

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO SOBRE A OPERAÇÃO DE FRACIONAMENTO DE QUEIJOS
EM ESTABELECIMENTOS DE VENDA A RETALHO**

Joana Isa Oliveira Lopes

Orientador(es)

Professor Doutor Paulo Martins da Costa

Co-Orientador(es)

Eng^a. Maria Deolinda Pereira

Dr. Ângelo Joel Ferreira Mendes

Porto 2013

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO SOBRE A OPERAÇÃO DE FRACIONAMENTO DE QUEIJOS
EM ESTABELECIMENTOS DE VENDA A RETALHO**

Joana Isa Oliveira Lopes

Orientador(es)

Professor Doutor Paulo Martins da Costa

Co-Orientador(es)

Eng^a. Maria Deolinda Pereira

Dr. Ângelo Joel Ferreira Mendes

Porto 2013

Resumo

Em Portugal o consumo de queijo tem uma grande relevância nos hábitos alimentares, havendo no mercado uma grande diversidade de variedades nacionais e importadas. No entanto, a atual conjuntura económica tem vindo a operar alterações na procura, havendo a necessidade de ajustar a oferta às necessidades e possibilidades dos consumidores. Um desses ajustamentos pressupõe a exposição para venda de frações mais pequenas obrigando, assim, ao fracionamento dos queijos inteiros. Este processamento pode ser realizado nos estabelecimentos industriais ou nos estabelecimentos de comércio a retalho. Nestes últimos, a legislação em vigor – Decreto-Lei n.º 560/99 de 18 de dezembro – obriga a que os géneros alimentícios pré-embalados para venda imediata sejam retirados no final do dia, não podendo ser novamente expostos à venda. O presente trabalho visou estudar o impacto do fracionamento de queijos em estabelecimentos de venda a retalho (distribuição moderna) nas propriedades microbiológicas (segurança, higiene e validade) e sensoriais em queijos fracionados, por um período máximo de 14 dias após o processamento e o acondicionamento. Para tal, foram selecionados oito tipos de queijo (correspondentes às referências com maior consumo) e oito lojas de uma grande cadeia de distribuição alimentar, onde se analisaram as condições higiénicas (superfícies de contato e ar) e técnicas (instalações, utensílios e cobertura térmica) dos locais de processamento e venda de queijos. As superfícies de contato incluíram as mãos dos manipuladores, as facas usadas no corte dos queijos e a película de acondicionamento das frações. Para cada variedade de queijo em estudo foram aleatoriamente reunidos cinco queijos, tendo sido recolhidas amostras para controlo microbiológico a partir do queijo inteiro (“zero” dias) e das frações aos “zero”, três, sete e 14 dias após fracionamento. Nas análises microbiológicas dos queijos procedeu-se à pesquisa e/ou quantificação de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, microrganismos aeróbios mesófilos totais, flora láctea, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras. Na análise sensorial avaliaram-se as diferentes características e alterações no tempo em estudo. Nas mãos procedeu-se à contagem de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. e microrganismos aeróbios mesófilos totais. Nas facas efetuou-se a quantificação de microrganismos aeróbios mesófilos totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. No que diz respeito ao ar e à película de acondicionamento realizou-se a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais. A temperatura de refrigeração foi registada em contínuo por um dispositivo de registo automático *data logger*. Nas 40 amostras de queijos testadas, 40 cumpriam os requisitos de segurança sanitária dos produtos e 39 cumpriam os requisitos de higiene dos processos legalmente estipulados (Regulamento (CE) n.º 1441/2007), tendo sido 38 amostras apreciadas

com “Satisfatório” e uma amostra (queijo fabricado com leite cru de ovelha) com “Aceitável”. Uma amostra (queijo fabricado com leite pasteurizado de cabra) foi classificada como “Não Satisfatório” em virtude de ter ultrapassado o limite máximo de contaminação por *Escherichia coli* (1 000 UFC/g). Estes resultados põem em evidência os riscos associados aos queijos produzidos com leite de pequenos ruminantes, bem como aos queijos fabricados com leite cru. Considerando a informação gerada neste estudo, considerando ser necessário fixar um tempo de vida útil que consagre a existência de uma margem de segurança entre a aquisição e o início e final do consumo, considerando que esta margem não deverá ser exagerada em virtude das pequenas frações adquiridas potenciarem um consumo num intervalo de tempo muito curto, será recomendável que: (i) as frações sejam marcadas com uma validade de aquisição de três dias após o fracionamento, sendo este limite condicionado essencialmente por aspetos de natureza sensorial e, em menor grau, pelos resultados microbiológicos.

Palavras-chave: queijo, fracionamento, avaliação microbiológica, avaliação sensorial.

Abstract

In Portugal the consumption of cheese has a great relevance in eating habits and the market have a wide range of national and imported varieties. However, the installed economic crisis has been operating changes in demand, creating a need to adjust the supply curve to potential consumers. One of these adjustments requires selling smaller portions and forcing the fractionation of whole cheeses. This process can be done in industrial establishments or in retail. In the last ones, the legislation - Decree-Law n. ° 560/99 of december 18 - requires that prepackaged foodstuffs are removed at the end of the day, and cannot be again exposed for sale. The present work aimed to study the impact of cheese fractionation in retail (modern distribution), concerning microbiological properties (safety, hygiene and validity) and sensory characteristics of fractionated cheeses, for a maximum period of 14 days after processing and packaging. This was achieved by selecting eight kinds of cheese (corresponding to references with higher consumption) and eight establishments of a large food distribution chain, where hygienic conditions (contact surfaces and air) and techniques (facilities, utensils and refrigeration conditions) were assessed. The contact surfaces included handlers, knives used to fractionate cheese and the packaging film. Each kind of cheese in study was randomly subdivided in five units, and samples were taken for microbiological control from the whole cheese (day “zero”) and fractions to "zero", three, seven and 14 days. Microbiological analysis included the search and/or enumeration of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mesophilic aerobic microorganisms, lactic flora, *Enterobacteriaceae*, yeasts and molds. The sensory analysis evaluated the different characteristics and changes in the time of study. The hands were submitted to enumeration of *Staphylococcus aureus*, total mesophilic aerobic microorganisms, *E. coli* and *Enterococcus* spp. The knives were assessed for quantification of mesophilic aerobic microorganisms, *E. coli* and *Enterococcus* spp. In relation to air and packaging film, only total mesophilic aerobic microorganisms were quantified. The cooling temperature was recorded by an automatic recording device - data logger. In the 40 samples of cheese tested, 40 accomplished the safety requirements and 39 were satisfactory concerning legal hygiene requirements (Regulation (EC) n.º 1441/2007), 38 samples were classified as "satisfactory" and a sample (cheese made from raw sheep's milk) as "Acceptable". A sample (cheese made from pasteurized goat milk) was rated "not satisfactory" because it has exceeded the maximum contamination by *Escherichia coli* (1000 CFU/g). These data highlight the risks associated with cheese made from small ruminants' milk and from raw milk. Considering the information generated in this study, considering the need to fix a lifetime embodying the

existence of a safety margin between the acquisition and the beginning and end of the consumption, considering that this margin should not be overstated because the small fractions potentiate the consumption in a very short time interval, it is recommended: (i) to mark the portions with a validity of three days after splitting, considering essential aspects of sensory nature and, to a lesser extent, of microbiological results.

Key words: cheese, fractionation, microbiological assessment, sensorial assessment.

Agradecimentos

Agradeço a todos os meus amigos pela compreensão durante os meses de ausência, díspares da minha vontade. Agradeço por serem tão especiais na minha vida, apesar de apenas referir individualmente os intervenientes na tese.

Agradeço aos meus pais, por existirem, por serem o meu suporte a muitos níveis e que apesar de muitas dificuldades me permitiram atingir o meu objetivo.

Agradeço ao Professor, por me ter aceitado, desprovida de tempo e garantias, como estagiária na sua área de ensino. Por todo o conhecimento e experiência que adquiri e mais importante, pela mensagem positiva de honra no trabalho e na minha formação. Agradeço pela colaboração como meu mentor em todas as etapas do meu estágio e do trabalho realizado.

Agradeço à Eng.^a Deolinda Pereira, por me ter aceitado no estágio e apoiado em todos os obstáculos inerentes ao estudo. Este agradecimento é extensível à Eng.^a Ana Marques.

Agradeço ao Ângelo, porque colmatou todos os espaços como mentor do meu trabalho e da execução e compreensão de conhecimentos novos adquiridos no Laboratório de Microbiologia. Tenho em dívida horas de explicações e trabalho árduo, dedicados a mim, sempre com generosidade.

Agradeço à “menina” Elisabete, mais do que o meu braço direito, foi um suporte total na minha jornada no laboratório. À Sónia pela sua atenção e animação. Às meninas pela companhia.

Agradeço à minha amiga Helena que desde logo se prontificou a ajudar-me no processamento de dados. Mas muito mais importante, apoiou-me nas minhas escolhas, esteve sempre disposta a ouvir-me nas horas mais ingratas com desabafos prolongados.

Agradeço ao meu amigo Miguel pela força que me deu nestes anos todos.

Agradeço ao meu amigo Zé por estar presente há tantos anos a aturar-me.

Agradeço à minha amiga Giselle pela sua presença assídua quando transitei de universidade, pois durante muito tempo foi a única colega presente ao meu lado. Agradeço pela ajuda na minha tese e pelas conversas de autocarro agarrada à tecnologia do século.

Agradeço à minha amiga Sílvia que me manteve segura no curso, sem desistir, incentivando a minha aplicação. Fica em recordação os nossos momentos de diversão e vivência que deixaram na memória marcas inesquecíveis.

Agradeço à minha amiga Vânia pela força nestes anos e pela sua especial amizade e também pela ajuda na tese.

Agradeço à minha amiga Denise pela companhia durante estes anos de curso, pelos desabafos conjuntos que nos mantiveram longe de mudanças.

Agradeço aos meus colegas, em Vila Real e no Porto, pelo seu importante, e jamais esquecido, papel nestes anos.

Agradeço, com profissionalismo, ao meu painel de provadores, constituído por: Alzira, Ângelo, Elisabete, Filipe, Isabel, Laura, Paula e Sónia, pela sua presença assídua e pelo consumo do seu tempo.

Agradeço em especial, a ti *love*, por tudo e por te manteres ao meu lado.

Índice

I - INTRODUÇÃO.....	1
1. O QUEIJO.....	1
2. MICRORGANISMOS PESQUISADOS	3
3. ROTULAGEM DOS QUEIJOS.....	7
II – OBJETIVO DO ESTUDO	8
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	8
1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS	9
2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS MÃOS DOS OPERADORES.....	11
3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DA FACA	12
4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO AR	12
5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA PELÍCULA DE ACONDICIONAMENTO.....	12
6. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES TÉRMICAS DO EXPOSITOR DE QUEIJO	12
7. AVALIAÇÃO SENSORIAL DO QUEIJO	12
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	13
2. AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS QUEIJOS.....	20
3. APRECIÇÃO CONJUNTA.....	21
V. CONCLUSÕES GERAIS.....	27
VI. BIBLIOGRAFIA.....	29
VII. ANEXOS	XXXII

Abreviaturas

ALOA – *ALOA Chromogenic Agar*.

AMT – Aeróbios mesófilos totais.

APT – Água Peptonada Tamponada.

aW – Atividade da água.

BLLE – Beta-lactamase de largo espectro (referente a um estirpe de *E. coli*).

BP – *Baird Parker*.

CE – Comunidade Europeia.

cm – Centímetro.

Coag. – Coagulase

DOA – Dioctil Adipato.

E. coli – *Escherichia coli*.

g – Gramas.

ISO – *International Organization for Standardization*.

Kg – Quilograma.

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

M – Limite máximo.

m – Metro.

MH – *Mueller-Hinton*.

mL – Mililitros.

MRS – *Man, Rogosa and Sharpe Broth*.

N.º – Número.

NP – Norma Portuguesa.

OGA – *Oxytetracycline Glucose Agar*.

PCA – *Plate Count Agar*.

pH – Potencial de Hidrogénio.

PVC – Policloreto de Vinil.

RPF – *Rabbit Plasma Fibrinogen*.

SB – *Slanetz and Bartley*.

spp. – *several species*, várias espécies.

Staph. – *Staphylococcus*

TBX – *Tryptone Bile X-Glucuronide*.

TS – *Tryptone Salt Broth*.

UFC – Unidades Formadoras de Colónia.

UV – Radiação Ultravioleta.

VRBG – *Violet Red Bile Glucose*.

β – Beta.

Lista de Símbolos

°C – Graus *Celsius*.

% – Percentagem.

+ – Positivo

I - Introdução

1. O queijo

O queijo, conforme disposto na Portaria n.º 73/90 de 1 de fevereiro, é um “produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite ou do leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído, e também da nata, do leitelho, bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos, incluindo o lactossoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios”. O queijo pode ser produzido a partir de leite cru, que é um “leite produzido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C nem submetido a um tratamento de efeito equivalente” (Regulamento (CE) n.º 853/2004) ou a partir de leite pasteurizado, definido na Portaria n.º 473/87 de 4 de junho, como um “leite submetido a tratamento térmico conveniente (no mínimo 71,7°C durante 15 segundos ou outra combinação equivalente), com o fim de desvitalizar a flora patogénica não esporulada e a quase totalidade da flora banal, sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio químico do leite e sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos e das suas características organoléticas”.

O queijo pode ser classificado segundo diversos critérios. A classificação legal, patente na Portaria n.º 73/90 de 1 de fevereiro, consagra a qualificação dos queijos em função da cura, composição, consistência (Quadro 1) e matéria gorda (Quadro 2).

Quanto à cura, o queijo pode ser classificado nas seguintes categorias:

- i. Queijo curado – produto que só se encontra apto para consumo depois de mantido, num intervalo de tempo, em determinadas condições de temperatura, humidade e ventilação que permitam modificações físicas e químicas características;
- ii. Queijo curado pela ação de bolores – produto cujas características são devidas, essencialmente, à proliferação de bolores específicos no interior e/ou à superfície do queijo;
- iii. Queijo fresco – produto obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação láctica, com ou sem adição de coalho, e não submetido a um processo de cura.

Quanto à composição, o queijo pode ser classificado com base na adição de géneros alimentícios: (i) queijo sem adição de géneros alimentícios diferentes do queijo; e (ii) queijo com adição de géneros alimentícios diferentes do queijo.

