



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**

**Escola Superior Agrária**

**Mestrado de Engenharia Alimentar**



**Caracterização Microbiológica Quantitativa e  
Qualitativa de Queijo Serpa**

**Estudo prévio para o desenvolvimento de “*Starters*” autóctones**

**Paulo César Lopes Serol**

**Beja**

**2017**



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**

**Escola Superior Agrária**

**Mestrado de Engenharia Alimentar**

**Caracterização Microbiológica Quantitativa e  
Qualitativa de Queijo Serpa**

**Estudo prévio para o desenvolvimento de “*Starters*” autóctones**

**Relatório de Mestrado, realizado e apresentado na Escola Superior Agrária do  
Instituto Politécnico de Beja**

**Elaborado por:**

**Paulo César Lopes Serol**

**Orientado por:**

**Dra. Teresa Santos**

**Beja**

**2017**



*Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado e que através do seu amor me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.*

## Agradecimentos

Durante o estágio não só adquiri experiência técnica e profissional como também tive oportunidade de conhecer pessoas que conquistaram a minha admiração e me transmitiram alguns dos seus conhecimentos.

Começo por agradecer aos meus pais, pelo apoio dado, pois sem eles não teria sido possível atingir este objetivo. Quero agradecer aos restantes familiares pelo apoio dado durante este tempo.

Quero agradecer, em memória, ao meu falecido avô, pois era um sonho que ele tinha, e também aos meus tios.

Quero agradecer a minha prima Andrea e restantes familiares pelo apoio prestado durante este tempo.

À minha orientadora Dra. Teresa Santos pela oportunidade, confiança, apoio e ajuda no trabalho realizado no laboratório e orientação do tema e na elaboração do relatório final.

À Engenheira Célia que sempre me apoio e ajudou no trabalho realizado no laboratório, pelo seu profissionalismo, dedicação, simpatia e paciência e pelos bons e maus momentos passados no Laboratório a ela os meus sinceros agradecimentos.

À D. Libânia, D. Fernanda pelo apoio prestado ao longo deste tempo, como a preparação e execução de algumas análises e pela sua simpatia.

Ao Doutor Bartolomeu Alvarenga pelo apoio prestado nas análises no texturómetro e no tratamento de dados.

À Eng. Manuela e Eng. Miguel Floro pelo apoio prestado ao longo do estágio, tanto na execução de tarefas da Análise Sensorial como na transmissão de conhecimentos.

A minha amiga Andreia Delgado e Joana Monteiro pelo apoio prestado ao longo do estágio.

A todos os professores e amigos pela convivência, amizade e colaboração durante todo este tempo.

## Resumo

O estágio curricular, para conclusão do Mestrado em Engenharia Alimentar, decorreu no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Águas do Centro de Ciências e Tecnologia dos Alimentos - Departamento de Tecnologia e Ciências Aplicadas, teve como objetivo principal a caracterização microbiológica quantitativa e qualitativa de queijo Serpa e do leite utilizado na sua produção, com vista à otimização da sua produção e qualidade, com base no aproveitamento da flora autóctone. Para tal, foram utilizadas técnicas culturais convencionais que permitiram a contagem, diferenciação, isolamento e caracterização das estirpes ativas no processo. O estudo também integrou a monitorização das propriedades sensoriais, físico-químicas e estruturais do leite e Queijo Serpa DOP.

De cada produtor de queijos DOP foram recolhidas, em tempos distintos, três amostras de leite e duas amostras de queijo Serpa DOP com 30 dias de maturação, em duas épocas do ano, Primavera e Inverno. Em cada um dos produtores não certificados, foram recolhidos dois queijos na época de inverno, perfazendo um total de dezasseis queijos de lotes distintos e dezoito leites de diferentes fabricos.

Cada amostra de queijo foi sujeita em primeiro lugar a Análises Sensoriais, segundo o boletim de certificação e segundo a ficha descritiva do produto. As amostras de leite e queijo foram sujeitas a caracterização microbiológicas quantitativa (Contagem Total de Mesófilos, Enterobactérias, *E.coli*, *Stafilococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, Fungos e Clostrídios, pesquisa de *Salmonella spp* e de *Listeria monocytogenes*), análises químicas (pH, acidez, humidade,  $a_w$ , cloretos, cinza, gordura, proteína, azoto e a Lactose no caso do leite) e análises físicas (determinação da textura e da cor),

Todos os microrganismos isolados e conservados foram identificados através de técnicas moleculares, que se realizou mediante a amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) seguida de sequenciação da região 16S do ADN ribossómico, no caso das bactérias e da região 26S do ARN ribossomal, no caso das leveduras.

**Palavras-chave:** Queijo Serpa DOP, Microbiologia do Queijo, Bactérias-Lácticas, Análises Microbiológicas, Análises Físico-químicas, Análise Sensorial.

## Abstract

This curricular traineeship, to complete the Master's degree in Food Engineering, was held in the Laboratory of Food and Water Microbiology of the research Center of Technologies and Food Sciences - Department of Technologies and Applied Sciences - and the aim of this work is to map the microflora of Serpa cheese in order to optimize its production and quality, by using indigenous flora.

This will be done through conventional cultivation techniques that allowed the count, characterization and differentiation of strains in the process.

Three samples of milk and two samples of cheese Serpa DOP with 30 days of ripening were collected from two producers of DOP cheeses at two different times of the year, spring and winter. In each of the non-certified producers, two cheeses were collected in the winter season, making a total of sixteen cheeses from different batches and eighteen milks from different suppliers.

In each sample, chemical analyzes (pH, acidity, moisture, aW, chlorides, ash, fat, protein, nitrogen and Lactose in the case of milk), physical analyzes (determination of texture and color), Microbiological (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, Fungi and *Clostridium*, *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes*). Cheese Sensory Analyzes were also carried out, according to the certification report and according to the product description sheet.

All isolated and preserved microorganisms are identified by molecular techniques, through polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by sequencing the 16S region of ribosomal DNA in the case of bacteria and the ribosomal RNA region 26S in the case of yeasts

**Keywords:** Serpa Cheese DOP, Microbiology of Cheese, lactic bacteria, Microbiological Analysis, chemical analyzes, Sensory Analyzes



