica

- Método EURL/ISO 19020:2017, método horizontal para a deteção imunoenzimática de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, com concentração por diálise, método acreditado pelo Instituto Português de Acreditação.



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

- Apesar da ocorrência de estafilococos coagulase positiva ser comum em leite e produtos lácteos crus, para causar doença é necessário que as estirpes sejam enterotoxinogénicas e que as enterotoxinas estejam presentes no(s) alimento(s) em concentrações iguais ou superiores ao limite de deteção do método.
- Não foi detetada a presença de enterotoxinas estafilocócicas, em nenhuma das amostras com níveis de estafilococos coagulase positiva $>10^5$ ufc/g.
- A prevenção desta doença assenta no cumprimento das Boas Práticas de Higiene e no controlo dos pontos críticos no decurso do fluxograma de produção, impedindo e controlando o desenvolvimento de estirpes enterotoxinogénicas eventualmente presentes na matéria-prima e/ou transmitidas aos géneros



RESULTADOS

Foram analisadas 34 amostras e detetou-se estafilococos coagulase positiva em todas, em níveis compreendidos entre 10^4 e 10^6 ufc/g (Figura 1). Em 17 das 34 amostras os teores de estafilococos coagulase positiva foram $>10^5$ ufc/g, tendo sido efetuada a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, conforme estipulado no Regulamento (CE) N.º 2073/2005.

Em todas as amostras analisadas não foi detetada a presença de enterotoxinas estafilocócicas em 25 gramas de produto.

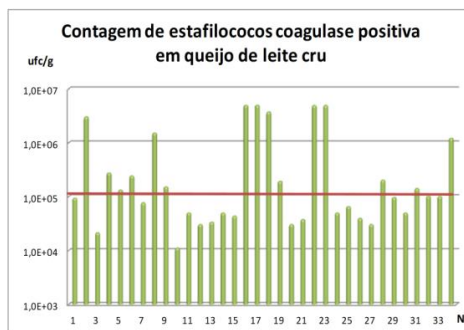


Figura 1 - Contagem de estafilococos coagulase positiva em queijos de leite cru

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas (tipos A a E) pelo método EURL/ISO 19020:2017 com concentração por diálise e deteção imunoenzimática automatizada, foi efetuada em 17 das amostras e em todas não foi detetada a presença de enterotoxinas estafilocócicas em 25 gramas de produto (Figura 2).

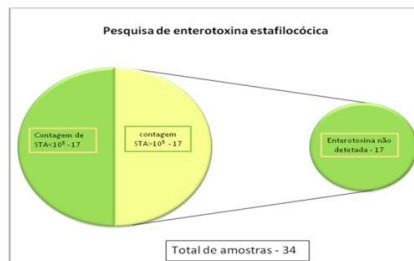


Figura 2 - Pesquisa de enterotoxina estafilocócica (nas 17 amostras com Estafilococos coagulase positiva $>10^5$ ufc/g não foram detetadas EEs).