Quadro 1. Classificação da consistência do queijo em função da percentagem de humidade (adaptado da Portaria n.º 73/90 de 1 de fevereiro)

Quanto à consistência	% Humidade no queijo isento de matéria gorda
Extraduro	51 (Máximo)
Pasta dura	49 - 56
Pasta semidura	54 - 63
Pasta semi-mole	61 - 69
Pasta mole	Superior a 67

Quadro 2. Classificação do queijo quanto à matéria gorda em função da percentagem no extrato seco (adaptado da Portaria n.º 73/90 de 1 de fevereiro)

Quanto à matéria gorda	% Matéria gorda no extrato seco
Muito gordo ou Extragordo	Superior a 60
Gordo	45 - 60
Meio gordo	25 - 45
Pouco gordo	10 - 25
Magro	10 (Máximo)

O consumo *per capita* de queijo em Portugal cifra-se em 10,1 Kg/ano (INE 2013), um valor inferior à média dos países de União Europeia (17,8 Kg). Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, publicados na edição de abril de 2013 do Boletim Mensal de Agricultura e Pescas, houve um decréscimo na recolha de leite de vaca e no volume de produtos lácteos. A recolha de leite de vaca em fevereiro de 2013 foi de 140 mil toneladas, o que representa uma diminuição de 8,0% em relação ao ano anterior. Em janeiro a diminuição tinha-se fixado em 2,5%. O volume total de produtos lácteos apresentou também um decréscimo de 8,4% no mês em análise, devido à menor produção de leite para consumo (-10,2%), manteiga (-12,2%), queijo de vaca (-11,1%) e nata para consumo público (-3,7%). Pelo contrário, os leites acidificados tiveram um aumento de produção de 9,6%.

Os processos tecnológicos empregues no fabrico de queijos são extremamente diversos no que concerne ao tratamento térmico do leite, adição de culturas microbianas, método de produção da coalhada (precipitação, corte, drenagem do soro, aquecimento), salga, prensagem, moldagem e cura. Pequenas variações em qualquer destas fases têm consequências muito marcantes nas propriedades dos queijos. Para além das prescrições tecnológicas, os queijos estão sujeitos a um conjunto de requisitos de natureza sanitária e higiénica, havendo que respeitar um conjunto de “medidas e condições necessárias para controlar os riscos e assegurar que os géneros alimentícios sejam próprios para consumo humano tendo em conta a sua utilização” conforme

disposto no Regulamento (CE) n.º 852/2004. A qualidade microbiológica dos alimentos é condicionada principalmente pela quantidade e pelo tipo de microrganismos inicialmente presentes e, secundariamente, pela multiplicação destes no alimento. A qualidade das matérias-primas e as condições higiénicas que presidem ao seu processamento (água, ambiente, manipuladores e superfícies de contato) constituem as principais fontes de contaminação microbiana. Por sua vez, as propriedades intrínsecas do alimento e as condições ambientais (extrínsecas) que o ladeiam regulam a evolução desse microbismo (Fox *et. al* 2004).

Nos produtos lácteos, os microrganismos têm um papel ambivalente em virtude de participarem ativamente na sua produção mas, também, na sua decomposição, havendo ainda uma pequena, mas importante, fração que pode causar problemas de saúde a quem consuma ou manipule queijos. A seleção adequada e as condições de proliferação das culturas fermentativas (*starter*) são aspetos fundamentais para o fabrico de queijos curados, isto é queijos com uma textura reológica e sabor característicos. Os microrganismos indesejáveis são responsáveis pela deterioração de produtos lácteos e os microrganismos patogénicos são introduzidos por práticas de produção insatisfatórias (Fox *et. al* 2004).

Nas matrizes alimentares, como o leite, algumas bactérias encontram-se apreendidas nos glóbulos de gordura. No que diz respeito ao queijo, este aprisionamento mantém-se e, adicionalmente, ocorre a apreensão de microrganismos na estrutura em rede formada pela caseína no processo de coagulação do leite. A junção destes dois eventos pode dar origem ao fenómeno de “clumping” bacteriano, que consiste na agregação das bactérias em determinados pontos da matriz alimentar. Durante a análise, as amostras recolhidas podem demonstrar este fenómeno pela “presença heterogénea” de espécies bacterianas na mesma amostra (Albert 1993).

2. Microrganismos pesquisados

Os microrganismos aeróbios mesófilos totais são indicadores da dimensão total da população bacteriana e outras, tais como fungos presentes na amostra. São importantes para validar e relacionar a quantidade de microrganismos específicos obtidos na mesma amostra (APHA 2001). Nos queijos, a sua relevância é demonstrada pela proporção entre a população total de microrganismos presentes na amostra e a população de microrganismos que crescem em MRS, que incluem a flora láctea, representando a diferença, o total de microrganismos potencialmente deteriorantes e/ou patogénicos presentes no queijo.

Em fases mais tardias da análise microbiológica, a relação entre os aeróbios mesófilos totais e os fungos analisados nos queijos, bolores e leveduras, são um indicativo do desenvolvimento de microrganismos deteriorantes para o alimento e, em fases precoces,

revelam, normalmente, um queijo cuja cultura *starter* contém fungos que irão participar na sua maturação.

Os microrganismos que integram a flora láctea são normalmente quantificados mediante cultivo num meio seletivo, *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS). A flora láctea é introduzida no queijo pelas culturas *starter*. Estas contêm principalmente *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus thermophilus* (Fox *et. al* 2004, Robinson 2002).

As culturas *starter* têm como funções principais a produção de ácido láctico, promover a formação da coalhada, em conjunto com a adição de enzimas de coagulação contidas no coalho (como as presentes na flor de cardo ou na renina; a mais utilizada no fabrico dos queijos), a redução do potencial *redox* e a destruição ou prevenção do crescimento de microrganismos patogénicos e deteriorantes. A microflora láctea primária, juntamente com microflora láctea secundária, constituída variavelmente por outras bactérias produtoras de ácido láctico, lactobacilos heterofermentativos, bactérias propiónicas, corineformes, estafilococos, leveduras e bolores, contribuem para o desenvolvimento das características organolépticas do queijo (Fox *et. al* 2004, Robinson 2002).

A Família *Enterobacteriaceae* engloba bacilos Gram-negativo, anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose, oxidase-negativo, catalase-positivo e redutores do nitrato em nitrito. Estas bactérias são móveis, devido à presença de flagelos peritríquios. *Enterobacteriaceae* são indicadores de segurança e mais, propriamente, da higiene nos alimentos. Este conceito foi estabelecido por pertencerem a esta família o grupo dos coliformes, que se diferenciam por fermentarem a glicose com a formação de ácido e gás. Neste grupo incluem-se os coliformes fecais, aos quais pertencem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp. Mas, *Enterobacteriaceae* também incluem agentes patogénicos de elevado risco para a segurança alimentar, tal como a *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (APHA 2001).

No queijo, a sua importância deve-se a uma maior abrangência na deteção de microrganismos indicadores de contaminação fecal e, simultaneamente constitui um potencial indicador da presença de microrganismos de elevado risco para a saúde pública. A sua presença em queijos fabricados a partir de leite pasteurizado indica contaminação durante o processo de fabrico ou posteriormente, em virtude de não sobreviverem ao processo de pasteurização. Sendo as bactérias da Família *Enterobacteriaceae* termosensíveis, ou seja, não resistem à pasteurização do leite e só surgem no queijo por contaminação posterior. Considerando que alguns dos Géneros pertencentes a esta Família são psicrotróficos, a sua multiplicação poderá ocorrer mesmo a temperaturas de refrigeração. Nos queijos fabricados a partir de leite cru, a sua presença é expectável, dada a sua ubiquidade em determinados ambientes (e.g. tubagens, cubas,

utensílios) e em virtude de poderem estar presentes no próprio leite logo após a ordenha (APHA 2001).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo e catalase-positivo, sendo muito abundante no intestino de organismos de sangue quente. A sua reação característica é a metabolização do triptofano com produção de indol. Fermenta glicose e tem a capacidade de usar o citrato como fonte exclusiva de carbono. A maioria das estirpes de *E. coli* são comensais, mas alguns serotipos podem causar toxinfecções alimentares graves em humanos. As estirpes comensais pertencem à flora normal do intestino e podem beneficiar os seus hospedeiros através da produção de vitamina K ou impedindo a colonização por bactérias patogénicas. *E. coli* sobrevive fora do intestino por um determinado período de tempo, tornando-os indicadores ideais de contaminação fecal no ambiente. Nos queijos, esta contaminação pode estar presente desde o leite recém-ordenhado até ao produto final (APHA 2001).

As estirpes de *E. coli* capazes de produzir Beta-lactamases de largo espectro (BLLE) são um problema emergente em saúde pública resultante do aumento das necessidades de prescrição de antimicrobianos, mas sobretudo do uso indevido deste precioso grupo de substâncias. O facto de estas estirpes terem resistência simultânea às penicilinas (mesmo as de amplo espectro como as aminopenicilinas), às cefalosporinas e monobactâmicos dificulta muito o tratamento de qualquer infeção em que estejam envolvidas. A importância médica das *E. coli* BLLE tem incentivado uma plêiade de estudo para o escrutínio dos factores de risco associados à sua aquisição, tendo recentemente sido reconhecida a importância dos alimentos como vector destas estirpes (EFSA 2011). O leite está entre o grupo de alimentos sensíveis, em virtude de durante o período de repouso da glândula mamária, mas também durante a lactação, serem administradas instilações com antimicrobianos (predominantemente Beta-lactâmicos) diretamente na glândula mamária para o controlo de mastites.

O Género *Enterococcus* integra bactérias Gram-positivo, em forma de cocos, catalase-negativo e esculina-positivo. Estas bactérias pertencem à Família *Enterococcaceae* e, tal como a Família *Enterobacteriaceae*, são comensais do intestino de animais de sangue quente. Algumas espécies de enterococos fazem parte integrante da flora láctea dos queijos, nomeadamente aqueles inoculados através das culturas *starter* (APHA 2001; CFSAN 2009).

Os fungos são um grupo de microrganismos que inclui um elevado número de espécies. Desenvolvem-se em vários ambientes, podendo ser encontrados no solo e no ar. Os fungos são considerados contaminantes em diversos alimentos, devido à sua presença em equipamentos de processamento de alimentos e nos locais onde estes são armazenados. Os bolores e, menos significativamente, as leveduras, crescem em meios com grandes amplitudes na temperatura e

nos valores de pH, tendo a capacidade de alterar o pH da matriz alimentar de forma a favorecer o seu crescimento. A maioria dos fungos deteriorantes tem metabolismo aeróbico, pelo que o fracionamento do queijo favorece a sua proliferação; o seu desenvolvimento ocorre predominantemente à superfície devido ao aumento da disponibilidade em oxigénio (Fox *et. al* 2004). Acresce mencionar que a casca dos queijos é normalmente tratada com substâncias antifúngicas (e.g. natanamicina); o fracionamento dos queijos cria, assim, uma superfície rica em nutrientes de fácil mobilização, com um potencial *redox* elevado e sem a barreira física e química que a casca proporciona.

Listeria monocytogenes apresenta a forma de bacilo, Gram-positivo, não esporulado, oxidase-negativo, catalase-positivo, esculina-positivo, hemolítico móvel por meio de flagelos, podendo adquirir a forma cocóide ou filamentar, conforme o meio de cultura, apresentando-se singularmente ou em formações em “V”, “Y” ou paliçada. Fermenta os hidratos de carbono em ácido sem produção de gás. Este microrganismo é microaerófilo (embora a anaerobiose não inibe o seu crescimento) e é ácido-tolerante, o que explica o seu desenvolvimento em queijos. Por fim, apresenta capacidade de sobreviver em meios com concentração salina elevada (CFSAN 2009). *Listeria monocytogenes* é ubíqua em muitos animais, causando os serotipos mais patogénicos (1/2a, 1/2b, 3a e 4b) infeções graves. Encontra-se dispersa no ambiente, especialmente no solo, razão pela qual se desenvolve em silagens, cuja preparação e conservação não foi adequada, essencialmente devido ao fraco abaixamento de pH. A silagem contaminada (principal via de contaminação dos animais) é ingerida pelos animais de produção leiteira, sendo excretada no leite onde se mantém após pasteurização incorreta. Para além disso, sobrevive à dessecação, salinidade elevada e refrigeração. Nos queijos, a capacidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* durante a maturação e armazenamento é elevada, pelo que o consumo destes produtos representa uma das principais fontes de infeção para o Homem (CFSAN 2009). A sua monitorização em queijos encontra-se abrangida pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007.

Staphylococcus aureus é uma estirpe bacteriana aeróbia, mesófila, coagulase-positivo e catalase-positivo, em forma de cocos Gram-positivo, que formam coágulos no plasma de diferentes espécies animais e são produtoras de ácido e α -toxina (toxina hemolítica). Nos meios seletivos mais usados formam colónias circulares negras, apresentando a capacidade de hidrolisar gema de ovo. São ubíquas, sendo impossível a sua erradicação do meio ambiente (onde surgem principalmente por contaminação humana ou animal), pois têm a capacidade de crescer em meios com pH entre 4,5 e 9,3 (pH ideal entre 7,0 e 7,5), com baixos níveis de atividade de água ($a_w = 0,83$) e com elevada pressão osmótica. *S. aureus* são providos do factor “clumping”, que permite agregação bacteriana. Para além disso, produzem enterotoxinas muito

termo-estáveis que causam gastroenterite em seres humanos, sendo considerados dos principais agentes etiológicos associados às toxinfecções alimentares, sendo o leite e os produtos lácteos as matrizes alimentares mais frequentemente implicadas (CFSSAN 2009).

Os queijos são vetores destas bactérias por duas razões: a presença no queijo através de leite proveniente de animais de produção com mastite por estafilococos coagulase-positivo e/ou através do manuseamento desta matriz alimentar por seres humanos portadores e/ou temporariamente contaminados. Adicionalmente, estes produtos fazem parte do grupo de alimentos que exigem manipulação considerável durante a preparação. Acresce que os queijos podem ser conservados a temperaturas superiores às de refrigeração por um período prolongado, facto que potencia a proliferação deste grupo de microrganismos (CFSSAN 2009). Inversamente, algumas bactérias da flora láctea típica dos queijos produzem bacteriocinas que inibem o seu crescimento (Trmčić 2010).