# Índice geral

|  |      |
|--|------|
| Agradecimentos.....  | ii   |
| Resumo.....  | iii  |
| Abstract .....   | iv   |
| Índice geral.....  | v    |
| Índice de figuras.....   | viii |
| Índice de Tabelas .....  | ix   |
| Lista de abreviaturas e siglas.....                              | xi   |
| Introdução - Enquadramento do trabalho e objetivo.....           | 1    |
| 1. Revisão Bibliográfica .....                                   | 3    |
| 1.1. Queijo Serpa DOP - História .....                           | 3    |
| 1.2. Dados de Produção queijos DOP/IGP.....                      | 5    |
| 1.3. Denominação de Origem Protegida (DOP) – Queijo Serpa.....   | 8    |
| 1.4. Características do Queijo Serpa.....                        | 10   |
| 1.5. Características do leite para produção de queijo Serpa..... | 12   |
| 1.6. Processo de fabrico do Queijo Serpa DOP .....               | 13   |
| 1.7. Microbiológico dos queijos artesanais.....                  | 17   |
| 1.8. Potencial dos microrganismos na produção de queijo .....    | 33   |
| 1.9. Propriedades Físicas.....                                   | 36   |
| 1.10. Propriedades Químicas .....                                | 38   |
| 1.11. Análise Sensorial.....                                     | 43   |
| 2. Metodologias .....  | 45   |
| 2.1. Análises microbiológicas.....                               | 45   |
| 2.1.1. Amostragem .....  | 45   |
| 2.1.2. Análises microbiológicas .....                            | 45   |
| 2.1.3. Contagem de Microrganismos a 30°C (NP 4405:2002) .....    | 46   |
| 2.1.4. Contagem de Enterobactérias (NP 4137:1991).....           | 46   |
| 2.1.5. Contagem da Escherichia coli (ISO 16649-2:2001) .....     | 47   |
| 2.1.6. Contagem de Estafilococos (ISO 6888-1:1999).....          | 47   |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.7. Contagem de Fungos (NP 3277:1987) .....   | 47 |
| 2.1.8. Contagem de Bactérias Lácticas (ISO 15214:1998).....                                  | 48 |
| 2.1.9. Conservação das culturas .....  | 48 |
| 2.1.10. Pesquisa de Salmonella sp. (ISO 6579:2002).....                                      | 49 |
| 2.1.11. Pesquisa de Listeria monocytogenes (ISO 11290-2:1998). ....                          | 49 |
| 2.2. Análises Físico-químicas .....  | 50 |
| 2.2.1. aw .....  | 50 |
| 2.2.2. pH.....   | 50 |
| 2.2.3. Humidade (H) .....  | 50 |
| 2.2.4. Gordura (G).....  | 50 |
| 2.2.5. Cloretos (C) .....  | 51 |
| 2.2.6. Acidez Total (A) .....  | 51 |
| 2.2.7. Azoto total (NT) .....  | 51 |
| 2.2.8. Azoto solúvel em água (NSA).....  | 51 |
| 2.2.9. Cor.....  | 52 |
| 2.2.10. Textura.....   | 52 |
| 2.2.11. Milko-Scan (Análises ao Leite).....  | 52 |
| 2.3. Análises Sensorial.....   | 52 |
| 2.4. Identificação dos microrganismos isolados mediante técnicas de biologia molecular ..... | 54 |
| 2.4.1. Extração do ADN das bactérias e leveduras .....                                       | 54 |
| 2.4.3. Identificação dos isolamentos mediante a sequenciação (bactérias e leveduras).....    | 60 |
| 2.5. Tratamentos estatísticos – estatística descritiva .....                                 | 60 |
| 3. Registo e Discussão de Resultados .....   | 61 |
| 3.1. Análise Sensorial .....   | 61 |
| 3.1.1. Caracterização sensorial com base nas regras de certificação do Queijo Serpa DOP..... | 61 |
| 3.1.2. Caracterização sensorial com base na ficha de descrição do produto .....              | 63 |
| 3.2. Análises Químicas .....   | 66 |
| 3.2.1. Análises Químicas Leite .....   | 66 |
| 3.2.2. Análises Químicas Queijo.....   | 67 |
| 3.3. Análises Físicas .....  | 71 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4. Análises Microbiologias .....   | 73  |
| 3.4.1. Caracterização microbiológica quantitativa de leite utilizado no fabrico de queijo Serpa .....              | 73  |
| 3.4.2. Caracterização microbiológica quantitativa de queijo Serpa .....  | 76  |
| 3.4.3. Caracterização microbiológica qualitativa de queijo Serpa mediante técnicas de biologia molecular .....     | 80  |
| 3.5. Identificação de diferenças significativas entre queijos com diferente avaliação sensorial.....               | 87  |
| 3.6. Estudo comparativo da microbiologia qualitativa de queijo Serpa com diferente avaliação sensorial .....       | 91  |
| Conclusão.....   | 95  |
| Bibliografia .....   | 98  |
| Apêndices.....   | 104 |
| Apêndices I – Gráficos da caracterização sensorial do queijo Serpa com base na ficha de descrição do produto ..... | 105 |
| Apêndices II – Tabelas dos isolamentos das bactérias e leveduras.....  | 106 |
| Apêndices III – Tabelas da % de isolamentos das bactérias e leveduras .....  | 108 |
| Apêndices IV – Tabelas da análise sensorial .....  | 110 |

## Índice de figuras

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1 - Selo Europeu para produtos DOP .....   | 8   |
| Figura 2 - Mapa do Alentejo com Área de produção do Queijo Serpa a cor de laranja. ....   | 9   |
| Figura 3 - Selos da certificação do Queijo Serpa. A – ACOS; B - Certialentejo; C - Certis. ....   | 10  |
| Figura 4 - Diagrama de fabrico semi-artesanal do Queijo Serpa DOP .....   | 14  |
| Figura 5 - Marcador GeneRuler 100bp Plus ADN Ladder, Thermo Scientific, utilização da técnica PCR-RFLP. ....  | 56  |
| Figura 6 - Estrutura do ADN ribossomal das bactérias.....   | 56  |
| Figura 7 - Estrutura do ARN ribossomal da levedura.....   | 57  |
| Figura 8 - Estrutura do ARN ribossomal da levedura.....   | 59  |
| Figura 9 - Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos do aspeto e cheiro dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus). ....                               | 63  |
| Figura 10- Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos do sabor dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus).....  | 64  |
| Figura 11 - Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos textura, flavour, persistência e gosto residual dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus). .... | 64  |
| Figura 12 - % de Isolamentos em VRBG associados a queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).....  | 91  |
| Figura 13 - % de Isolamentos em BP classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).....   | 92  |
| Figura 14 - % de Isolamentos de Bactérias Lácticas em queijos classificados como MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 92  |
| Figura 15 - % de Isolamentos de Leveduras em queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....  | 93  |
| Figura 16 - Valores médios e desvio padrão resultados da análise sensorial do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes, referentes a análise sensorial segundo o boletim de certificação          | 105 |

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Dados de produção e comercialização de Queijos DOP em Portugal e de queijo Serpa. ....  | 7  |
| Tabela 2 - Condições de produção a que deve obedecer o queijo Serpa .....  | 10 |
| Tabela 3 - Caracterização Microbiológica do Queijo Serpa (resultados de trabalhos anteriores em log ufc/g.....)  | 11 |
| Tabela 4 – Contagem microbiana e tipos de microrganismos presentes em leites de diferentes animais em log ufc/mL .....   | 18 |
| Tabela 5 - Critérios microbiológicos de segurança e higiene (regulamento (CE) nº 2073/2005) .....  | 28 |
| Tabela 6 – Valores mínimos aproximados da atividade da água para vários microrganismos patogénicos relevantes para o queijo.....   | 39 |
| Tabela 7 – Classificação do queijo segundo a sua consistência .....  | 40 |
| Tabela 8 – Classificação dos queijos quanto ao teor de gordura referida ao resíduo seco (GRS). ....  | 41 |
| Tabela 9 - Sequencia dos “primers” utilizado para realizar o PCR.....  | 56 |
| Tabela 10 - Concentração inicial e volume dos reagentes utilizados no PCR (por amostra).....   | 57 |
| Tabela 11 - Condições de amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos 16S do ADN ribossomal. ....  | 57 |
| Tabela 12 - Sequência dos iniciadores utilizados para a reação em cadeia da polimerase das leveduras. ..   | 58 |
| Tabela 13 - Condições da amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos ITS1-5,8S ARNr-ITS2 das leveduras.....   | 58 |
| Tabela 14 – Reagentes e respetivas quantidades ampliados utilizados para a análise com enzimas de restrição .....  | 58 |
| Tabela 15 - Sequencia dos iniciadores para realizar o PCR .....  | 59 |
| Tabela 16 - Concentração inicial e volume dos reagentes utilizados na PCR (por amostra).....   | 59 |
| Tabela 17 - Condições de amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos 26S do ARN ribossomal. ....  | 60 |
| Tabela 18 - Valores médios, desvio padrão resultados da análise sensorial do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes, referentes a analise sensorial segundo o boletim de certificação...61 |    |
| Tabela 19 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a analise sensorial. ....   | 65 |
| Tabela 20 - Valores médios, desvio padrão e analises de variância referentes a propriedades químicas das amostras do leite para produção do Queijo Serpa. ....   | 67 |
| Tabela 21 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes as analises químicas. ....  | 69 |
| Tabela 22 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a dureza, adesividade e coesividade. ....   | 71 |
| Tabela 23 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, para os parâmetros da cor da pasta e cor da crosta.....  | 72 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 24 - Valores médios, desvio padrão e resultados da variância do Leite para fabrico do Queijo Serpa de vos produtores e duas épocas difere em log ufc/g. ....  | 74  |
| Tabela 25 - Valores médios, desvio padrão e resultados da variância do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes em log ufc/g.....  | 78  |
| Tabela 26 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura VRBG. ....  | 82  |
| Tabela 27 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura SB.....   | 82  |
| Tabela 28 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura BP. ....  | 82  |
| Tabela 29 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura M17. ....   | 84  |
| Tabela 30 - Identificação dos isolamentos no meio cultura MRS. ....  | 84  |
| Tabela 31 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura RBCA.....   | 86  |
| Tabela 32 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes às análises químicas das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 87  |
| Tabela 33 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes a dureza, adesividade e coesividade (análises físicas) das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....           | 88  |
| Tabela 34 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes a Cor da Crosta e da Pasta (análises físicas), das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....                   | 89  |
| Tabela 35 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes às quantificações dos diferentes grupos microbianos (log ufc/g), das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus). .... | 90  |
| Tabela 36 – Identificação e numero de isolamentos em VRBG. ....  | 106 |
| Tabela 37 - Identificação e numero de isolamentos em SB. ....  | 106 |
| Tabela 38 - Identificação e numero de isolamentos em BP. ....  | 106 |
| Tabela 39 - Identificação e numero de isolamentos em M17.....  | 106 |
| Tabela 40 - Identificação e numero de isolamentos em MRS.....  | 107 |
| Tabela 41 - Identificação e numero de isolamentos em RBCA. ....  | 107 |
| Tabela 42 - % de Isolamentos em VRBG classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 108 |
| Tabela 43 - % de Isolamentos em SB classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 108 |
| Tabela 44 - % de Isolamentos em BP classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 108 |
| Tabela 45 - % de Isolamentos de Bactérias Lácticas e classificadas em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 109 |
| Tabela 46 - % de Isolamentos em RBCA classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). ....   | 109 |
| Tabela 47 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a analise sensorial. ....   | 110 |