3. Rotulagem dos Queijos.

Segundo a Directiva 2000/13/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de março de 2000, relativa à aproximação das legislações dos Estados Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios, *Artigo 3.º* - 1. “A rotulagem dos géneros alimentícios incluirá unicamente as seguintes indicações obrigatórias: 1. Denominação de venda; 2. Lista dos ingredientes; 3. Quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes; 4. Para os géneros alimentícios pré-embalados, a quantidade líquida; 5. Data de durabilidade mínima ou, no caso de géneros alimentícios muito perecíveis do ponto de vista microbiológico, a data-limite de consumo; 6. Condições especiais de conservação e de utilização; 7. Nome ou firma e endereço do fabricante, do acondicionador ou de um vendedor estabelecido na Comunidade”. O fracionamento de queijos é condicionado nos termos da alínea c), do n.º 3, do artigo 4º do Decreto-Lei n.º 560/99 de 18 de dezembro, decretando que os géneros alimentícios pré-embalados deverão ser retirados no final do dia, não podendo ser novamente expostos à venda. A legislação em vigor limita a base de operações na distribuição alimentar, impossibilitando a disponibilização ao consumidor de apresentações de venda que se ajustem à situação económica nacional e europeia.

II – Objetivo do estudo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a higiene e segurança de queijos fracionados em estabelecimentos de venda a retalho de distribuição moderna e monitorizar a evolução das características intrínsecas e a salubridade dos produtos durante um período de 14 dias após a operação de fracionamento.

III – Material e Métodos

No âmbito deste trabalho foram realizadas análises microbiológicas em oito marcas/tipos de queijos diferentes. Também as superfícies de contato (utensílios, mãos e material de acondicionamento) e as condições de processamento (ar) foram controladas.

Relativamente ao protocolo de análise dos queijos, o estudo consistiu na colheita periódica de amostras em diferentes momentos após o fracionamento. Ao dia “zero” foi colhida uma amostra de queijo “inteiro” e outra de queijo fracionado, repetindo-se a colheita do produto fracionado aos três, sete e 14 dias. O produto fracionado foi mantido em refrigeração e nas condições próprias do expositor de queijos de cada estabelecimento.

Os produtos analisados foram selecionados com base nas suas propriedades comerciais e, em particular, com base nas suas características intrínsecas, nomeadamente o método de produção, o tipo de pasta, a origem das matérias-primas e o tipo de leite. No Quadro 3 estão representados os diferentes queijos amostrados, assim como as suas propriedades gerais e os respetivos estabelecimentos:

Quadro 3 – Identificação geral dos queijos analisados.

Queijos analisados	Tratamento do leite	Consistência	Espécie	Estabelecimento
1	Pasteurizado	Pasta mole	Vaca e ovelha	Loja 1
2	Cru	Pasta dura	Ovelha	Loja 2
3	Pasteurizado	Pasta semi-mole	Cabra	Loja 3
4	Pasteurizado	Pasta semi-mole	Vaca	Loja 4
5	Pasteurizado	Pasta mole	Vaca	Loja 5
6	Cru	Pasta mole	Ovelha	Loja 6
7	Pasteurizado	Pasta dura	Vaca	Loja 7
8	Pasteurizado	Pasta semi-mole	Vaca	Loja 8

1. Análise microbiológica de queijos

1.1. Preparação das amostras (Norma ISO 6887-2:2003)

Retirar assética e aleatoriamente pequenas frações em diversos pontos do queijo (ou fração) para um saco esterilizado de *Stomacher*, perfazendo 25 g. De seguida, adicionar 225 mL de APT (Água Peptonada Tamponada) e proceder à homogeneização durante 2 minutos (diluição 10^{-1}). Paralelamente executar o mesmo procedimento com outros 25 g de amostra, aos quais são adicionados 225 mL de *Half Fraser Broth* (pesquisa de *Listeria monocytogenes*).

1.2. Preparação das diluições (NP 3005:1985)

Retirar 1 mL de suspensão inicial e transferir para um tubo de ensaio contendo 9 mL de TS (*Tryptone Salt broth*) obtendo-se a diluição 10^{-2} , repetindo sucessivamente este passo até às diluições consideradas necessárias.

1.3. Quantificação de aeróbios mesófilos totais a 30°C (NP 4405:2002)

Realizar as sementeiras em meio PCA (*Plate Count Agar*) pela técnica de incorporação de 1 mL de inóculo a partir das diluições preparadas nos passos anteriores e incubar em estufa a 30°C durante 48 a 72 horas. Contar todas as colónias presentes na diluição mais alta, apresentando pelo menos 30 colónias e expressar o resultado em UFC/g de amostra de acordo com a fórmula:

$$\text{Contagem final} = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Legenda:

- $\sum C$ – Soma das colónias contadas, na diluição selecionada, e que contenham pelo menos 10 colónias.
- V – Volume semeado em cada uma das placas.
- d – Diluição considerada.

1.4. Quantificação de microrganismos com crescimento em MRS (*Man, Rogosa and Sharp*)

Semear a partir das diferentes diluições decimais selecionadas, por incorporação, 1 mL de inóculo em meio de cultura MRS e incubar em estufa a 37°C durante 48 horas. Contar todas as colónias presentes em cada uma das placas semeadas e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.).

1.5. Quantificação de *Enterobacteriaceae* (Norma ISO 21528-2:2004)

Semear a partir das diferentes diluições decimais selecionadas, por incorporação, 1 mL de inóculo em meio de cultura VRBG (*Violet Red Bile Glucose agar*) e incubar em estufa a 37°C durante 24 horas. Contar todas as colônias características presentes (cor rosa a vermelha, mucosas, com um halo formado pela precipitação de sais biliares) em cada uma das placas semeadas e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.).

1.6. Sementeira de *Escherichia coli* (NP 4396:2002)

Semear a partir das diferentes diluições decimais selecionadas, por incorporação, 1 mL de inóculo em meio de cultura TBX (*Tryptone Bile X-Glucuronidemedium*) e incubar em estufa a 44°C durante 24 horas. Contar todas as colônias características (cor azul, β-glucoronidase positiva) em cada uma das placas semeadas e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.).

1.7. Quantificação e teste de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus coagulase-positiva* (adaptado da ISO 688-2:1999)

Semear a partir das diferentes diluições selecionadas, por espalhamento, 0,1 mL de inóculo em meio BP-OVO (*Baird Parker Agar + egg yolk telurite*) e incubar em estufa a 37°C durante 24 horas. Contar todas as colônias características presentes (negra, lisa e pequena, circundada por halo transparente) em cada uma das placas semeadas e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.). Em caso de crescimento destas colônias, repicar uma colônia e suspender em 5 mL de APT até atingir um nível de turvação do padrão 0,5 de *McFarland*. Obtendo o grau de turvação ideal, semear a partir da suspensão de APT em placa de *Mueller-Hinton* para o teste de sensibilidade antibiótica, segundo o método de *Kirby-Bauer*.

1.8. Sementeira de Bolores e Leveduras (NP 3277-1:1987)

Semear a partir das diferentes diluições decimais, por espalhamento, 0,1 mL de inóculo em meio OGA (*Oxytetracycline Glucose Agar*) e incubar em estufa a 22°C durante 120 horas. Contar todas as colônias características presentes (típicas de fungos filamentosos e leveduriformes) em cada uma das placas semeadas e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.).

1.9. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (adaptado da ISO 11290-1:1995)

Adicionar 10 g da amostra inicial em 90 mL de *Half Fraser broth* (meio de enriquecimento seletivo primário), homogeneizar no *Stomacher* e incubar a 30°C durante 18 horas. Decorrido o tempo, recolher do saco *Stomacher* 1 mL da suspensão para um tubo de ensaio com 10 mL de *Fraser broth* (meio de enriquecimento seletivo secundário) e incubar durante 24 horas a 37°C. Semear por esgotamento em meio seletivo *Palcam* a partir da suspensão inicial (*Half Fraser broth*) e incubar a placa com *Palcam* e o tubo com *Fraser broth* a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte, semear a partir do tubo com *Fraser broth* por esgotamento em nova placa com meio *Palcam*, incubando-a a 37°C durante 24 horas. No caso de surgirem colónias suspeitas (negras com halo negro), repicar as colónias isoladas para meio de cultura ALOA (*ALOA chromogenic agar*) e incubar a 37°C durante 24 horas. Confirmar o crescimento de colónias de coloração verde-amarelada com halo transparente em ALOA.

2. Análise microbiológica das mãos dos operadores

Recolher um “lavado” de mãos com 100 mL de APT para um saco esterilizado, potenciando a mobilização do potencial biofilme microbiano com recurso a uma gaze estéril. Conservar sob refrigeração. Preparar as diluições (conforme o procedimento referido em 1.2.).

2.1. Sementeira e contagem de aeróbios mesófilos totais a 30°C (conforme referido em 1.3.)

2.2. Quantificação de *Enterococcus* spp.

Realizar as sementeiras pela técnica de incorporação de 1 mL de inóculo das diluições selecionadas em S-B (*Slanetz and Bartley*) e incubar em estufa a 37°C durante 48 horas. Contar todas as colónias características presentes (cor rosa-avermelhado a carmim) em cada uma das placas semeadas, apresentando pelo menos 10 colónias e expressar o resultado em UFC/g de amostra (de acordo com a fórmula mencionada em 1.3.).

2.3. Sementeira de *Escherichia coli* (NP 4396:2002) (conforme referido em 1.6.)

2.4. Sementeira e teste de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus coagulase-positiva* (adaptado da ISO 688-2:1999)

Realizar o procedimento conforme descrito em 1.7., alterando o meio de cultura de sementeira para BP-RPF (*Baird Parker Agar + Rabbit Plasma Fibrinogen*).

3. Análise microbiológica da superfície da faca

Assinalar na superfície da lâmina de corte uma área aproximada com 100 cm². Percorrer a superfície assinalada com uma gaze previamente humedecida em APT. Preparar as diluições conforme referido em 1.2. Realizar a quantificação de aeróbios mesófilos totais a 30°C (conforme procedimento referido em 1.3.), a quantificação de *Enterococcus* spp. (conforme referido em 2.1.) e a sementeira e contagem de *Escherichia coli* (de acordo com o referido em 1.6.).

4. Análise microbiológica do ar

Realizar a quantificação de aeróbios mesófilos totais pelo seguinte método: abrir uma placa de Petri, com meio PCA previamente solidificado, no local selecionado durante 15 minutos (equivalente ao contato com 1 m³ de ar) e incubar em estufa a 30°C durante 72 horas. Contar todas as colónias de aeróbios mesófilos totais (conforme referido em 1.3.).

5. Análise microbiológica da película de acondicionamento

Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais, colocando as placas de contato RODAC sobre a película de previamente esticada e pressionar durante segundos. De seguida incubar em estufa a 30°C durante 72 horas. Realizar a contagem de aeróbios mesófilos totais (conforme referido em 1.3.).

6. Avaliação das condições térmicas do expositor de queijo

Registo contínuo de temperaturas através de um dispositivo eletrónico - *data logger* acoplado a uma das frações do queijo em estudo. O dispositivo é programado de acordo com a data de início e fim, de registos pretendida e com o intervalo de tempo entre as leituras efetuadas.

Na programação foram estabelecidas as datas (“zero” dias de fracionamento até ao último dia de recolha, 14 dias) e um intervalo de registo de temperatura de 15 em 15 minutos. Os dados recolhidos foram processados para obtenção de médias, mínimos e máximos diários, e graficamente expressos para os oito queijos, no período de 14 dias.

7. Avaliação sensorial do queijo

Em cada ponto temporal de estudo, ou seja, aos “zero”, três, sete e 14 dias após fracionamento, foi realizada a avaliação sensorial de frações de queijo por um painel de provadores não treinados. A constituição deste painel variou entre seis e oito elementos que usaram uma escala sensorial estruturada (*category scaling*) disponibilizada para assinalar juízos

percecionados aquando da prova. Assim, cada provador comunicou a intensidade de cada categoria de sensação pela classificação com um valor numérico (1 a 5). No tratamento dos dados foi calculada a média de cada parâmetro sensorial, tendo-se obtido os perfis sensoriais através de gráficos radar que permitem a avaliação das variações nos 14 dias (ESB “Cheesepack”, Esteves 2009).

IV – Resultados e Discussão

1. Análises microbiológicas

No total, foram realizadas 40 análises microbiológicas aos queijos (Quadro 4), 24 às superfícies de contato alimentar (Quadro 5 e 6), oito ao ar do local de fracionamento dos queijos e oito à película de acondicionamento, utilizada como embalagem protetora manual para as frações dos queijos.

Todas as amostras de queijos testadas cumpriram os requisitos de segurança sanitária dos produtos e 39 cumpriram os requisitos de higiene dos processos legalmente estipulados (Regulamento (CE) n.º 1441/2007), tendo sido 38 amostras apreciadas com “Satisfatório” e uma amostra com “Aceitável” (amostra “7 dias” do Queijo 6). Uma amostra, do Queijo 3 não fracionado (“zero” dias), foi classificada como “Não Satisfatória” em virtude de ter ultrapassado o limite máximo de contaminação por *Escherichia coli* (1 000 UFC/g).

Quadro 4. Análise microbiológica dos oito queijos e respetivas frações amostradas aos zero, três, sete e 14 dias após o fracionamento. Os resultados são apresentados em UFC/g de queijo.

Parâmetro microbiológico	Queijo 1					Queijo 2				
	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias
AMT	1,3x10 ⁹	1,8x10 ⁹	3,2x10 ⁹	1,4x10 ⁹	8,7x10 ⁸	3,0x10 ⁹	2,1x10 ⁸	1,6x10 ⁸	1,5x10 ⁸	5,7x10 ⁷
Microrganismos com crescimento em MRS	6,4x10 ⁸	8,3x10 ⁸	1,1x10 ⁹	8,9x10 ⁸	3,3x10 ⁸	1,32x10 ⁸	1,1x10 ⁸	5,9x10 ⁷	4,5x10 ⁷	2,8x10 ⁷
<i>E. coli</i>	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	40	10	0	10	0	0	0	0	0	0
<i>Staph. coag +</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bolores	3,0x10 ²	10	0	0	1,0x10 ²	0	0	0	0	2,0x10 ⁴
Leveduras	0	0	0	1,5x10 ²	3,2x10 ⁵	9,5x10 ⁵	1,6x10 ⁶	1,2x10 ⁶	2,3x10 ³	3,5x10 ⁷
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 4. (Continuação).

Parâmetro microbiológico	Queijo 3					Queijo 4				
	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias
AMT	9,6x10 ⁸	1,0x10 ⁹	3,8x10 ⁸	3,1x10 ⁸	1,9x10 ⁸	2,1x10 ⁹	2,2x10 ⁹	1,7x10 ⁹	2,2x10 ⁹	2,1x10 ⁹
Microrganismos com crescimento em MRS	7,4x10 ⁸	2,3x10 ⁸	9,3x10 ⁶	6,8x10 ⁷	3,1x10 ⁷	1,8x10 ⁹	3,1x10 ⁸	1,5x10 ⁹	1,2x10 ⁹	2,0x10 ⁹
<i>E. coli</i>	1,2x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,6x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	30	30
<i>Staph. coag. +</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bolores	1,0x10 ²	0	4,x10 ²	0	0	0	0	0	0	1,0x10 ⁵
Leveduras	1,1x10 ⁴	1,0x10 ⁴	9,3x10 ³	0	0	5,0x10 ²	0	0	0	7,0x10 ³
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Parâmetro microbiológico	Queijo 5					Queijo 6				
	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias
AMT	8,8x10 ⁸	1,2x10 ⁹	1,7x10 ⁹	2,0x10 ⁹	1,6x10 ⁹	2,1x10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,2x10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,5x10 ⁹
Microrganismos com crescimento em MRS	2,7x10 ⁶	1,0x10 ⁹	1,0x10 ⁹	1,7x10 ⁹	1,6x10 ⁹	1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸	9,6x10 ⁷	1,0x10 ⁸	1,3x10 ⁸
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	1,0x10 ²	30	20	1,7x10 ²	20
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,8x10 ²	60	90	3,8x10 ²	10	1,7x10 ⁸	1,8x10 ⁶	1,0x10 ⁶	3,5x10 ⁶	1,2x10 ⁶
<i>Staph. coag. +</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bolores	1,6x10 ⁴	9,0x10 ³	9,8x10 ³	1,0x10 ⁴	9,1x10 ³	8,9x10 ⁴	1,0x10 ⁷	1,6x10 ²	3,1x10 ⁶	7,0x10 ⁶
Leveduras	0	0	0	0	1,6x10 ³	2,4x10 ⁷	3,8x10 ⁷	3,2x10 ⁷	1,9x10 ⁷	2,1x10 ⁷
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Parâmetro microbiológico	Queijo 7					Queijo 8				
	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias	0 dias Int.	0 dias Frac.	3 dias	7 dias	14 dias
AMT	1,9x10 ⁸	1,3x10 ⁸	2,1x10 ⁸	1,5x10 ⁸	1,9x10 ⁸	6,6x10 ⁷	7,9x10 ⁷	6,6x10 ⁷	1,0x10 ⁸	3,9x10 ⁷
Microrganismos com crescimento em MRS	1,8x10 ⁸	1,3x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸	0	2,3x10 ⁶	0	1,0x10 ⁵	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staph. coag. +</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bolores	1,5x10 ⁵	3,3x10 ⁴	1,3x10 ³	4,5x10 ⁵	1,0x10 ²	2,2x10 ²	1,0x10 ⁴	0	0	0
Leveduras	6,0x10 ⁴	3,1x10 ⁴	2,3x10 ³	9,0x10 ⁴	8,0x10 ³	0	2,4x10 ³	2,0x10 ³	2,0x10 ²	4,3x10 ⁵
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

O quociente entre os microrganismos que crescem em MRS e os aeróbios mesófilos totais (Figura 1) manteve-se relativamente estável durante os 14 dias, indicando que o fracionamento dos queijos não favoreceu, nem prejudicou, de forma diferenciada estes grupos de microrganismos.

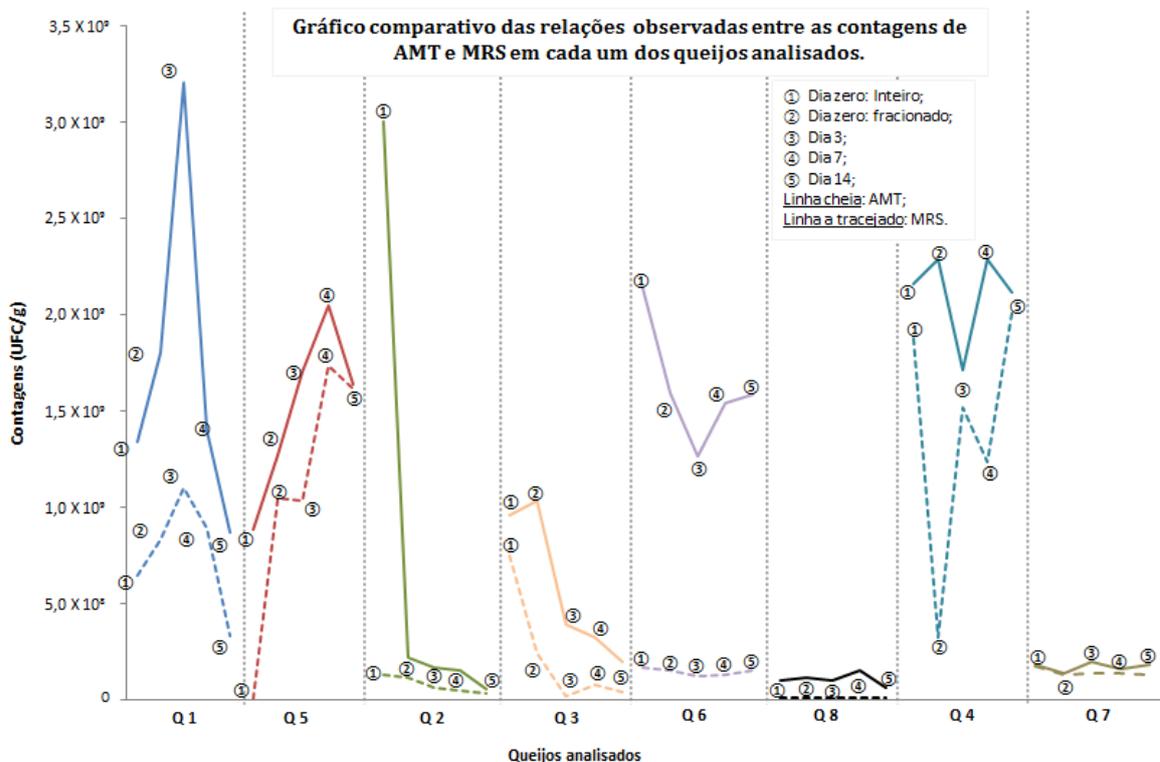


Figura 1. Relação entre o número de AMT e o número de microrganismos com crescimento em MRS nos oito queijos. Legenda: Q 1 – Queijo 1; Q 2 – Queijo 2; Q 3 – Queijo 3; Q 4 – Queijo 4; Q 5 – Queijo 5; Q 6 – Queijo 6; Q 7 – Queijo 7; Q 8 – Queijo 8.

Durante os 14 dias em que os queijos fracionados permaneceram refrigerados nos expositores de queijo nas respectivas lojas, foi registada a temperatura por dispositivos *data logger* (Figura 2).

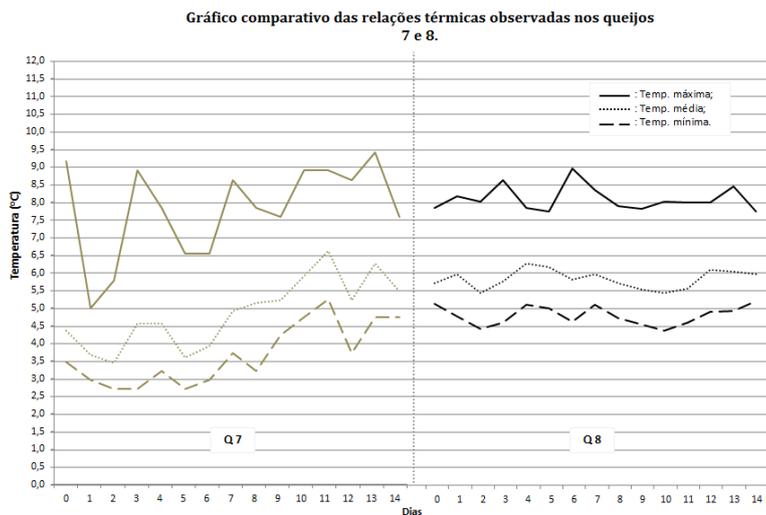
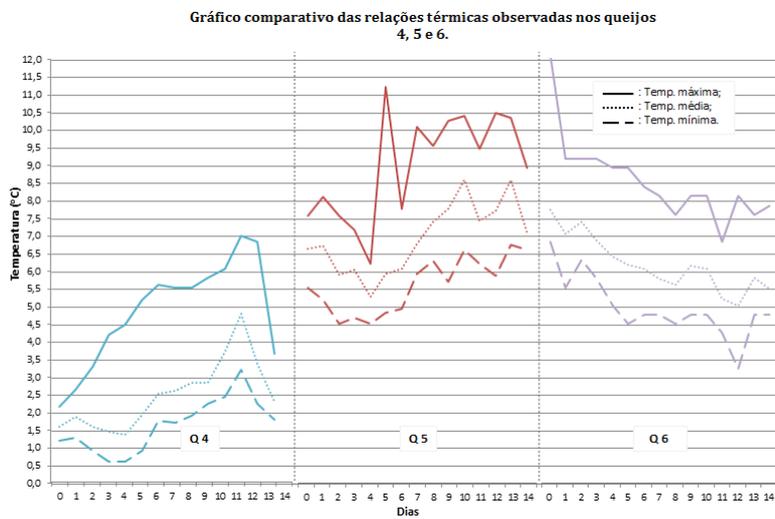
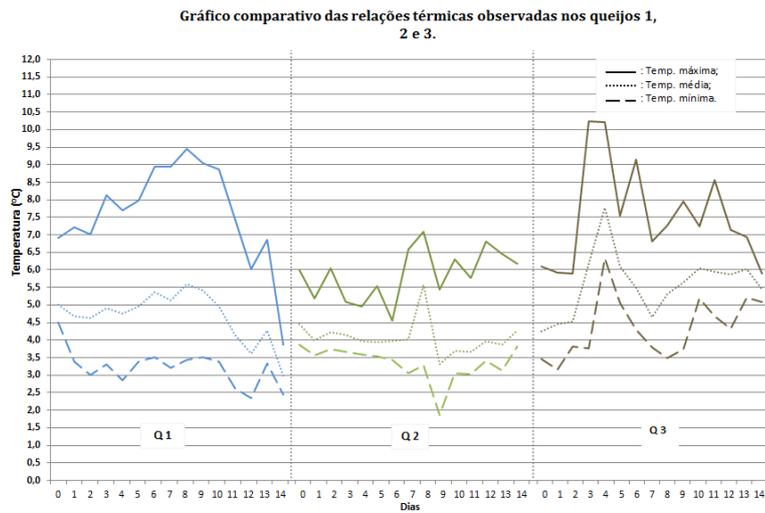


Figura 2. Monitorização das flutuações de temperatura no expositor de queijos. Legenda: Q 1 – Queijo 1; Q 2 – Queijo 2; Q 3 – Queijo 3; Q 4 – Queijo 4; Q 5 – Queijo 5; Q 6 – Queijo 6; Q 7 – Queijo 7; Q 8 – Queijo 8.

Neste estudo, recolheram-se antes e após a operação de fracionamento “lavados” das mãos com o objetivo de quantificar o número aeróbios mesófilos totais, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* (Quadro 5). As mãos dos manipuladores podem estar contaminadas com uma grande diversidade de espécies microbianas comensais e patogénicas (Todar 2006). Os microrganismos que colonizam as camadas superficiais da pele são passíveis de serem removidos durante a lavagem e desinfecção das mãos, sendo mais frequentemente associados a infeções de pele (Langley 2002). A flora residente que coloniza as camadas mais profundas da pele é mais resistente à remoção. Os produtos usados para a higienização das mãos, apesar de serem alvo de muitos testes destinados a comprovar a sua eficácia, podem não ser eficazes na inativação/remoção de *S. aureus*, em virtude destes poderem colonizar as camadas mais profundas, permitindo a sua manutenção na epiderme. Neste contexto, a higienização das mãos e o seu controlo microbiológico concentram muitas atenções nos operadores alimentares.

Ao contrário de *S. aureus*, microrganismo muito bem adaptado à pele, a pesquisa de *E.coli* e *Enterococcus* spp. nas mãos visa avaliar a existência de uma contaminação fecal direta ou indireta, resultando esta última do toque em superfícies ou matrizes alimentares contaminadas. Comparativamente a *E. coli*, a presença de *Enterococcus* spp. indicia uma contaminação fecal mais antiga. Porém, estas bactérias são também muito resistentes aos produtos de higienização, permanecendo nas superfícies e nos utensílios higienizados. No alcance dos resultados deste estudo, não foi possível inferir uma maior contaminação das mãos dos operadores que se encontravam em laboração plena comparativamente àqueles que foram testados antes de iniciarem as suas actividades laborais.

Quadro 5. Análise microbiológica das mãos dos operadores antes e depois da operação de fracionamento dos queijos. Os resultados são apresentados em UFC/mão.

Quadro 5 (a): Resultado das análises microbiológicas de mãos dos operadores (antes do fracionamento) (n=8).