## Lista de abreviaturas e siglas

a.C. – Antes de Cristo

B.L. – Bactérias Lácticas

Dec. – Decreto

EN – Norma Europeia

IPAC – Instituto Português da Acreditação

*Lda.* - Limitada

log – Logaritmo

NP – Norma Portuguesa

Reg. - Regulamento

séc. – século

u.f.c – Unidade formadora de colónias

u.f.c./g – Unidade formadora de colónias por grama de amostra

u.f.c./mL – Unidade formadora de colónias por mililitro de amostra

NSLB - “*Non starter lactic bactéria*” - bactérias lácticas não iniciadoras





## Introdução - Enquadramento do trabalho e objetivo

O Queijo Serpa proveniente da região do baixo Alentejo da área geográfica de produção constante no Decreto Regulamentar n.º 39/87 é um produto de Denominação de Origem Protegida (DOP) (Reg. n.º 2081/92). Possui características nutricionais e sensoriais muito apreciadas que faz com que esteja entre os queijos curados tradicionais portugueses mais conhecidos e apreciados (Reis, *et al.*, 2011; Alvarenga, 2008; Alvarenga, *et al.*, 2011) tendo-se assistido a um aumento da sua procura nos últimos anos (Alvarenga, 2008; Alvarenga, *et al.*, 2011).

É um queijo curado fabricado com leite cru de ovelha, coalhado por ação de uma infusão de cardo (*Cynara cardunculus L.*) (Dec. Reg. n.º 39/87). A técnica de produção vincadamente artesanal, baseada no uso de leite cru, sem adição de inóculo, evidencia a importância da flora autóctone como responsável pelas características do queijo, sendo um dos fatores mais importantes na sua especificidade e qualidade (Guerreiro, *et al.*, 2013). Este produto caracteriza-se por apresentar textura fechada amanteigada (humidade 61 a 69%), zona de corte facilmente deformável, podendo entornar, aspeto untuoso, com poucos ou nenhuns olhos, de cor branco-amarelada ou amarelo palha clara e uniforme, forma de cilindro baixo, regular, com abaulamento lateral e um pouco na face superior, sem bordos definidos (Dec. Reg. n.º 39/87).

Apesar da sua importância sobretudo em termos de economia local, os trabalhos de investigação científica relacionados com a sua especificidade são poucos (Reis, *et al.*, 2011), incidindo sobretudo nos aspetos físico-químicos e tecnológicos (Alvarenga, 2008; Alvarenga, *et al.*, 2011; Alvarenga, *et al.*, 2018; Canada, 2001; Amaral, 1996; Roseiro, *et al.*, 2003) e sensoriais (Canada, 2001). Tal como acontece com outros queijos tradicionais portugueses, estes estudos estão muito aquém daqueles produzidos noutros países sobre este tipo de produto (Reis, *et al.*, 2011). Esta condição aplica-se ao queijo Serpa sobretudo no que respeita à identificação e caracterização microbiológica, incluindo o estudo da flora específica ao longo da maturação (Roseiro, *et al.*, 2003) e benefícios que se podem retirar do conhecimento da mesma.

Alguns estudos incluem uma caracterização microbiológica efetuada apenas pela utilização de técnicas culturais, incidindo essencialmente na quantificação de diferentes grupos microbianos no leite ou no produto final, frequentemente na ótica da avaliação da higiene e segurança do produto (Canada, 2001; Amaral, 1996; Roseiro, *et al.*, 2003). Não existe qualquer informação consistente, obtida através da utilização de métodos moleculares, acerca do tipo e evolução de grupos microbianos envolvidos nas fases de produção e maturação deste tipo de queijo com identificação da flora envolvida, sobretudo a flora láctica, cuja presença e desempenho é essencial para a qualidade do queijo.

Assim, com a finalidade de contribuir para a preservação de um produto que faz parte do património gastronómico e tendo em conta a importância do papel da comunidade microbiana indígena nestes aspetos, pretende-se com este trabalho iniciar o processo de mapeamento da microflora do queijo Serpa,

através da pesquisa e quantificação dos diferentes grupos microbianos por técnicas culturais convencionais e posterior isolamento, caracterização, conservação e identificação por técnicas moleculares dos microrganismos.

Este trabalho permitirá identificar microrganismos autóctones, bem-adaptados à tecnologia utilizada, assim como à tipologia do queijo que, utilizados de forma adequada, poderão vir a contribuir para uma maior homogeneidade das características do produto final assim como para a qualidade e segurança do mesmo.

De cada produtor de queijos DOP foram recolhidas em tempos distintos, três amostras de leite e duas amostras de queijo Serpa DOP com 30 dias de maturação (tempo mínimo de maturação), em duas épocas do ano, Primavera e Inverno. Em cada um dos produtores não certificados, foram recolhidos dois queijos na época da primavera, perfazendo entre todos um total de dezasseis queijos de lotes distintos e dezoito leites de diferentes fabricos. No caso dos queijos, cada amostra era constituída por duas unidades, uma para as análises microbiológicas e físico químicas e outra para análise sensorial.

Em cada amostra foi efetuada a contagem do total de microrganismos a 30°C, a contagem e isolamento para posterior identificação de bactérias lácticas dos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, de Enterobactérias, de *Escherichia coli*, de estafilococos e de fungos. Foi também efetuada a pesquisa de *Salmonella spp* e de *Listeria monocytogenes*. De cada grupo quantificado foram isoladas, conservadas cerca de 20% das colónias e identificadas por técnicas moleculares.

As amostras foram paralelamente caracterizadas do ponto de vista físico-química através da realização de análises como o pH, acidez, humidade,  $a_w$ , cloretos, cinza, gordura, proteína, azoto e a Lactose no caso do leite. A avaliação física incluirá a determinação da textura (dureza, adesividade e coesividade) e a cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ).

Também foram feitas análises sensoriais aos queijos Serpa, foi feita a análise sensorial segundo o boletim de certificação e segundo a ficha descritiva do produto.

Todos os microrganismos isolados e conservados foram identificados através de técnicas moleculares, que se realizou mediante a amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) seguida de sequenciação da região 16S do ADN ribossómico, no caso das bactérias e da região 26S do ARN ribossomal, no caso das leveduras.

# 1. Revisão Bibliográfica

## 1.1. Queijo Serpa DOP - História

Existem várias lendas relacionadas com o aparecimento do queijo o que torna bastante difícil precisar a época em que teve origem. É, no entanto, consensual que constitui uma das mais remotas e uteis conquistas do homem pois, durante milénios, o fabrico do queijo foi utilizado como única forma de conservação dos principais constituintes do leite (Bettencourt, *et al.*, 2008).

É quase certo que a produção do queijo nesta região teve origem nos povos seminómadas, ligados à produção pecuária. Estudos arqueológicos realizados demonstram que o “berço” da civilização nesta região se localizou no vale do Rio Guadiana, através da fixação de comunidades semi-nómadas (Dias, 1998). Este autor refere que “(...) o carácter de estepe do Alentejo vai ao encontro de uma maneira de viver semi-nómada, dum povoação criadora de animais”.

Entre os achados arqueológicos no vale do Guadiana encontram-se moldes feitos de barro tosco, que indiciam o conhecimento ancestral do fabrico do queijo nesta região (Bettencourt, *et al.*, 2008). Entre estes, um fragmento de cincho de cerâmica datado da Idade do Cobre (5 000 a.C.) (Dias, 1998).

A presença dos romanos a partir do séc. III a. C. veio trazer um grande progresso em termos técnicos, o que permitiu rentabilizar as atividades agropecuárias, sendo atribuída a este povo a implementação efetiva do fabrico do queijo em Portugal e a própria origem da palavra queijo. O queijo era de grande importância para os romanos, sendo indispensável nas refeições, no entanto pareciam preferir o queijo de vaca (Rebello, 1994; Dias, 1998). Efetivamente a maioria dos agrónomos romanos dá mais importância à produção de queijo de vaca que ao de ovelha, no entanto, o facto de este último ser referido por alguns indicia que já seria produzido nesta região. Neste caso o mais provável é que o queijo de ovelha tenha sido introduzido antes pelos lusitanos e sobretudo pelos cartagineses, devido à grande tradição destes povos no pastoreio de ovinos e caprinos (Dias, 1998).

No princípio do séc. VIII chegam à região os povos islâmicos representados sobretudo pelos berberes, povo nómada que se fixa ao longo do vale e serras adjacentes ao Guadiana. Ao contrário dos romanos, eram povos que faziam da sua principal atividade a pastorícia, aliando a esta a agricultura (Dias, 1998). O carácter nómada deste povo prende-se com a necessidade de poupar o gado à dureza sazonal do clima destas regiões, mas também pela baixa fertilidade dos seus solos onde a vegetação rapidamente se acabava, obrigando à procura de novos pastos. A sazonalidade desta atividade foi corrente até meados do século XIX (Dias, 1998).