“Antes”	Estabelecimento							
	Loja 1	Loja 2	Loja 3	Loja 4*	Loja 5	Loja 6	Loja 7**	Loja 8
Aeróbios Mesófilos Totais	1,1x10 ⁹	1,4x10 ⁸	2,0x10 ⁷	2,3x10 ⁵	4,2x10 ⁵	1,0x10 ⁷	1,8x10 ⁵	2,2x10 ⁵
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	6,2x10 ⁴	0
<i>Enterococcus spp.</i>	8,5x10 ³	2,7x10 ⁵	1,3x10 ⁴	0	6,0x10 ²	6,5x10 ³	7,0x10 ²	1,6x10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> ***	3,7x10 ³	5,4x10 ⁴	0	0	0	0	0	0
Uso de luvas	Sem luvas	Sem luvas	Sem luvas	Com luvas	Sem luvas	Sem luvas	Sem luvas	Sem luvas

* A funcionária foi uma das duas cujas mãos foram submetidas a análise com luvas, destacando-se o facto da quantidade de aeróbios mesófilos totais não ser a mais baixa entre as 8 (16) mãos analisadas nos diferentes estabelecimentos. ** Aproximadamente 33 % de *E. coli* nos aeróbios mesófilos totais. Neste estabelecimento o consumidor “exige” o uso de luvas, fazendo parte da rotina dos funcionários a troca de luvas entre as tarefas com higienizações intercalares rápidas. A colocação de luvas contribui para a formação de um microclima na epiderme da mão despoletando o desenvolvimento exponencial de determinadas bactérias, justificando, possivelmente, este elevado número de *E. coli*.***Nos testes de suscetibilidade antimicrobiana, os isolados de *Staphylococcus aureus* revelaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados.

Quadro 5 (b): Resultado das análises microbiológicas de mãos dos operadores (depois do fracionamento) (n=8).

“Depois”	Estabelecimento							
	Loja 1	Loja 2	Loja 3	Loja 4	Loja 5	Loja 6	Loja 7	Loja 8
Aeróbios Mesófilos Totais	1,5x10 ⁷	1,5x10 ⁸	1,1x10 ⁷	6,3x10 ⁵	5,5x10 ⁶	3,5x10 ⁷	3,2x10 ³	2,0x10 ⁸
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	1,0x10 ²	0
<i>Enterococcus spp.</i>	5,6x10 ³	1,5x10 ⁵	9,4x10 ⁴	0	4,4x10 ⁴	3,9x10 ⁵	5,0x10 ²	1,2x10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1,4x10 ⁴	0	0	0	0	0	0
Uso de luvas	Com luvas	Sem luvas	Sem luvas	Com luvas	Sem luvas	Sem luvas	Com luvas	Sem luvas

As facas analisadas nos estabelecimentos da cadeia de distribuição eram retiradas de um aparelho de desinfecção de utensílios por radiação ultra violeta (UV). Foi efetuada uma análise em 100 cm² de cada faca e feita uma quantificação relativamente a: AMT, *E. coli* e *Enterococcus spp.* (Quadro 6). As facas foram testadas antes e depois da sua utilização com o objetivo de avaliar o impacto microbiológico resultante da sua utilização, isto é que microrganismos, e em que quantidade, aderem à superfície da placa após a sua utilização no fracionamento dos queijos,

considerando-se esta informação essencial para a definição do protocolo de higienização a empregar após cada utilização. A interpretação da sua presença na faca, antes do fracionamento do queijo, deverá ter em conta a Decisão 2001/471/CE que estabelece critérios de higiene de superfícies para matadouros após o processo de higienização diária. Estes critérios foram também adotados pelo Instituto Nacional de saúde Dr. Ricardo Jorge para interpretação dos resultados relativamente ao controlo microbiológico de superfícies de contato com alimentos em operadores alimentares.

A presença de *E. coli* e *Enterococcus* spp. antes da utilização da faca após higienização e descontaminação com radiação UV indicia uma aplicação inadequada dos métodos de higienização estabelecidos pela cadeia de distribuição ou incapacidade dos produtos de higienização para eliminação dos microrganismos aderidos na faca e atesta a fraca capacidade penetrante da radiação UV. Após o fracionamento, a presença destes microrganismos não é surpreendente em virtude destes estarem presentes na matriz alimentar incisada.

Quadro 6 – Análise microbiológica das facas de fracionamento dos queijos. Os resultados são apresentados em UFC/cm² de faca (lâmina).

Quadro 6 (a): Resultado da análise microbiológica das facas (antes do fracionamento) (n=8).

“Antes”	Estabelecimento							
	Loja 1	Loja 2	Loja 3	Loja 4	Loja 5	Loja 6*	Loja 7**	Loja 8
Microrganismos (UFC/cm ²)								
Aeróbios mesófilos totais	74,7	53	11,9	11	940	880	2	27,3
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	0	0	1	1	16	0	0	0

* A faca tinha sido utilizada no início do horário de laboração para o fracionamento dos queijos para venda.

Previamente à análise a faca foi higienizada com *Shureclean*® e *Alcosan*®, até completa evaporação.

** A faca tem níveis “satisfatórios” de aeróbios mesófilos totais distintamente às restantes 7 facas analisadas nos diferentes estabelecimentos.

Quadro 6 (b): Resultado da análise microbiológica das facas (depois do fracionamento) (n=8).

“Depois”	Estabelecimento							
	Loja 1	Loja 2	Loja 3	Loja 4	Loja 5	Loja 6*	Loja 7**	Loja 8
Microrganismos (UFC/cm ²)								
Aeróbios mesófilos totais	3,37x10 ⁶	3,23x10 ⁴	4,80x10 ⁵	6,60x10 ⁶	2,79x10 ⁵	9,20x10 ⁵	6,08x10 ⁴	7,80x10 ⁴
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	9	250	43	0	9,42x10 ³	2,424x10 ³	10	15

Nas análises realizadas ao ar, todas as amostras se enquadravam num nível “satisfatório” segundo o “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” (APHA 2001) (Quadro 7).

Quadro 7 – Análise microbiológica do ar da área de laboração.

Estabelecimento	Ar (UFC/m ³)
Loja 1	6
Loja 2	4
Loja 3	3
Loja 4	1
Loja 5	1
Loja 6	1
Loja 7	0
Loja 8	6

A película de acondicionamento é um filme estirável fabricado em policloreto de vinil (PVC) para embalagem manual, segundo a ficha técnica do produto. O produto é caracterizado como pertencente à família de materiais plásticos que contêm PVC, óleo de soja e materiais plastificantes como o DOA (Dioctil Adipato, plastificante de elevada qualidade), estando de acordo com as especificações da Directiva Europeia 2002/72/CE e consequentes alterações. Este filme constituído por policloreto de vinil tem uma carga elétrica negativa, apresentando energia eletrostática constante. Este facto implica a atração de materiais e/ou microrganismos com carga positiva externa, ficando estes retidos neste filme plástico (Wilkes *et. al* 2005).

Relativamente à avaliação microbiológica da superfície da película de acondicionamento que entra em contato direto com o queijo aquando do acondicionamento e conservação em refrigeração, não foi possível detetar diferenças estatisticamente significativas comparativamente aos controlos efetuados em paralelo, pelo que se classifica esta avaliação como inconclusiva.

2. Avaliação sensorial dos queijos

A análise sensorial dos oito queijos analisados representa as propriedades sensoriais características destes e as suas alterações ao longo dos 14 dias. Os parâmetros sensoriais analisados foram expressos graficamente na Figura 3 (em anexo).

3. Apreciação conjunta

3.1. Queijo 1

Os valores microbiológicos foram satisfatórios ao longo dos 14 dias, apesar de se ter verificado um decréscimo da flora láctea e flora total na última análise (Quadro 4 e Figura 1). No queijo inteiro foi detetada a presença de *E. coli* em valores classificados como “satisfatório” segundo o Regulamento (CE) n.º 1441/2007. Nas frações não se detectou *E. coli*, facto que poderá justificar-se pelos fenómenos de “clumping” bacteriano associado à agregação das células microbianas na formação do coalho. Esta justificação é ainda plausível para a ocorrência de *Enterobacteriaceae* nas amostras do dia “zero” (inteiro e fracionado) e do dia 7. Estas bactérias são indicadores de contaminação fecal, podendo ter origem no processo de fabrico ou posteriormente.

A análise das mãos da funcionária da Loja 1 revelou a carga microbiana mais elevada registada entre os 8 manipuladores avaliados. Entre os microrganismos analisados, verificou-se a presença de *Enterococcus* spp. e *S. aureus* nas mãos (Quadro 5). A presença de *S. aureus* é preocupante, não estando ao alcance deste estudo diferenciar situações de portador daquelas que derivam de uma contaminação accidental. Foi realizado um antibiograma a um dos isolados, verificando-se sensível aos antibióticos testados. O acionamento manual de água quente na Loja 1 poderá contribuir para contaminações cruzadas durante a manipulação de alimentos. O seu impacto poderá ser mais significativo por ser um balcão de *take away*, com refeições prontas, charcutaria, pastelaria, café e similares.

A análise da faca utilizada no corte do queijo revelou uma quantidade de aeróbios mesófilos totais, antes do fracionamento, em níveis “não satisfatórios”, de acordo com a Directiva 2001/471/CE (Quadro 6). Este facto questiona a forma como é executado o processo de higienização do utensílio.

3.2. Queijo 2

Os valores microbiológicos no Queijo 2 foram satisfatórios ao longo dos 14 dias, registando-se um decréscimo contínuo dos microrganismos que crescem em MRS. Concomitantemente, foi verificado um decréscimo constante dos aeróbios mesófilos totais a partir do momento em que foi fracionado (Quadro 4 e Figura 1). Este comportamento deve-se, muito provavelmente, ao aumento do potencial *redox* após o fracionamento.

A funcionária da Loja 2 tinha um comportamento de onicofagia. Entre os microrganismos analisados, verificou-se a presença de *Enterococcus* spp. e *S. aureus* nas mãos. A Loja 2 não era provida de água quente e não havia nenhum dispensador com produto de desinfeção das mãos. A

disponibilização apenas de água fria tende a acelerar o processo de higienização, podendo este não ser eficazmente concluído pelo desconforto causado pela temperatura da água. Após o processamento dos queijos e após a lavagem das mãos, *Enterococcus* spp. e *S. aureus* permaneciam nas mãos da manipuladora, embora numa quantidade inferior, sendo este facto justificável por uma lavagem mais “intensa” que a primeira ou pelo facto de a própria recolha da primeira amostra (lavado das mãos) implicar descontaminação.

Relativamente às condições de processamento, o fracionamento era efetuado numa sala refrigerada contígua ao balcão de *take away*, na bancada de lavagem que, por sua vez, não se encontrava visualmente em perfeitas condições de limpeza. O acondicionamento das frações realizava-se no balcão de *take away*, o qual se encontrava a 4 metros, potenciando a exposição dos queijos a temperaturas superiores às de refrigeração. A lâmina da faca utilizada no corte encontrava-se em estado de conservação aceitável, ao contrário do cabo que se encontrava em mau estado, contribuindo para uma possível retenção de microrganismos, mesmo com aplicação de uma higienização conforme no utensílio. A quantidade de aeróbios mesófilos totais da análise anterior ao fracionamento encontra-se em níveis “não satisfatórios”.

3.3. Queijo 3

Ao longo dos 14 dias, nas análises efetuadas ao Queijo 3, verificou-se um decréscimo muito acentuado dos microrganismos aeróbios mesófilos totais e, simultaneamente, um decréscimo menos acentuado dos microrganismos que crescem em MRS. Durante dois dias (3º e 4º após o fracionamento) a temperatura do expositor excedeu o limite de 10°C (o equipamento foi adquirido em 2007), verificando-se aos sete dias uma queda abrupta da flora láctea do queijo. A “reativação” da riquíssima flora do queijo devido à elevação da temperatura pode desencadear uma modificação das qualidades intrínsecas do queijo (alteração do pH e interações bióticas) que, por sua vez, podem ter efeitos inibitórios sobre a flora nativa, sendo este fenómeno bem conhecido nos processos fermentativos.

No queijo inteiro detetaram-se colónias de *Enterobacteriaceae* e *E. coli*, sendo a quantificação de *E. coli* (1 210 UFC/g) superior ao estipulado no Regulamento (CE) n.º 1441/2007, não tendo sido novamente detetadas nas frações dos queijos.

Na análise microbiológica das mãos da manipuladora da Loja 3 verificou-se a presença de *Enterococcus* spp. no “lavado de mãos” antes do fracionamento. Após o fracionamento do queijo e nova “lavagem” verificou-se a presença de *Enterococcus* spp. em maior abundância, inferindo-se sobre a sua aquisição pela manipulação do queijo, em virtude destas bactérias serem parte integrante da flora láctea presente nos queijos.

A faca foi retirada do dispositivo UV no momento de entrada do primeiro funcionário na secção, ficando sobre um tabuleiro metálico, conjuntamente com outros utensílios, durante a pausa para pequeno-almoço. A quantidade de aeróbios mesófilos totais antes do corte encontrava-se em níveis “não satisfatórios”.

3.4. Queijo 4

Na análise microbiológica do Queijo 4 os valores foram satisfatórios ao longo dos 14 dias, apenas se registando um decréscimo dos microrganismos que crescem em MRS no queijo fracionado aos “zero” dias, demonstrando o impacto da entrada de oxigénio na massa do queijo, contendo maioritariamente microrganismos microaerófilos.

Nas amostras (frações já fracionadas) analisadas aos sete e 14 dias detetou-se a presença de *Enterobacteriaceae*, facto não verificado nas análises efetuadas anteriormente (“zero” e três dias após fracionamento), sendo a heterogeneidade na distribuição dos microrganismos (“clumping”) a causa mais provável. Este queijo apresentou um aumento de bolores numa fase mais tardia (sete e 14 dias), o que sugere a suscetibilidade deste queijo a bolores de tipo deteriorante.

A análise microbiológica das mãos da funcionária da Loja 4 revelou uma carga microbiana semelhante à média registada nas mãos analisadas nas lojas seleccionadas, facto relevante em virtude de ter sido um dos dois locais em que os manipuladores usavam luvas. A Loja 4 era provida de água quente, de torneiras de acionamento automático, sendo porém a sua entrada em funcionamento (ejeção da água) demorada. À semelhança da Loja 2, também não existia um dispensador de desinfetante. O lavatório encontrava-se a um metro da bancada de corte do queijo na sala refrigerada contígua ao balcão de *take away*, distanciando-se três metros do dispositivo de acondicionamento.

Na análise microbiológica da faca detetou-se uma quantidade de aeróbios mesófilos totais antes do corte em níveis “não satisfatórios” segundo a Directiva 2001/471/CE. A faca continha também 1 UFC de enterococos/cm².

3.5. Queijo 5

Os teores microbianos da metade analisada do Queijo 5, usada como equivalente aos queijos inteiros analisados, foram algo discrepantes com as restantes frações obtidas a partir outro queijo inteiro. Apesar de pertencerem ao mesmo lote, o primeiro era um queijo de qualidade inferior, pela diferença muito acentuada entre os microrganismos aeróbios mesófilos totais e os que crescem em MRS, e pela presença mais abundante de *Enterobacteriaceae*. Em

todas as amostras analisadas detetou-se a presença de bactérias pertencentes a esta Família. Não estando descrita qualquer possibilidade destas sobreviverem ao processo de pasteurização, a sua presença pode estar associada a uma possível contaminação por matéria fecal em etapas posteriores à pasteurização do leite utilizado no fabrico.

Neste queijo houve um predomínio constante de bolores, achado expectável tendo em consideração o processo de cura típico desta variedade de queijo. Por sua vez, o aparecimento de leveduras apenas aos 14 dias, demonstra o seu carácter deteriorante. Esta conclusão é corroborada pelo decréscimo muito significativo da avaliação sensorial aos 14 dias e, também, pelo facto das frações deste queijo terem estado expostas a temperaturas superiores a 10°C (superiores ao aconselhado pelo fabricante; Figura 2) nos dias 6, 8, 10, 11, 13 e 14 após fracionamento, contribuindo quer para a alteração da microflora, quer para alterações químicas assinaladas na avaliação sensorial.

A funcionária da Loja 5 encontrava-se a higienizar grelhas do assador de frangos “no churrasco” no momento anterior à “lavagem” para análise das mãos. Este facto poderá ter influenciado a presença de *Enterococcus* spp. Na Loja 5 não existia água quente, nem dispensador com produto desinfetante das mãos. À semelhança do anteriormente relatado, verificou-se um aumento na quantidade de *Enterococcus* spp. após a manipulação dos queijos.

A faca utilizada no corte do Queijo 5 foi retirada de um suporte de facas. A prática corrente do estabelecimento era a colocação da faca no dispositivo UV na abertura, permanecendo até ao primeiro pedido efetuado por clientes. Na análise realizada, a faca não esteve sujeita a radiação UV, pois a rotina de trabalho foi interrompida pelas análises. A quantidade de aeróbios mesófilos totais antes do corte encontrava-se em níveis “Não Satisfatórios” que, somando à elevada presença de enterococos (16 UFC/cm²) constituem achados preocupantes.

3.6. Queijo 6

Na análise microbiológica do Queijo 6 o rácio entre os aeróbios mesófilos totais e os microrganismos que crescem em MRS foi muito baixo, depreendendo-se a existência de um grande número de bactérias deteriorantes. De forma constante, nas 5 análises efetuadas, foram detetadas células de *E. coli*, apesar de em níveis “satisfatórios”, sendo o maior valor registado (170 UFC/g) ao sétimo dia após fracionamento. Segundo os limites fixados no Regulamento (CE) n.º 1441/2007 este valor é categorizado como “Aceitável”. A presença de *Enterobacteriaceae* foi igualmente constante em todas as análises realizadas. Estes resultados evidenciam contaminação fecal na matéria-prima ou no processo de fabrico do queijo.

A funcionária da Loja 6 tinha iniciado as suas funções há trinta minutos, executando a pesagem de queijos previamente fracionados e acondicionados por outra funcionária. Entre os microrganismos analisados, verificou-se a presença de *Enterococcus* spp., possivelmente relacionada com a atividade anterior. Após fracionamento, realizou-se nova “lavagem” onde se verifica a presença de *Enterococcus* spp. em maior abundância. Na Loja 6 existe água quente mas não optam pela sua utilização. No momento da primeira visita, o dispositivo mais próximo do local de fracionamento de queijos, encontrava-se com o pedal de acionamento automático de água quente avariado.

A análise da faca utilizada no corte do queijo foi realizada trinta minutos após o início do horário de laboração, tendo sido previamente higienizada com *Shureclean*[®] e água, seguido da aplicação de *Alcosan*[®] até à sua total evaporação. A quantidade de aeróbios mesófilos totais antes do fracionamento encontrava-se a um nível “Não Satisfatório”, de acordo com o limite estabelecido na Directiva 2001/471/CE, evidenciando um processo de higienização deficiente. Entre os aeróbios mesófilos totais detetou-se a presença de bolores *Penicillium candidum*, característicos do queijo *Brie President* e *Camembert* (McSweeney 2004), igualmente encontrados na faca usada no corte do Queijo 5. Este achado sugere uma contaminação cruzada entre os queijos fracionados. Por motivos comerciais, será mais prudente proceder ao fracionamento destes queijos, cujo inóculo contém bolores específicos, em último, concomitantemente com uma higienização da faca de uma forma bastante cuidada ou, alternativamente, recorrer ao uso de uma faca exclusiva para este tipo de queijos.

3.7. Queijo 7

No decorrer dos 14 dias, os valores de aeróbios mesófilos totais e microrganismos que crescem em MRS mantiveram-se estáveis, sendo o seu quociente muito próximo da unidade, valor muito abonatório para a riqueza da flora láctea neste queijo.

Na análise microbiológica, antes do fracionamento, das mãos da funcionária da Loja 7 verificou-se a presença de *Enterococcus* spp. e *E. coli*, demonstrando contaminação fecal direta ou indireta. O facto das tarefas realizadas no decorrer do turno terem sido executadas com luvas poderá ter contribuído para a ocorrência de condições favoráveis (microaerofilia e humidade elevada) à proliferação bacteriana na epiderme das mãos e, simultaneamente, reduzir a frequência de higienização das mesmas. Para o fracionamento do queijo, a funcionária colocou um novo par de luvas, realizando-se nova “lavagem”, onde se verificou a presença de *Enterococcus* spp. (adquiridos pela manipulação do queijo) e *E. coli* que, pelo facto deste não ter

apresentado *E. coli* em nenhuma das análises efetuadas, demonstra uma contaminação das luvas com bactérias presentes na epiderme.

A faca usada no Queijo 7 foi a única a obter a classificação “Satisfatório” relativamente à contaminação por AMT, muito provavelmente, devido a uma combinação acertada entre a prática de lavagem, o uso de um desinfetante (*Suma Bac D10*[®]) e a colocação no dispositivo para desinfecção por UV). Este protocolo era igualmente usado nas Lojas 8 e 6, não sendo porém possível uma comparação direta com esta última, em virtude da na Loja 6 a amostra ter sido recolhida numa faca já em uso.

3.8. Queijo 8

A análise microbiológica do Queijo 8 evidenciou os valores mais baixos e constantes na quantidade de aeróbios mesófilos totais, registando-se valores na ordem de 10^7 UFC/g no decorrer dos 14 dias, havendo um aumento ligeiro aos sete dias, coincidente com a presença de microrganismos que crescem em MRS. Estes últimos apenas foram detetados em frações aos “zero” e aos sete dias após fracionamento. Esta “escassez” de flora láctea é concordante com o processo tecnológico de fabrico deste tipo de queijos, em que a massa é cozida na forma, eliminando a flora láctea termossensível.

A funcionária da Loja 8, anteriormente à análise, colocava água na máquina de assar frangos “no churrasco” e tinha fatiado queijo flamengo. Entre os microrganismos analisados, verificou-se a presença de *Enterococcus* spp., possivelmente relacionada com a atividade anterior. Após fracionamento, realizou-se nova “lavagem” onde se verifica a presença de *Enterococcus* spp. em quantidade equiparável, provavelmente adquirida pela manipulação do queijo. A Loja 8 era provida de água quente, mas não era possível o processo de higienização das mão ser completado com ejeção de água temperada ou quente. Também nesta Loja não existia um dispensador de desinfetante.

A faca analisada foi retirada do suporte de facas, pois neste estabelecimento utilizavam o dispositivo UV apenas em algumas fases do dia. A quantidade de aeróbios mesófilos totais encontrados na análise microbiológica, antes do corte, encontrava-se em níveis “não satisfatórios”, de acordo com a Directiva 2001/471/CE.

V. Conclusões gerais

Nas 40 amostras de queijos testadas, 40 cumpriam os requisitos de segurança sanitária dos produtos e 39 cumpriam os requisitos de higiene dos processos legalmente estipulados (Regulamento (CE) n.º 1441/2007), tendo sido 38 amostras apreciadas com “Satisfatório” e uma amostra com “Aceitável” (amostra “7 dias” do Queijo 6 recolhida na Loja 6). Uma amostra, Queijo 3 não fracionado (“zero” dias) recolhida na Loja 3, foi classificada “Não Satisfatório” em virtude de ter ultrapassado o limite máximo de contaminação por *Escherichia coli* (1000UFC/g).

A contagem de Unidades Formadoras de Colónias de *E. coli* superior ao limite máximo verificada no Queijo 3, e acima do limiar definido para a apreciação “Satisfatório” (100 UFC/g) no Queijo 6, não pode ser imputável à operação de fracionamento, em virtude de nem as facas, nem as mãos dos manipuladores estarem contaminadas com *E. coli*. O facto deste resultado não ter sido replicado nas amostras seguintes (no primeiro queijo) e aos 14 dias do segundo não permite também associar os resultados insatisfatórios com as condições de conservação do queijo após o fracionamento. Deste modo, é legítimo concluir que a contaminação por *E. coli* se deva à qualidade higiénica do leite e/ou condições de fabrico do queijo, incluindo a fase de cura.

Os resultados obtidos relativamente à microflora total (microrganismos totais e microrganismos com crescimento em MRS) não evidenciam qualquer impacto negativo associado ao fracionamento e conservação dos queijos ao longo dos 14 dias. As contagens de microrganismos totais registam um decréscimo ligeiro ao longo do tempo, muito provavelmente associado ao efeito concertado do aumento do potencial *redox* (associado ao fracionamento), alteração do pH, esgotamento dos nutrientes e antibiose (associados à continuação do processo de cura) ou ao stress da refrigeração (decorrente da conservação das frações a temperaturas inferiores a 10° C). As contagens de flora láctea revelam que esta se manteve quantitativamente estável ao longo dos 14 dias, não havendo assim empobrecimento funcional do produto, enquanto veículo de flora láctea.

Relativamente aos fungos, o comportamento deste grupo de microrganismos regista uma enorme diversidade indissociável da tecnologia de fabrico e da flora interveniente no processo de cura de cada tipo de queijo. Todavia, o aparecimento/incremento tardio (14 dias) muito significativo de bolores (Queijo 4) e de leveduras (Queijo 1, Queijo 2 e Queijo 8) são indissociáveis de processos deteriorantes.

Não se detetaram impactos significativos nos queijos fracionados associáveis à higiene das superfícies (facas e material de acondicionamento), higiene e segurança sanitária das mãos dos manipuladores e contaminação do ar. No entanto, os resultados obtidos não foram

integralmente satisfatórios relativamente aos manipuladores e instrumentos de corte. Em função das observações efetuadas e, também, das informações recolhidas *in loco*, os resultados evidenciam a necessidade de envidar esforços que garantam uma aplicação mais uniforme das boas práticas no que concerne a procedimentos de higienização dos materiais e das mãos dos operadores. A qualidade microbiológica da película de acondicionamento representa um ponto crítico de controlo importante, mas o procedimento analítico desenvolvido neste trabalho não permitiu obter resultados significativos, ficando por esclarecer o seu papel como veículo de agentes microbianos para o produto alimentar.

A análise sensorial revela ser robusta a fixação de um tempo de comercialização de três dias após o fracionamento para todos os queijos fabricados com leite pasteurizado. Adicionalmente, este alargamento restrito aos queijos produzidos a partir de leite pasteurizado deverá ser acompanhado de vigilância sistemática dos requisitos higiénicos a aplicar durante o processamento (corte) e o acondicionamento das frações, bem como a definição fundamentada das melhores condições de refrigeração a respeitar durante a exposição. No âmbito dos resultados obtidos, o alargamento do tempo de vida útil para sete dias não deverá ser considerado de forma genérica para todos os queijos produzidos com leite pasteurizado, em virtude de dois tipos de queijo pertencentes a este grupo evidenciarem, neste intervalo de tempo, alterações nas suas características sensoriais. A análise sensorial desaconselha o fracionamento de queijos fabricados com leite cru, reforçando os dados recolhidos na avaliação microbiológica.

VI. Bibliografia

- Albert MJ, Qadri F, Haque A, Bhuiyan NA (1993), “Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5): 1397–1399.
- American Public Health Association – APHA (2001), “Compendium of methods for the microbiological examination of foods”, 4ª Ed., Frances Pouch Downes Keith Ito, Washington. 63-85. Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=nz851G-cZf0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Boletim Mensal da Agricultura e Pescas (abril 2013), Instituto Nacional de Estatística, ISSN 1647-1040.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN (2009), “Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook”, 2ª Edição, U.S. Food and Drug Administration (FDA).
- Centers for Disease Control and Prevention (2002), “Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR™): Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings”, nº RR-16. Volume 51. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5116.pdf>.
- Decisão 2001/471/CE, JO L 165 (01-06-21), 48-53.
- Decreto-Lei n.º 425/99, D.R. I Série, 246/99 (99-10-21), 7046-7052.
- Directiva Europeia 2000/13/CE, JO L 109 (00-05-06), 29.
- Directiva Europeia 2002/72/CE, JO L 220 (02-08-15), 18-58.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011), “Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals”, *EFSA Journal* 2011, 9(8):2322, 95 p.
- Escola Superior de Biotecnologia (ESB) da Universidade Católica Portuguesa, CheesePack, “Caracterização geral dos queijos selecionados – Anexo 2”. Disponível em: <http://www.esb.ucp.pt/twt/cheesepack/>.
- Esteves E. (2009), “Análise Sensorial”, Apontamentos de aulas teóricas da disciplina de *Análise Sensorial* do Curso de Engenharia Alimentar, Universidade do Algarve. Disponível em: http://w3.ualg.pt/~eesteves/docs/Microsoft%20Word%20%20AnaliseSensorial_091.pdf.

- Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP (2004), “Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology”, 3ª Ed., Volume 1: General Aspects, Elsevier Academic Press, 123-142, 190-202, 287-308, 335-341, 455-482.
- ISO 11290-1 (1995), “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method”, 16p.
- ISO 21528-2 (2004), “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method”, 10p.
- ISO 6887-2 (2003), “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination”, 15p.
- ISO 6888-2 (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”, 7p.
- Langley J, “From soap and water, to waterless agents: Update on hand hygiene in health care settings”, *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 13(5): 285–286.
- McSweeney PLH (2004), “Biochemistry of cheese ripening”, Volume 57, N.º 2/3, *International Journal of Dairy Technology*, Department of Food and Nutritional Sciences, University College, Cork, Ireland.
- NP 3005:1985 (1985), “Microbiologia alimentar - Preparação das diluições para análise microbiológica”, Instituto Português da Qualidade.
- NP 3277-1:1987 (1987), “Microbiologia Alimentar - Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C”, 1ª Edição, Instituto Português da Qualidade.
- NP 4396 (2002), “Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de *Escherichiacoli* Método corrente”, 1ª Edição, Instituto Português da Qualidade.
- NP 4405:2002 (2002), “Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C”, 1ª Edição, Instituto Português da Qualidade.
- Portaria n.º 473/87, D.R. I Série, 128/87 (87-06-04), 2241-2244.
- Portaria n.º 73/90, D.R. I Série, 27/90 (90-02-01), 436-438.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007, JO L 322 (07-12-07), 12-29.

Regulamento (CE) n.º 852/2004, JO L 139 (04-04-30), 1-54.

Regulamento (CE) n.º 853/2004, JO L 139 (04-04-30), 55-205.

Robinson RK (2002), “Dairy Microbiology Handbook – The Microbiology of Milk and Milk Products”, 3ª Ed, John Wiley and Sons, Inc., Nova Iorque, 266-286.

Todar K, “The Bacterial Flora of Humans”, Todar’s Online Textbook of Bacteriology, Universidade de Wisconsin.

Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>.

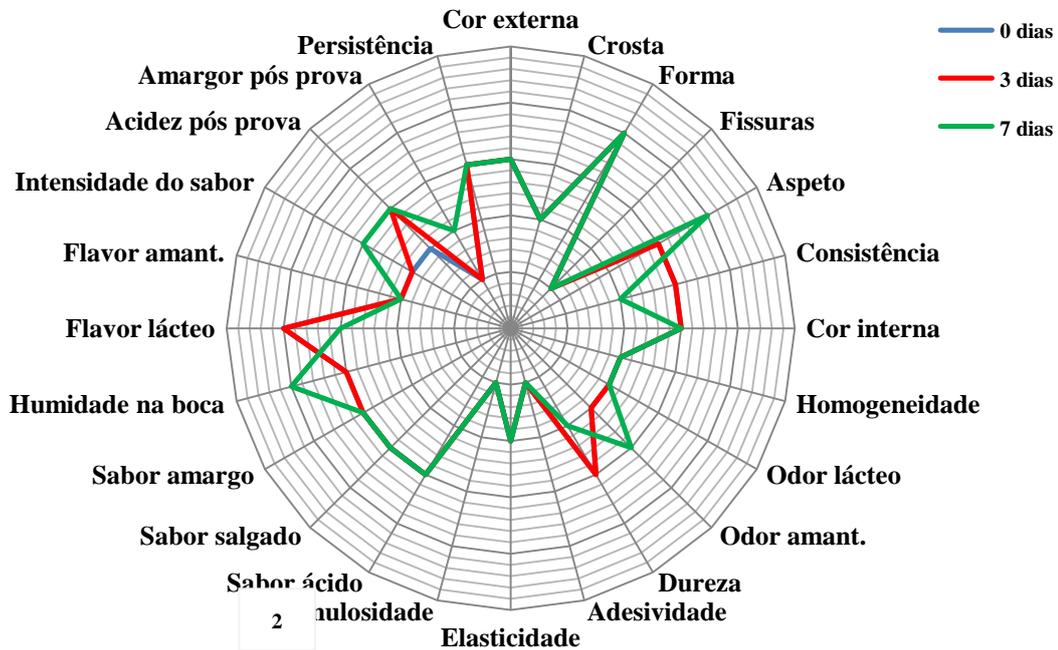
Trmčić A, Obermajer T, Majhenič AC, Rogelj I, Matijašič BB (2010), “*In-situ* inhibition of *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria consortia from two traditional Slovenian raw milk cheeses”, Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Groblje 3, Domžale, Slovenia, 183-190.

Wilkes CE, Daniels CA, Summers JW (2005), “PVC Handbook”, Hanser Gardner Publications, Inc., Munique, ISBN 3-446-22714-8, 182-189.

VII. ANEXOS

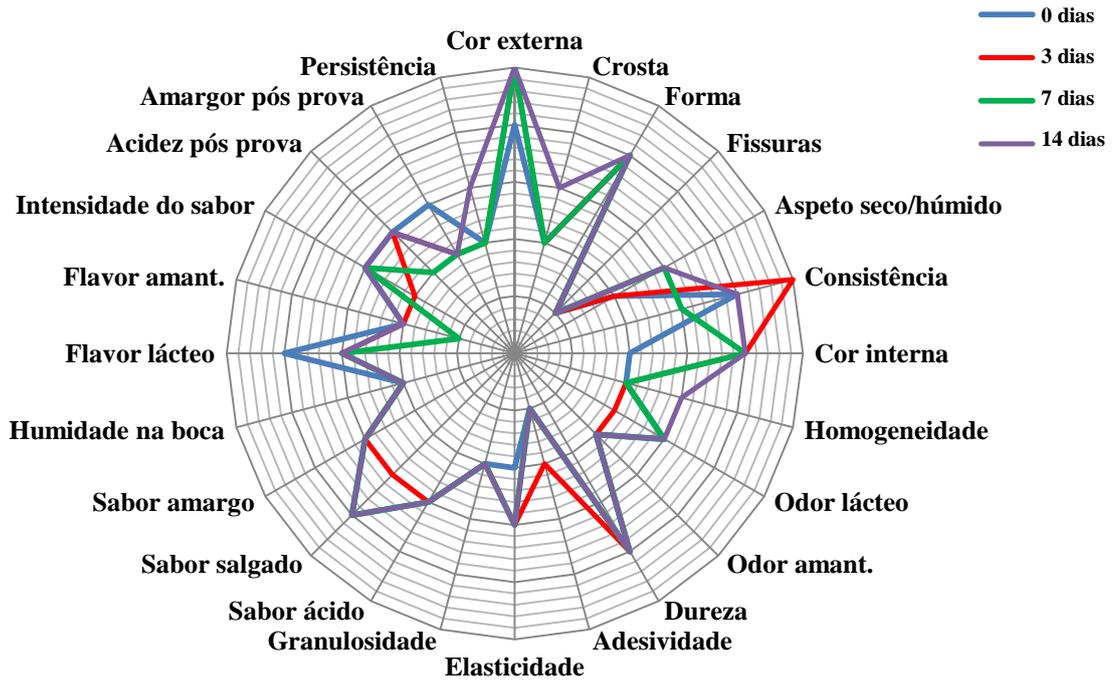
Figura 3. Avaliação sensorial de cada queijo.

Queijo 1



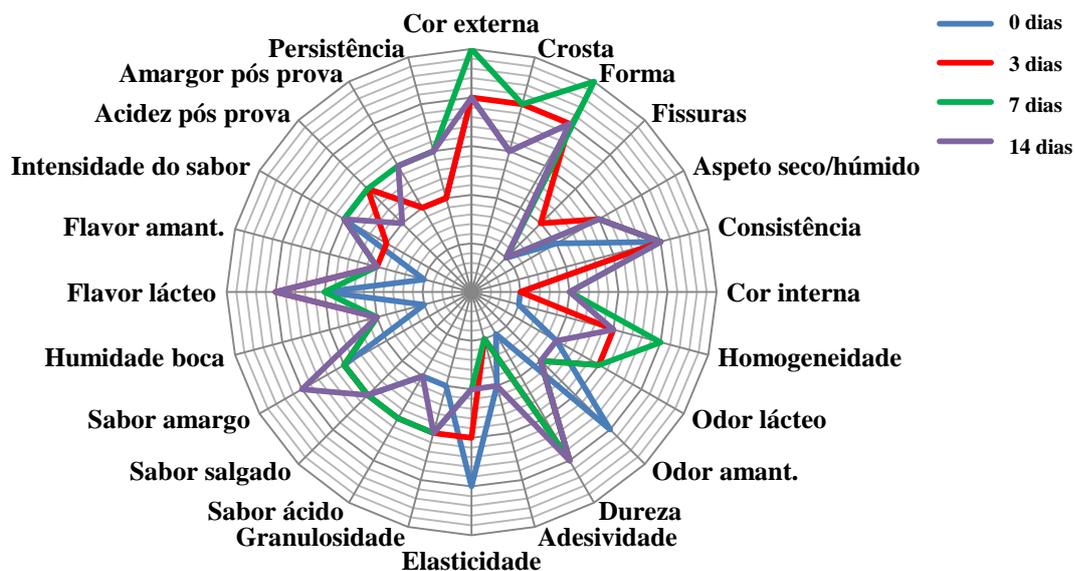
O queijo inteiro (zero dias) apresentava um bolor visível na crosta do queijo. O queijo fracionado tinha aspeto exterior e interior normal. Ambos tinham um odor não intenso. Aos 3 dias, as características permaneceram iguais, verificando-se apenas um ligeiro aumento da humidade na superfície de corte do quarto. Aos 7 dias, o odor tornou-se mais intenso, era evidente a presença de bolores na crosta do queijo, verificava-se um aumento da humidade na superfície exterior visível do queijo, uma diminuição da sua consistência e incremento da sensação de humidade na boca. A intensidade do sabor aumentou, na escala sensorial, de pouco intenso para intenso, sendo assinalável que o sabor amargo foi mais intenso aos 7 dias. Aos 14 dias, a prova sensorial de provadores não foi realizada dada a presença de um exuberante biofilme, constituído por numerosos bolores visíveis, na superfície da crosta.

Queijo 2



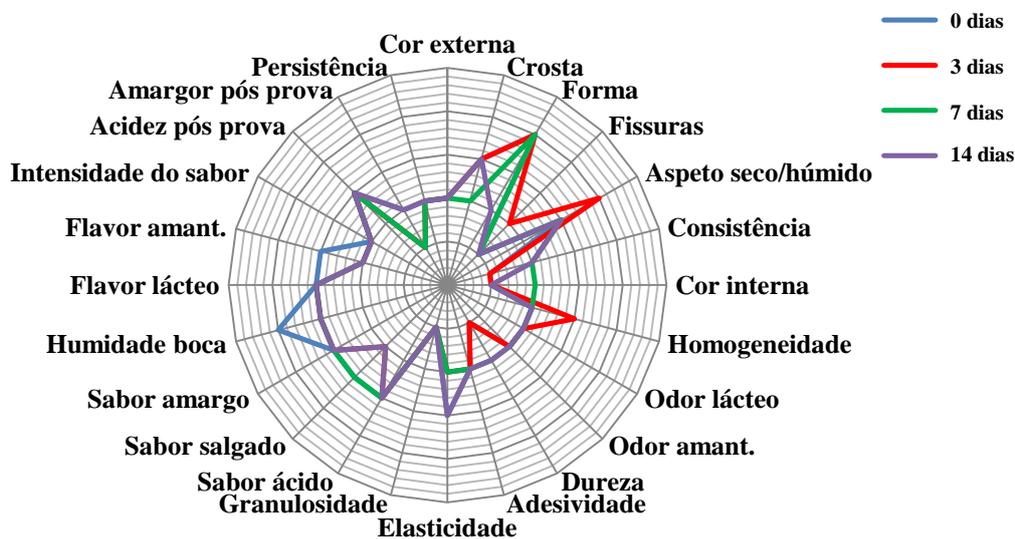
O queijo inteiro e fracionado aos “zero” dias tinham um aspeto normal, apresentando um odor intenso a leite de ovelha. Aos 7 dias verificou-se uma ligeira desidratação da crosta, alteração que sofreu um agravamento aos 14 dias e pode ser motivo para rejeição da compra do quarto de queijo. Aos 14 dias verificou-se o aparecimento de algumas imperfeições, bem como a desidratação da crosta. Quanto à homogeneidade da massa do queijo, houve uma alteração de lisa para granulada, justificável pela desidratação interna do produto.

Queijo 3



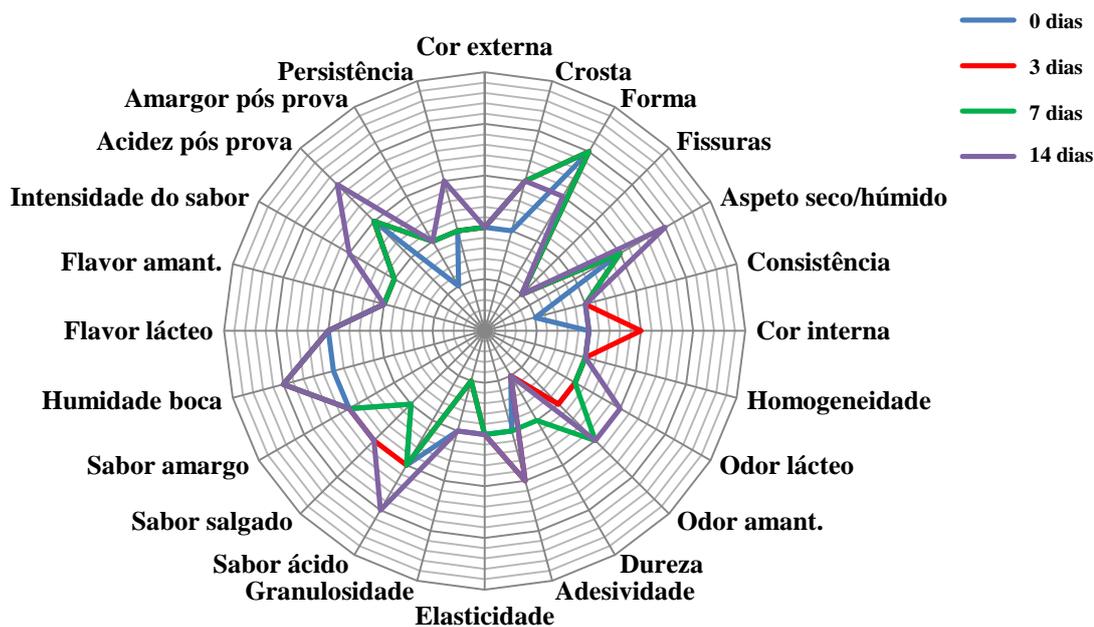
Aos 7 dias, determinadas frações do queijo, encontravam-se com a crosta desidratada. A razão é desconhecida, podendo especular-se sobre a necessidade de trocas gasosas na superfície do queijo, essencial na prevenção da perda de humidade em alguns tipos de queijo. Aos 14 dias, a análise sensorial revelou um aumento do sabor amargo, não existente nas análises precedentes, sendo justificável pela contínua produção de ácido láctico.