A este povo se deve, especialmente na margem esquerda do Guadiana, a grande experiência no pastoreio e fabrico de queijo de ovelha e cabra. Num tratado de agricultura de origem árabe do século XI

refere-se que “o leite idóneo para fazer queijo é o de ovelha, e depois o das vacas e cabras” (Dias, 1998). Hábitos e vocábulos relacionados com a pastorícia e queijaria, como *alavão*, *almece*, *rabadão*, *zagal*, entre outros, fazem ainda hoje parte do quotidiano dos pastores alentejanos. Com os árabes veio também a raça de ovelha, *Merina Branca*, muito mais eficiente na produção de leite que a raça Campaniça, predominante até então (Dias, 1998).

Com as invasões cristãs no séc. XII e XIII o povoamento rural da região diminuiu devido às constantes batalhas, fugindo a população para os povoados onde tinha proteção. De forma a incentivar o repovoamento das serras adjacentes a Serpa, os forais da vila estabelecem benefícios fiscais relativamente à atividade pastoril e, inclusivamente, à produção de queijos. Durante o séc. XIV a XVI, o mel, cera, gados e caça foram o ex-libris da região de Serpa (Dias, 1998). Coelho, (2003) escreve que os queijos do Alentejo apareciam referidos numa descrição do Reino de Portugal elaborada no século XVI, sendo definidos como os melhores em todo o mundo em fineza e em sabor.

Através da recolha de dados efetuada por Dias (1998) nos livros de dízimos do Almoarifado de Serpa (Arquivo Distrital de Beja), é possível verificar no final do séc. XVII a produção de queijos em Serpa rondava as 11 mil unidades anuais, havendo um ligeiro aumento durante o séc. XVIII para cerca de 12 mil. Ao longo do séc. XIX a produção diminuiu ligeiramente, situando-se a sua produção abaixo das 10 mil unidades anuais. Segundo o mesmo autor, o número de produtores de queijos teve uma evolução semelhante à da produção de queijo, estimando-se entre 35 a 40 rouparias nos séculos XVII-XVIII, chegando ao século XIX com apenas 20 a 25 rouparias (Arquivo Distrital de Beja).

No princípio do século XIX o queijo, para além de alimento importante para as populações rurais, era também utilizado como forma de pagamento quer da renda na região de minifúndio, quer dos salários nas regiões de latifúndio. O queijo estava frequentemente incluído nas refeições que os patrões disponibilizavam aos seus assalariados. Nesta época o comércio do queijo estava praticamente limitado à região onde era produzido e apenas no final do século XIX começam a aumentar as vendas de queijo para as cidades (Coelho, 2003).

Efetivamente ao longo do século XIX verifica-se um grande aumento no consumo de queijo, associado à evolução industrial com o salto qualitativo de linhas de produção manual e artesanal para outras de cariz industrial (Reis, *et al.*, 2011). Para esta evolução da comercialização muito deve ter contribuído a presença de produtores e de exemplares de queijo Serpa nas Exposições Universais de Paris e de Londres, assim como nas Exposições Agrícolas ou Industriais de Lisboa (Dias, 1998).

Já no século XX, no ano de 1908, há a assinalar a presença de queijos de ovelha da região de Serpa na “Exposição Nacional no Rio de Janeiro”, onde figuraram os melhores produtos artesanais de Portugal (ACOS, 1995 ACOS (1995). “Queijo Serpa” in Revista Ovelha, ano VIII, (28): 29). No Congresso de Leitaria, Olivicultura e Indústria do Azeite, que decorreu em Lisboa em 1905, o queijo do Alentejo produzido na região de Beja, possivelmente o que hoje se designa como Serpa, foi referido como sendo dos mais

conhecidos e tão distinto como o Serra da Estrela, Castelo Branco ou Rabaçal. Também foi referido que este queijo era vendido em grande quantidade em Évora e em Lisboa, sendo vendido diretamente pelo lavrador ou pelo roupeiro ou por intermediários que o mantinham em armazém até ocasião favorável de venda (Coelho, 2003).

O século XX é a época em que se verifica um grande incremento do consumo de leite e laticínios em todo o mundo. Isto deve-se sobretudo aos avanços técnicos no que respeita aos métodos de ordenha, de conservação dos produtos, alimentação animal, seleção de espécies e, paralelamente, aos estudos relacionados com o valor nutricional destes produtos ("*Applied Dairy Microbiology*", Elmer H. Marth, James L. Steele, 2001; CRC Press).

De acordo com as perspetivas da COM (2006), o consumo de queijo deveria crescer em alguns países cerca de 11% até 2013, devido ao aumento no consumo de produtos de maior valor acrescentado, particularmente do queijo. Neste contexto, os vetores estratégicos para o século XXI devem assentar na necessidade de garantir a sustentabilidade ambiental, fomentar as economias de escala (consolidação da reestruturação ao nível das explorações leiteiras, concentração industrial, em particular no subsector do queijo) e a diversificação dos mercados e produtos.

Atualmente conhecem-se no mundo mais de 2000 variedades de queijo. Praticamente todos eles se enquadram nas categorias básicas de "Mole (fresco)", "semi-mole", "semiduro", "duro" ou "Extra duro". Mas, o queijo é uma categoria de alimentos que apresenta muitas variáveis. Por exemplo, pode ser feito a partir do leite de vaca, cabra ou ovelha, ou uma combinação destas, ou mesmo de outros. Pode ter uma textura mais fechada ou mais aberta. Pode ser feito a partir de leite cru ou pasteurizado. (FDA 2016).

## **1.2. Dados de Produção queijos DOP/IGP**

Em Portugal, segundo relatório do (MADRP, 2007), no período pós-adesão à Comunidade Europeia (1985), o sector de laticínios nacional registou uma performance notável traduzida por uma oferta crescente de leite e produtos lácteos e pela melhoria global da qualidade da matéria-prima e dos produtos transformados. Segundo Canada (1998) a produção total de queijo em Portugal subiu cerca de 31,2%, nos dez anos que se seguiram à adesão e, sensivelmente no mesmo período, verificou-se o aumento de cerca de 18,8% na produção de queijos de ovelha e cabra artesanais, acompanhando a tendência europeia.

Entre 1997 e 2001 a produção de queijos com nomes protegidos aumentou 43%, atingindo cerca de 1,5 milhares de toneladas, representando cerca de 2% da produção total de queijos curados no País que, por sua vez, aumentou 24% neste período. Atinge em 2001 e a preços correntes cerca de 13 milhões de euros. Isto ficou a dever-se ao acréscimo substancial das quantidades vendidas, ao passo que os preços ao longo do período decresceram ligeiramente. A taxa de crescimento médio para o índice de valores foi da ordem dos 13% (DGADR-a, 2014).

A partir do ano de 2001 é de destacar a estabilização da produção de leite de ovelha e cabra o que representa um decréscimo de 2,5% e 30%, respetivamente, face aos quantitativos médios registados no final da década de 90 (MADRP, 2007). Esta produção representa menos de 7% do total da produção de leite nacional (MADRP, 2007). Este relatório refere que, neste período, no subsector do queijo verificou-se a proliferação de um número muito significativo de empresas de média/pequena dimensão, muitas das quais afetas à produção de queijos de pequenos ruminantes com denominação de origem, cuja produção representava, à data de 2007, cerca de 8% da produção de queijo de pequenos ruminantes. Em termos de evolução, verifica-se uma estabilidade no caso do queijo de ovelha e uma redução importante nos queijos de cabra, em linha com a retração da produção primária (-25% face aos quantitativos obtidos no final da década de 90). Segundo documento GPP (2013) na primeira década do século XXI verificou-se um ligeiro aumento na produção DOP e IGP, mas com um peso ainda pouco expressivo em relação à produção total (cerca de 2%).

DGADR b (2014) confirma que entre 2002 e 2009 a produção de queijos DOP/IGP, é da ordem dos 2 % da produção total nacional. No entanto, tanto para os queijos DOP/IGP como para o total nacional, há um decréscimo na produção de 4 % e 5 % respetivamente, em 2009 relativamente a 2002. O valor da produção dos queijos DOP/IGP3 apresenta uma evolução semelhante à das quantidades produzidas. Este valor atinge o máximo em 2008 de cerca de 14 milhões de euros que decresce para aproximadamente 13 milhões e 800 mil euros em 2009.

A produção total de leite em 2015 apresentou uma variação positiva de 0,6% relativamente a 2014. O leite de ovelha (69 milhões de litros) registou igualmente um volume superior em 0,6%, enquanto o leite de cabra (27,8 milhões de litros) decresceu 2,7%. A produção total de queijo decresceu 1,7%, com 77,2 mil toneladas produzidas. Esta evolução resultou sobretudo da menor produção de queijo de vaca (menos 2,9%) e também do queijo de cabra (menos 2,7%). No entanto a produção de queijo de mistura e de ovelha aumentou respetivamente, 6,4% e 0,6%. Neste último caso com 11,5 mil toneladas (Estatísticas Agrícolas, 2016).

A produção de queijo Serpa tem acompanhado as tendências de produção de queijo artesanal com descida em 2009 depois de um máximo em 2007 (Tabela 1). A partir de 2010 a produção voltou a subir até 2013, vindo a descer desde aí. De 2014 para 2015 verificou-se uma diminuição da produção de 4% e redução da percentagem relativamente à produção total de DOP."

Tabela 1 - Dados de produção e comercialização de Queijos DOP em Portugal e de queijo Serpa.

| Ano  | Total Queijos em Portugal (DOP+IGP) | Produção Queijo Serpa (Kg) | Total Queijarias produtoras de queijo de Ovelha na área Demarcada Q. Serpa | Nº Queijarias Certificadas Q. Serpa | Nº Explorações abastecedoras de leite | Produção Queijo Serpa (%) | Produção total DOP em Portugal (t) | Preço Q. ovelha/kg com DOP (€) | Preço Q. ovelhas/kg sem DOP (€) | Valores da produção Queijo Serpa (x1000 €) | Valores da produção Total (x1000 €) | Modalidade de escoamento mais frequente Queijo Serpa (%) |            |               |                     |        |
|------|-------------------------------------|----------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|-------------------------------------|--|------------|---------------|---------------------|--------|
|      |                                     |                            |  |                                     |                                       |                           |                                    |                                |                                 |  |                                     | Comércio tradicional                                     | Consumidor | Intermediário | Grandes Superfícies | Outros |
| 2015 | 12                                  | 50300                      | 22   | 7                                   | -                                     | 3,5                       | 1422,9                             | -                              | -                               | 11668,14                                   | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2014 | 12                                  | 52230                      | -  | 5                                   | -                                     | 3,8                       | 1370,2                             | -                              | -                               | 11373,39                                   | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2013 | 12                                  | 64070                      | -  | 6                                   | 20                                    | 4,3                       | 1485,9                             | -                              | -                               | 9611,16                                    | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2012 | 12                                  | -                          | -  | 6                                   | -                                     | -                         | 1323,7                             | -                              | -                               | 11576,87                                   | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2011 | 12                                  | 47584                      | -  | 7                                   | -                                     | 3,5                       | 1353,5                             | -                              | -                               | 11590,59                                   | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2010 | 12                                  | -                          | -  | 6                                   | -                                     | -                         | 1314,9                             | -                              | -                               | 11427,06                                   | -                                   | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2009 | 12                                  | 10298                      | -  | 8                                   | -                                     | 1,0                       | 1397,2                             | 11,5                           | -                               | 118,4                                      | 13765,51                            | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2008 | 12                                  | 11566                      | -  | 7                                   | -                                     | 1,0                       | 1454,2                             | 11,5                           | -                               | 133,0                                      | 14144,72                            | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2007 | 12                                  | 89541                      | -  | 7                                   | -                                     | 6,3                       | 1403,6                             | 11,5                           | -                               | 1029,7                                     | 12954,65                            | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2006 | 12                                  | 65011                      | -  | 6                                   | -                                     | -                         | 1306,8                             | 11,5                           | -                               | 747,6                                      | 12515,95                            | -  | -          | -             | -                   |        |
| 2005 | 12                                  | 50000                      | -  | 8                                   | 30                                    | 3,9                       | 1297,5                             | 11,5 (10,5 - 13,0)             | 9,5                             | 575,0                                      | 11065,56                            | 5  | 5          | 30            | 50                  | 10     |
| 2004 | 12                                  | 67257                      | -  | 8                                   | 25                                    | 4,6                       | 1449,6                             | 12,5                           | -                               | 840,7                                      | 13631,62                            | -  | -          | -             | -                   | -      |
| 2003 | 12                                  | 81600                      | -  | 8                                   | 35                                    | 6,3                       | 1286,8                             | 12,0 (11,0 - 13,5)             | 10                              | 979,2                                      | 12990,67                            | 10   | 15         | 23            | 45                  | 7      |
| 2002 | 12                                  | 60000                      | -  | 7                                   | 28                                    | 4,1                       | 1458,3                             | 11,50 (11,0 - 12,5)            | -                               | 690,0                                      | 13371,61                            | -  | 2          | 31            | 65                  | 2      |
| 2001 | 12                                  | 62000                      | -  | 4                                   | 19                                    | 4,1                       | 1526,0                             | 10,47 (9,98-11,22)             | -                               | 649,43                                     | 12757                               | 10   | -          | 10            | 80                  | -      |
| 2000 | 12                                  | 20000                      | -  | 4                                   | 20                                    | 1,5                       | 1365,1                             | 10,97 (9,98-13,47)             | -                               | 649,43                                     | 11495                               | -  | -          | 30            | 70                  | -      |
| 1999 | 12                                  | 33000                      | -  | 4                                   | 15                                    | 3,0                       | 1256,1                             | 11,47 (10,97-12,22)            | -                               | 378,59                                     | 10725                               | 5  | -          | 35            | 60                  | -      |
| 1998 | 12                                  | 30000                      | -  | -                                   | -                                     | -                         | 1120,7                             | 10,47                          | -                               | 314,24                                     | 8014                                | -  | -          | -             | -                   | -      |
| 1997 | 12(1)                               | 19000                      | 38   | 12                                  | -                                     | 2,1                       | 1064,1                             | 10,97                          | -                               | 384,1                                      | 7634                                | -  | -          | -             | -                   | -      |
| 1996 | 11(2)                               | 18700                      | 52   | 8                                   | -                                     | 2,8                       | -                                  | -                              | -                               | -  | -                                   | -  | -          | -             | -                   | -      |
| 1995 | 10                                  | 10200                      | 52   | 8                                   | -                                     | 2,4                       | -                                  | -                              | -                               | -  | -                                   | -  | -          | -             | -                   | -      |
| 1994 | 10                                  | 14450                      | 52   | 10                                  | -                                     | 7,8                       | -                                  | -                              | -                               | -  | -                                   | -  | -          | -             | -                   | -      |

(1) (+ Tolosa - IGP) (2)(+Pico) Fonte: DGADR, (2016); GPP, (2014); Canada, (2001); Dias, (1998); Amaral, (1996)

### 1.3. Denominação de Origem Protegida (DOP) – Queijo Serpa

As denominações de origem protegida são uma forma de defender os interesses regionais e nacionais e que têm como objetivo prioritário “a defesa das gentes e do seu património cultural”. As denominações de origem só se podem aplicar a um produto cujas qualidades principais resultem das características próprias de uma região e das condições tradicionais de fabrico, com as suas regras próprias, transmitidas e aperfeiçoadas de geração em geração. A Denominação de Origem Protegida, cujo selo europeu identificador se apresenta na Figura 1, possibilita uma diferenciação do produto pela qualidade, permitindo a sua sobrevivência num mercado aberto e concorrencial.

A primeira iniciativa governamental em torno da defesa do Queijo Serpa surge em 1987, com o Decreto-Lei Nº39/87 de 29 de junho, onde são adotadas medidas que visam a proteção deste produto. São definidas medidas que passam pela delimitação da respetiva área geográfica de produção e pela fixação de parâmetros que garantam a sua genuinidade e qualidade (condições de maturação e conservação, a forma, dimensões e pesos, crosta e pastado queijo). Preconiza-se ainda a necessidade de implementar o processo para a constituição de uma entidade certificadora para o Queijo Serpa.



Figura 1 - Selo Europeu para produtos DOP

A Região Demarcada de produção de queijo Serpa (Figura 2) ficou assim definida pelo referido Decreto-lei (Figura 2) e abrange todas as freguesias do conselho de Mértola, Beja, Castro Verde, Cuba, Ourique, Moura, Serpa, Vidigueira; Aljustrel, Ferreira do Alentejo e Alvito e ainda as freguesias de Colos e Vale de Santiago pertencentes ao conselho de Odemira, assim como São Domingos, Alvalade e Abela do conselho de Santiago do Cacém, Azinheira de Barros, no conselho de Grândola e Torrão no conselho de Alcácer do Sal.





Figura 2 - Mapa do Alentejo com Área de produção do Queijo Serpa a cor de laranja.