Queijo 4



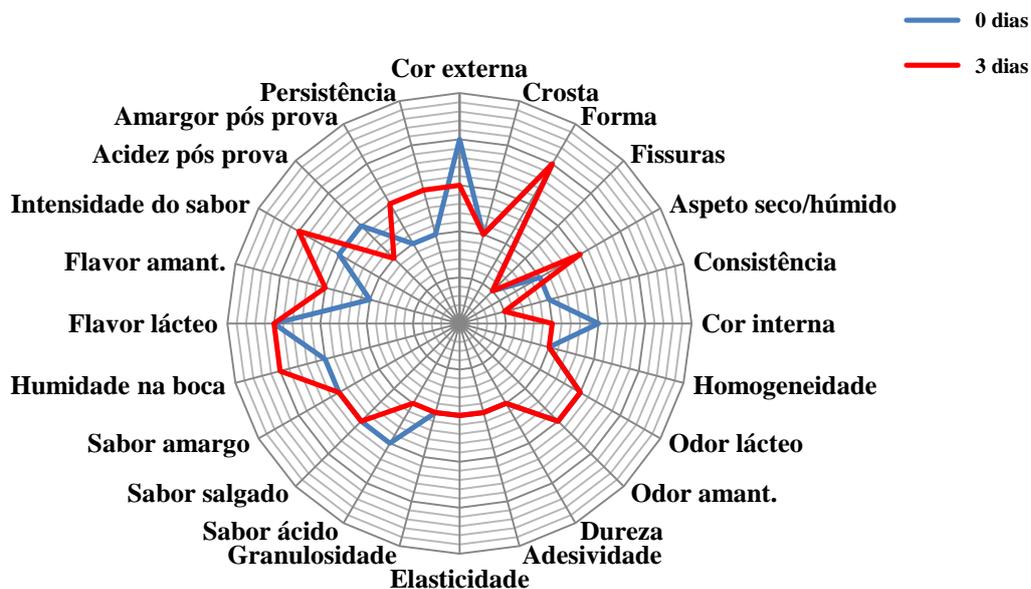
O queijo permaneceu similar pelo prazo dos 14 dias. Na última análise, houve uma diminuição do sabor salgado, tornando-se ligeiramente doce em relação ao produto inicial, mantendo o seu aspeto e odor bem como a ausência de bolores.

Queijo 5



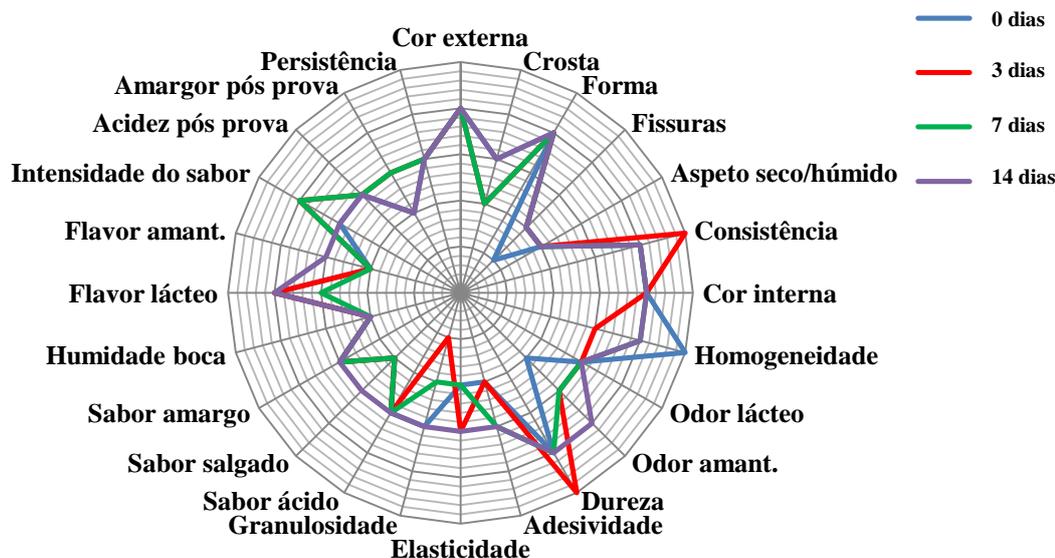
O queijo manteve-se sem alterações por um período mínimo de 7 dias (data da avaliação anterior à realizada aos 14 dias). Nos dias 6, 8, 10, 11, 13 e 14 após fracionamento, foi sujeito a temperaturas superiores a 10°C, podendo estar implicado na preservação e manutenção das suas características organolépticas. Aos 14 dias as frações encontravam-se com um aspeto desidratado, com ausência de bolores deteriorantes, justificado pela competição com o bolor inoculado no processo de fabrico. Verificou-se um aumento na humidade exterior, com aumento do odor lácteo, tornando-se intenso. O sabor ácido teve uma notória alteração, revelada pelos provadores, bem como um aumento da intensidade do sabor, da acidez na boca após a prova e a sua persistência. Esta alteração foi descrita em vocabulário corrente como “sabor a lixívia”, demonstrando alterações no pH, que se tornou mais alcalino.

Queijo 6



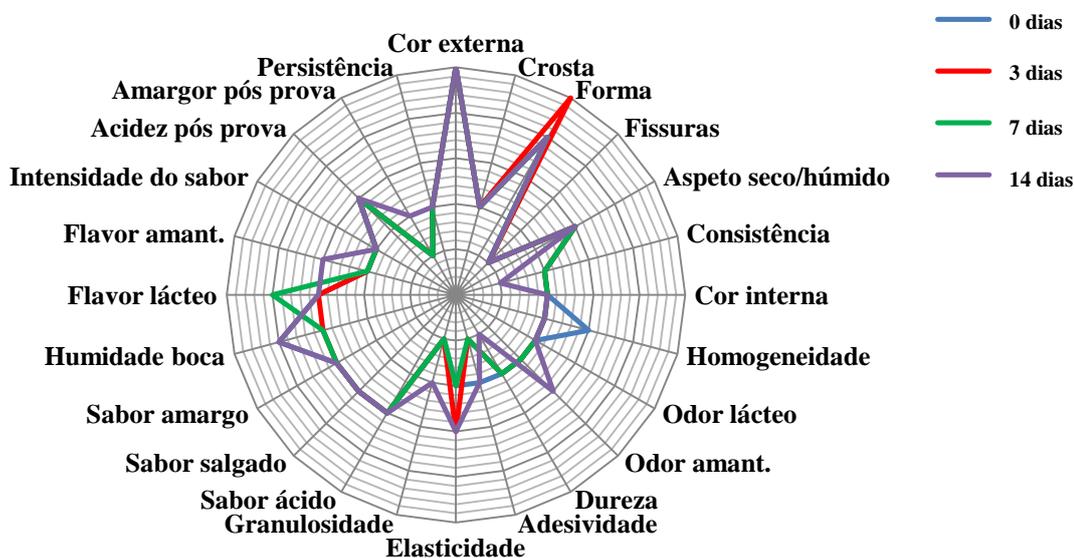
No primeiro dia analisado, ambos os queijos, inteiro e fracionado, apresentavam características satisfatórias. Aos 3 dias verificou-se um odor menos intenso, a leite de ovelha, e alguma desidratação na periferia da massa do queijo. Adicionalmente, uma das frações apresentava-se com um bolor interiorizado na crosta, podendo ser rejeitado pelo consumidor. Sensorialmente, houve um aumento da humidade exterior e na boca, e a intensidade do sabor aumentou. Em contraponto, houve uma diminuição da percepção de acidez do queijo. Este queijo apresentava um elevado número de bolores entre os aeróbios mesófilos totais, podendo justificar uma deterioração mais acelerada no exterior deste. Aos 7 dias, o queijo apresentava um grau de desidratação superior, bolor na sua superfície e um odor intenso, tendo sido interrompidas as provas devido a rejeição por parte dos provadores. A interrupção das provas foi reforçada pelo facto do fracionamento dos queijos em quartos ser um processo delicado para um queijo com um teor de humidade elevado, implicando o extravasamento da massa do queijo para o exterior da crosta. Para além disso, acrescenta-se o facto de se terem desenvolvido bolores no biofilme superficial e profundo à crosta. Aos 14 dias, as frações restantes para análise possuíam bolores em quantidade idêntica às frações analisadas ao sétimo dia. É necessário ter em consideração que este produto amanteigado e com elevado teor de humidade apresenta limitações ao seu fracionamento, pois a desidratação e extravasamento da massa do queijo são evidenciadas por este método de apresentação do produto.

Queijo 7



No decorrer dos 14 dias, as frações de queijo mantiveram-se equiparáveis ao queijo inteiro dos “zero” dias, observando-se um aumento da intensidade do odor amanteigado, bem como o surgimento de flavor amanteigado.

Queijo 8



A avaliação sensorial do queijo permaneceu inalterável até ao sétimo dia, em que se verificou humidade abundante na superfície de corte. 14 dias após o fracionamento a humidade na superfície de corte aumentou, por comparação com o sétimo e a consistência diminuiu de ligeiramente mole para mole. O odor amanteigado tornou-se significativo e o flavor amanteigado foi percecionado, o que não se verificou nas avaliações prévias. Foi relevante o aumento da humidade na boca em comparação com a primeira prova.

Figura 4: Questionário

Flavor	Lácteo	1 - Não tem sabor a leite
		2 - Tem pouco sabor a leite
		3 - "Meio termo"
		4 - Sabor a leite normal
		5 - Sabor intenso a leite
Depois de Provar	Amanteigado	1 - Não tem sabor amanteigado
		2 - Sabe um pouco a manteiga
		3 - Sabe a manteiga
		4 - Sabor a manteiga + intenso
		5 - Muito sabor a manteiga
Depois de Provar	Intensidade do sabor na boca	1 - Não intenso
		2 - Pouco intenso
		3 - Intenso
		4 - Mais Intenso
		5 - Muito intenso
Depois de Provar	Acidez	1 - Ácido (limão)
		2 - Um pouco ácido
		3 - Neutro (leite)
		4 - Pouco ácido (amoníaco)
		5 - Alcalino (báxvia)
Depois de Provar	Amaror	1 - Não fica sabor amargo
		2 - Pouco sabor amargo
		3 - Ligeiro sabor amargo
		4 - Amargo
		5 - Excessivamente amargo
Depois de Provar	Persistência	1 - Não persiste
		2 - Fica 1 minuto
		3 - Fica 3 minutos
		4 - Fica 5 minutos
		5 - Persiste (mais de 5 minutos)

Odor (Cheiro)	Lácteo	1 - Não intenso
		2 - Pouco intenso
		3 - Intenso
		4 - Mais intenso
		5 - Muito intenso
Odor (Cheiro)	Amanteigado	1 - Não intenso
		2 - Pouco intenso
		3 - Intenso
		4 - Mais intenso
		5 - Muito intenso
Depois de Provar	Dureza	1 - Mole
		2 - Levemente mole
		3 - Nem duro nem mole
		4 - Levemente duro
		5 - Duro
Depois de Provar	Adesividade	1 - Pouco adesivo
		2 - Pouco adesivo
		3 - Nem se desfaz nem é borracha
		4 - Muito elástico (desfaz-se)
		5 - Muito elástico (borracha)
Depois de Provar	Elasticidade	1 - Não tem fissuras
		2 - Superficiais
		3 - Não atravessam 1/2 casca
		4 - Atravessam
		5 - Profundas
Depois de Provar	Granulosidade	1 - Não granulado
		2 - Pouco granulado (n esfarela)
		3 - Granulado (firme)
		4 - Granulado (Mais fino)
		5 - Muito granulado (esfarela)
Depois de Provar	Acido	1 - Ácido (limão)
		2 - Um pouco ácido
		3 - Neutro (leite)
		4 - Pouco ácido (amoníaco)
		5 - Alcalino (báxvia)
Depois de Provar	Salgado	1 - Doce
		2 - Um bocado doce
		3 - Salgado
		4 - Muito salgado
		5 - Excessivamente salgado
Depois de Provar	Amargo	1 - Doce
		2 - Um pouco doce
		3 - Nem doce nem amargo
		4 - Amargo
		5 - Excessivamente amargo
Depois de Provar	Humidade na boca	1 - Seco
		2 - Menos seco
		3 - Nem seco nem húmido
		4 - Húmido
		5 - Muito húmido

Estabelecimento:
Queijo:
Porção do queijo:
Nome do Provedor:
Data: ___/___/___ Foto_ficheiro Nº:

P. Geral	P. Esp	Descrição da escala	Número
Aspecto externo	Cor	1 - Marfim	
		2 - Estranqueado	
		3 - Branco amarelado	
		4 - Amarelo	
		5 - Amarelo/Laranja	
Aspecto externo	Crostas	1 - Muito lisa	
		2 - Lisa	
		3 - Algumas imperfeições	
		4 - Rugosa	
		5 - Muito rugosa	
Aspecto externo	Forma	1 - Muito deformada	
		2 - Deformada	
		3 - Alguns defeitos	
		4 - Quase a normal	
		5 - Característica	
Aspecto interno	Fissuras	1 - Não tem fissuras	
		2 - Superficiais	
		3 - Não atravessam 1/2 casca	
		4 - Atravessam	
		5 - Profundas	
Textura ao corte	Aspecto seco/húmido	1 - Muito seco	
		2 - Seco	
		3 - "Brilhante"	
		4 - Húmido	
		5 - Muito húmido	
Aspecto interno	Consistência	1 - Mole	
		2 - Mais mole	
		3 - Nem mole, nem dura	
		4 - Mais dura	
		5 - Dura, firme	
Aspecto interno	Cor	1 - Branco	
		2 - Marfim	
		3 - Amarelo claro	
		4 - Amarelo	
		5 - Amarelo/Alaranjado	
Aspecto interno	Homogeneidade	1 - Lisa, cerrada	
		2 - Lisa, menos compacta	
		3 - Granulada	
		4 - Olhos não completos	
		5 - Olhos, grânulos	