A Denominação de Origem do queijo Serpa foi reconhecida pelo Despacho nº 52/94, de 15 de fevereiro, que fixa também as características a que deve obedecer este produto. O pedido de registo na Comunidade Europeia ao abrigo do artigo 17º do Regulamento (CEE) nº 2081/92, foi aceite e publicado no Regulamento (CE) nº 1107/96, de 12 de junho. De acordo com o Despacho 52/94, a entidade Produção e Comercialização de Produtos Agropecuários, *Lda.* (SULPAR) é inicialmente reconhecida como agrupamento de produtores, sendo responsável pela gestão do uso da denominação de origem protegida "Queijo Serpa" e pelo pedido de registo europeu. Esta vem posteriormente a ser substituída nas suas funções pela Queijo Serpa – Agrupamento de Produtores (Despacho 5/97 de 1 de fevereiro).

Em outubro de 2005 a ACOS (Aviso n.º 8076/2004-2ª série, de 9 de agosto) é substituída pela CERTIALENTEJO – Certificação de Produtos Agrícolas, *Lda.*, como entidade certificadora (Aviso n.º 4173-C/2005 (2ª série) de 19 de abril).

Atualmente a entidade certificadora do Queijo Serpa é a CERTIS – Controlo e Certificação, *Lda.*, que a 5 de fevereiro de 2010 foi declarada como acreditada pelo IPAC, para a NP EN 45011:2001 – Requisitos para Organismos de Controlo e Certificação, entre outros produtos, no âmbito das Indicações Geográficas e Denominação de Origem (CERTIS).

A marca de certificação sofreu alterações relacionadas com a mudança de entidade certificadora. Na Figura 3 são apresentadas as três marcas utilizadas, desde o início do processo em 1994 pela ACOS (Figura 3A), passando pela CERTIALENTEJO (Figura 3B) e, atualmente, pela CERTIS (Figura 3C).



Figura 3 - Selos da certificação do Queijo Serpa. A – ACOS; B - Certialentejo; C - Certis.

## 1.4. Características do Queijo Serpa

O queijo Serpa, de acordo com o estipulado no Anexo II do Decreto Regulamentar nº39/87 é um queijo curado, de pasta semi-mole, amanteigada, com poucos ou nenhuns olhos, obtido por esgotamento lento da coalhada após a coagulação de leite cru de ovelha estreme, por ação de uma infusão de cardo (*Cyanara cardunculus*, L.), proveniente da Região Demarcada.

A produção do queijo Serpa deve ainda satisfazer as seguintes condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de produção a que deve obedecer o queijo Serpa

|   |  |
|---|--|
| Teor de humidade referido ao queijo isento de matéria gorda | 61% a 69%  |
| Teor de gordura referido ao resíduo seco (NP-2105)          | 45% a menos de 60%   |
| Forma   | Cilindro baixo (prato), regular com abaulamento lateral e um pouco na face superior.   |
| Dimensões e pesos   | <p><b>Merendeiras:</b> diâmetro de 10 cm a 12 cm, altura de 3 cm a 4 cm e peso compreendido entre 200g a 250g;</p> <p><b>Cuncas:</b> diâmetro de 15 cm a 18 cm, altura de 4 cm a 5 cm e peso compreendido entre 800g a 900g;</p> <p><b>Normais:</b> diâmetro de 18 cm a 20 cm, altura de 4 cm a 6 cm e peso compreendido entre 1000g a 1500g;</p> <p><b>Gigantes:</b> diâmetro de 25 cm a 30 cm, altura de 6 cm a 8 cm e peso compreendido entre 2000g a 2500g</p> |
| Crosta  | <p><b>Consistência:</b> maleável, permitindo alguma flutuação:</p> <p><b>Aspetto:</b> inteira, bem formada, ligeiramente rugosa</p>  |

|   |  |
|---|--|
|   | e fina;<br><b>Cor:</b> Amarelo-palha-clara, uniforme.  |
| <b>Pasta</b>                                | <b>Textura:</b> fechada, amanteigada, com zonas de corte facilmente deformável, podendo entornar;<br><b>Aspetto:</b> untuosa, com poucos ou nenhuns olhos;<br><b>Cor:</b> branco-amarelada ou amarelo-palha, escurecendo ao contacto com o ar. |
| <b>Aroma e sabor</b>                        | Geralmente forte e com dominância do sabor picante.  |
| <b>Maturação</b>                            | <b>Condições de ambiente:</b><br>Temperatura entre 6°C e 12°C;<br>Humidade relativa entre 85% e 90%;<br><b>Tempo mínimo de cura:</b> 30 dias<br><b>Coefficiente de Maturação:</b> 45.  |
| <b>Conservação (temperatura do produto)</b> | <b>No armazém:</b> entre 0°C e 5°C<br><b>No transporte:</b> entre 0°C e 10°C<br><b>No retalhista:</b> entre 0°C e 10°C   |

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da caracterização microbiológica do queijo Serpa elaborados com leite cru de ovelha.

Tabela 3 - Caracterização Microbiológica do Queijo Serpa (resultados de trabalhos anteriores em log ufc/g).

| Determinação           | Queijo Serpa Artesanal | Queijo Serpa Industrial | Queijo Serpa 30 dias |
|------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| Contagem Total a 30 °C | 8,34                   | 8,24                    | 8,86                 |
| Bactérias Lácticas     | 7,77                   | 7,42                    | 8,29                 |
| Coliformes             | 9,54                   | 6,78                    | 5,51                 |
| <i>E.coli</i>          | 4,54                   | 2,50                    | 3,82                 |
| <i>S.aureus</i>        | -                      | -                       | <4                   |
| Fungos                 | 3,87                   | 3,77                    | 4,24                 |

Fonte: Canada (2001); Roseiro (2003)

Quanto á Contagem Mesófila Total, trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores entre 8,24 e 8,86 log ufc/g, no que respeita à contaminação por este microrganismo no final do tempo de cura (Canada, 2001; Roseiro, 2003).

## 1.5. Características do leite para produção de queijo Serpa

O queijo Serpa tem vindo gradualmente a modernizar-se para responder às novas exigências comunitárias. A transformação do leite de ovelha no queijo que é apresentado ao consumidor, sofreu um processo evolutivo inerente às alterações sociais e tecnológicas, garantindo-lhes um produto de elevada qualidade, mas que continua tradicional, único e genuíno.

Tradicionalmente o Queijo Serpa era fabricado exclusivamente com leite produzido por ovelhas das raças regionais Merina e Campaniça. Atualmente muitos produtores optaram por explorar raças exóticas, como a raça ovina francesa *Lacaune*, mais especializadas na produção de leite.

Efetivamente a legislação elaborada para a defesa da qualidade do Queijo Serpa, não especifica o fator “raça ovina” como um fator condicionante na atribuição da denominação Queijo Serpa. Nas Regras de Produção de Queijo Serpa (Vieira, 1994) apenas se refere que o leite utilizado no fabrico deste queijo deve ser proveniente de fêmeas da espécie ovina e produzido exclusivamente na área geográfica definida legislação adequada.

Na região ainda existem muitos defensores das raças autóctones, tradicionalmente utilizadas como produtoras de leite, argumentando que é deste leite que resulta o melhor queijo. No entanto estas raças ovinas autóctones originalmente utilizadas na produção de queijo Serpa, são do tronco Merino, mais vocacionadas para a produção de carne, pois apresentam níveis individuais de produção de leite reduzidos. Para colmatar este baixo nível de produção eram ordenhados rebanhos de grandes dimensões, com recurso a mão de obra extraordinária e com um incremento das despesas associadas. Isto levou a que os produtores destas raças autóctones deixassem de ordenhar porque não era rentável (Bettencourt, *et al.*, 2008).

Atualmente a intensificação da produção tornou-se uma necessidade, o desmame dos borregos passou a ser mais precoce e a ordenha, tradicionalmente manual, passou a ser feita mecanicamente (Bettencourt, *et al.*, 2008).

A qualidade microbiológica e química do leite é um fator muito importante no fabrico do queijo, em especial quando são produzidos a partir do leite cru, ou seja, o leite não é submetido à pasteurização, daí sem a matéria prima adequada não é possível obter bons derivados (Silva, 2011).

Assim, nas Regras de Produção de Queijo Serpa (Vieira, 1994) estão estabelecidas as condições a que devem obedecer os rebanhos donde proceda o leite a utilizar no fabrico no que respeita ao estado sanitário dos animais, intervalos de segurança no que caso de vacinações, medicação e tipo de alimentação. No mesmo documento encontram-se também procedimentos de higiene e de conservação do leite.

## 1.6. Processo de fabrico do Queijo Serpa DOP

O local onde se fabrica o queijo, cuja designação mais usada atualmente é queijaria, é também conhecido como “rouparia”. Este termo, que começa a ser utilizado a partir do século XVI, está associado à utilização de vários tipos de panos em diferentes etapas de fabrico do queijo (Bettencourt, *et al.*, 2008; Barata, 2003). A rouparia era normalmente uma empresa do tipo familiar e com pouca mão de obra, situada numa casa pequena que fazia parte de um dos montes da propriedade, na generalidade com poucas condições higiénicas (Bettencourt, *et al.*, 2008).

A figura principal da “rouparia” era o “roupeiro”. Na maior parte das vezes era um trabalhador assalariado chamado para a herdade apenas na altura em que as ovelhas estavam prontas para ser ordenhadas. No fabrico do queijo, o “roupeiro” tinha como função principal o controlo da coagulação e da cura. A hierarquia estaria muito bem definida competindo às mulheres que eram afetas à “rouparia” as operações de limpeza e utensílios, o fabrico e a lavagem dos queijos (Bettencourt, *et al.*, 2008).

Aos ajudantes “moços do monte”, eram dados os trabalhos mais pesados como carregar os cântaros com o leite do “aprisco” (redil onde se recolhem as ovelhas) para a rouparia e fazer o transporte da água e da lenha. Ajudavam ainda a mexer o “almece” que depois iam vender às populações durante a madrugada (Bettencourt, *et al.*, 2008).

O controlo da cura, considerada a fase mais crítica do processo de fabrico do queijo, estava a cargo do “roupeiro”, que controlava o arejamento das casas de cura apenas através da abertura de portas e janela (Bettencourt, *et al.*, 2008).

O “roupeiro” baseava as suas decisões na sua experiência e sensibilidade, conhecimento prático que passava de geração em geração, tornando-se por vezes num “segredo de família”. Atualmente muitas queijarias introduziram novas tecnologias de forma a controlar as condições de fabrico e a qualidade do produto final, no entanto verifica-se que continuam a ser aplicados conhecimentos empíricos próprios, o que conduz à heterogeneidade do produto final.

Pode considerar-se que o fabrico de Queijo Serpa começa realmente na pastagem, onde se produz a matéria-prima. Mas o processo continua na rouparia com as fases essenciais que vão da chegada do leite até à maturação do queijo.

Na figura 4 é apresentado o diagrama de fabrico semi-artesanal do Queijo Serpa DOP.

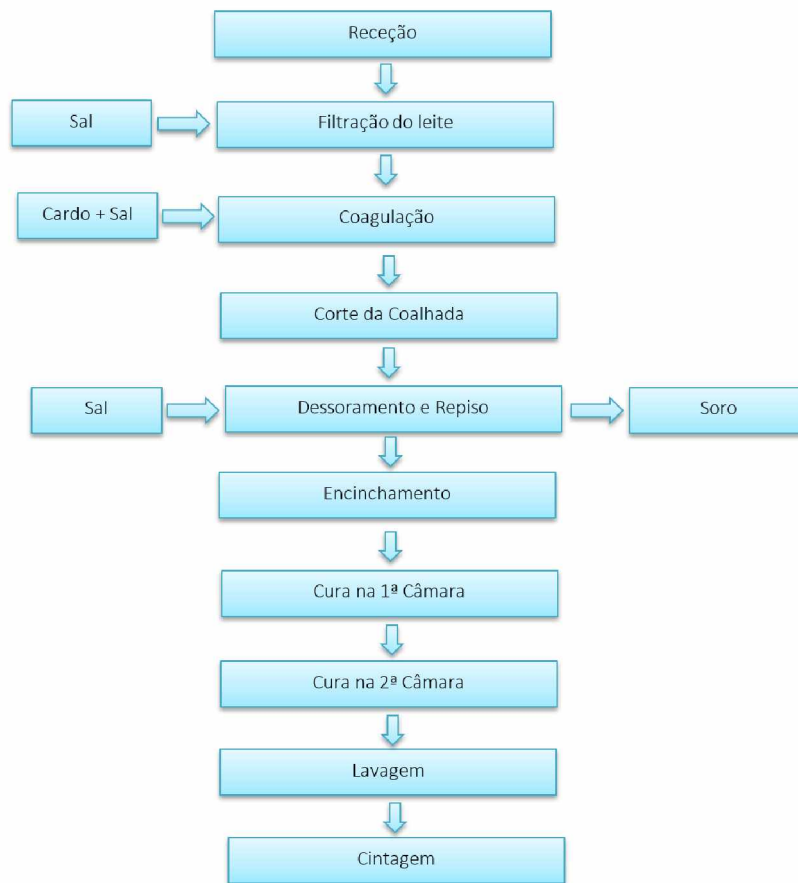


Figura 4 - Diagrama de fabrico semi-artesanal do Queijo Serpa DOP

O processo de ordenha é efetuado duas vezes por dia, uma de manhã e outra a tarde. As tecnologias atuais permitem ordenhar um maior número de ovelhas num menor espaço de tempo. O leite ordenhado passa normalmente diretamente dos feixes das tetinas, através de um circuito fechado, para um tanque de refrigeração, onde se mantém até ser encaminhado para a rouparia em recipientes de inox. Aí dá-se de imediato início ao processo de fabrico de queijo.

A primeira etapa é a filtração e consiste na passagem do leite por filtros de celulose ou por panos de algodão, “coadouros” (panos brancos de lã muito fortes) suspensos no topo do recipiente. A filtração tem como objetivo eliminar impurezas do leite. Numa das últimas passagens do leite pelos panos ou filtros é adicionado o sal, que é dissolvido e arrastado à medida que o leite vai passando.

Os roupeiros consideram a filtração, a operação mais importante, pois, no caso de não ser efetuada em condições adequadas, origina queijo de qualidade inferior, com maturação mais prolongada e outros defeitos, como por exemplo, centros duros, excesso de “olhos” ou fraturas na pasta.

Após a filtração o leite passa para o tanque de balanço de um pasteurizador, onde é submetido a um aquecimento ligeiro apenas até atingir a temperatura ideal para a coagulação (28º C - 30º C). É depois conduzido através de tubos inox para uma cuba onde se efetua a coalhada – cuba de coagulação (Bettencourt, *et al.*, 2008).

### 1.6.2. Coagulação

A coagulação dura geralmente 50 a 60 minutos e processa-se numa cuba de parede dupla. O aquecimento da coalhada é efetuado pela circulação de água entre as paredes da cuba e a manutenção da temperatura ideal de coagulação (aproximadamente 30° C) é controlada pelo roupeiro, através de regulação da fonte de calor.

A quantidade de coagulante utilizada (*Cynara Cardunculus L.*) depende da força do cardo, da qualidade do leite e da quantidade de sal utilizado. A forma e a intensidade com que o cardo é pisado influenciam o poder coagulante.

A preparação do cardo é efetuada de véspera. Consiste na “pisa” deste num almofariz com um pouco de sal, seguida do acondicionamento da massa resultante num recipiente com água, onde fica em infusão até ao dia seguinte. A massa é então coada através de um pano de algodão fino, de forma a evitar a passagem de partículas, e de seguida o líquido coado é adicionado ao leite. Simultaneamente é adicionado sal, em quantidade correspondente a 2/3 do total a adicionar (aproximadamente 13 g por 1L de leite) (Bettencourt, *et al.*, 2008).

### 1.6.3. Corte da coalhada

O corte da coalhada é feito para destruir o gel de caseína de forma a libertar o soro e facilitar as subsequentes operações de fabrico. Esta operação inicia-se ainda na cuba de coagulação sendo o corte efetuado de modo a ficarem nítidas uma fase sólida e uma fase líquida, a que se segue um repouso de 10 a 15 minutos.

De seguida, a coalhada é retirada da cuba e vertida na queijeira – mesa de aço inoxidável retangular, ligeiramente inclinada, para que o tampo fique também inclinado, e com uma abertura na extremidade mais baixa sob a qual se coloca um recipiente para recolha do soro que escorre. A coalhada é então acondicionada nos cinchos (formas cilíndricas) de grande diâmetro, perfurados e feitos de folha metálica que se encontram abertos no seu tamanho máximo. A queijeira e os cinchos são previamente passados por água quente, para a massa não arrefecer (Bettencourt, *et al.*, 2008).

### 1.6.4. Dessoramento e Repiso

Esta etapa, também chamada de esgotamento consiste em retirar o soro que está em excesso na massa. O roupeiro vai apertando a massa com as duas mãos, reduzindo pouco e pouco o diâmetro dos cinchos, tentando eliminar o máximo possível de soro. Este é recolhido no recipiente colocado para esse efeito sob a queijeira.

Esgotada a massa, o cincho é aberto e a coalhada espalhada pelo tampo da queijeira. No processo tradicional é nesta fase que se faz o repiso, ou seja, a massa é apertada entre as mãos do roupeiro para

que fique bastante macia e o mais desfeita possível. É na fase do repiso que é adicionado o restante sal que deve ficar bem misturado no seio de massa (Bettencourt, *et al.*, 2008).

Em queijarias semi-artesanais o dessoramento faz-se por meio de prensas hidráulicas verticais que comprimem a massa com a ajuda de grelhas metálicas perfuradas. À medida que se perde o soro e diminui o volume da coalhada na cuba, vai-se estreitando a distância entre as grelhas e exerce-se nova pressão sobre a coalhada até esgotar o soro que segue para o tanque de requeijão. A massa é depois cortada em cubos de peso adequado ao queijo que se quer fazer (Dias, 1998).

### 1.6.5. Encinchamento

O objetivo desta operação é compactar a massa, diminuindo os espaços de ar no seu interior e dar a forma final ao queijo, sendo a operação mais demorada no processo de fabrico.

A massa repisada é posta dentro dos cinchos até atingir cerca de 4 cm acima do seu limite superior. Os cinchos utilizados são geralmente fabricados em plástico ou em folha metálica e com orifícios de 1 a 2 mm de diâmetro na sua superfície, com o fim de auxiliar a saída de ar e de soro. A massa, até que fique pronta, é virada duas ou três vezes para que a pressão das mãos se exerça nos dois lados. É importante que a massa não arrefeça, pois iria dificultar a operação e alterar a textura da pasta.

No processo semi-artesanal a massa vem praticamente sem soro do passo anterior e é apenas colocada nos cinchos que são levados para a prensa hidráulica horizontal, sendo sujeitos a uma pressão de 3 kg/m<sup>2</sup> durante 4 a 5 horas (Bettencourt, *et al.*, 2008; Dias, 1998).

Antes de entrar na primeira câmara de cura o queijo fica a arrefecer durante cerca de 5 a 6 horas numa sala a 18° C – 20° C, de forma que o abaixamento da temperatura não seja muito brusco (Bettencourt, *et al.*, 2008).

### 1.6.6. Cura

As condições em que se realiza a cura ou maturação do Queijo Serpa são muito variáveis. Nas Regras de Produção do Agrupamento de Produtores do Queijo Serpa estão estabelecidas condições a respeitar nesta fase.

O tempo mínimo de cura é de 30 dias e, no caso de rebanhos onde se desconhece o estado sanitário relativo à brucelose, o tempo mínimo deverá ser de 45 dias. Este tempo de cura não está de acordo com o estabelecido pelo Regulamento (CE) Nº 1662/2006, que estabelece que o período mínimo de cura para queijos elaborados com leite cru deve ser de 2 meses (60 dias).

- Durante todo o período de cura, os queijos serão virados e lavados, numa frequência que depende do aspeto que for observado na crosta, que se deve manter lisa e limpa.



- O tempo de cura é muito variável de rouparia para rouparia, dependendo da altura do ano, do tamanho do queijo, avaliação do roupeiro e ainda a procura de mercado. De um modo geral, e para os meses de março e abril, a cura demora entre três a quatro semanas na segunda câmara, perfazendo um tempo de cura total de cinco a seis semanas.
- Passado o tempo de cura, o queijo é transportado para uma câmara de armazenamento onde fica até a sua expedição a uma temperatura de 0 a 5º C, humidade relativa de 77 a 83% e ventilação de 3 m/s.

### **1.6.7. Lavagem**

Este tipo de queijo cria uma camada viscosa de bolores à superfície da crosta, que deve ser retirada através da lavagem com água potável corrente, com o auxílio de uma escova limpa, utilizada única e exclusivamente para este efeito. A lavagem dos queijos deve ser feita sempre que necessário, após a formação da crosta, durante e após o processo de cura (Bettencourt, *et al.*, 2008).

### **1.6.8. Cintagem**

Uma vez que o Queijo Serpa é um queijo de pasta semi-mole com abaulamento lateral, este é cintado de forma a preservar as suas características físicas e prevenir deformações até ao momento do consumo (Bettencourt, *et al.*, 2008).

## **1.7. Microbiológico dos queijos artesanais**

### **1.7.1. Microflora do Leite cru**

A qualidade microbiológica e química do leite é um fator muito importante no fabrico do queijo, sobretudo quando são produzidos a partir do leite cru. pois vai ser a qualidade desta matéria prima a condicionar a qualidade do produto final.

Devido à sua composição, o leite é um excelente meio de desenvolvimento, reprodução, conservação e transmissão de muitos e variados grupos microbianos. Assim, apenas enquanto na parte superior do úbere de uma fêmea lactante saudável é normalmente considerado leite estéril, dada a ausência de fontes de contaminação nestas condições (Montel, *et al.*, 2014).

De resto, a composição microbiana do leite sofre alterações constantes, dada a dinâmica das operações de recolha a que o leite está sujeito, com contaminações de várias ordens provenientes do animal, do homem do equipamento e do meio ambiente. Até ao local de fabrico do queijo, o leite adquire a sua própria microbiota que pode resultar de uma contaminação adicional ou simplesmente do desenvolvimento da flora existente (Bettencourt, *et al.*, 2008; Montel *et al.*, 2014).

A flora microbiana natural do leite é constituída essencialmente por microrganismos, sobretudo bactérias lácticas e algumas leveduras, que têm um efeito benéfico no queijo, ou seja, são responsáveis pela formação do sabor e aroma característicos de cada queijo mas, por outro lado, o leite pode conter outros grupos microbianos que podem incluir bactérias e fungos responsáveis por defeitos físicos e sabores estranhos do queijo ou microrganismos patogénicas, como sejam as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, ou ainda bolores e leveduras, que, eventualmente, possam causar algum perigo para a saúde humana (Silva, 2011).

De uma maneira geral, independentemente do animal produtor em causa, o número de bactérias é sempre superior ao de fungos. Os grupos predominantes em leite de ovelha e cabra são as bactérias lácticas e as Enterobactérias e diferem dos do leite de vaca. No entanto, a variabilidade é bastante acentuada entre produtores enquanto que, para o mesmo produtor, se parece verificar essencialmente variabilidade entre estações do ano (Montel, *et al.*, 2014).

Contagens microbianas e tipos de microrganismos presentes em leite de diferentes animais são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Contagem microbiana e tipos de microrganismos presentes em leites de diferentes animais em log ufc/mL

| Grupos microbianos                                | Leite de Vaca<br>(log ufc/mL) | Leite de Cabra<br>(log ufc/mL) | Leite de Ovelha<br>(log ufc/mL) |
|---|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus spp and colyneform bacteria</i> | 2 - 3                         | 3                              | 2 - 4                           |
| <i>Lactococcus sp.</i>                            | 1 - 2                         | 2 - 3                          | 4                               |
| <i>Lactobacillus sp.</i>                          | 1 - 2                         | 2                              | 3 - 4                           |
| <i>Leuconostoc sp.</i>                            | 1 - 2                         | 2 - 3                          | 4 - 5                           |
| <i>Enterococcus sp.</i>                           | 1 - 2                         | 1 - 3                          | 3 - 5                           |
| <i>Propionic acid bacteria</i>                    | 1 - 2                         | ND                             | ND                              |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                         | 1                             | 5 - 6                          | 2 - 4                           |
| <i>Pseudomonas sp.</i>                            | 2 - 3                         | 1 - 2                          | 2 - 4                           |
| <i>Yeasts</i>                                     | 1 - 2                         | 1 - 2                          | 2 - 4                           |
| <i>Moulds</i>                                     | <1                            | <1                             | -                               |
| <i>Aerobic spores</i>                             | <1                            | <1                             | -                               |
| <i>Coliform bacteria</i>                          | <1                            | 2 - 3                          | -                               |

Fonte: Montel, *et al.*, (2014)

A higiene no momento da ordenha, o controlo das mamites, a qualidade e rapidez no processo de recolha do leite e os cuidados durante o fabrico do queijo são de extrema importância no controlo da presença de microrganismos indesejáveis, quer deteriorantes, quer patogénicos (Silva, 2011). Nos países industrializados, a partir dos anos 80 do século passado, a introdução das práticas de refrigeração e de limpeza e desinfeção de equipamentos e tetos do animal, contribuíram bastante para a melhoria da qualidade microbiológica do leite (Montel, *et al.*, 2014).

Apesar deste controlo, o leite cru exhibe normalmente uma diversidade microbiana substancial, com níveis que variam de acordo com as práticas de higiene e conservação utilizadas. Mais de 100 géneros e de 400 espécies foram identificadas entre a flora microbiana de leites crus. São essencialmente bactérias Gram negativas (>90 espécies), Bactérias Gram positivas e catalase positiva (> 90 espécies), bactérias lácticas (> 60 espécies), leveduras (>70 espécies) e até bolores (>40 espécies). As técnicas moleculares mais recentes permitiram identificar muitas mais espécies presentes para além das normais. Foram por exemplo identificadas bactérias Gram positivas alcalófilas e halófilas. Uma única amostra de leite pode conter tantas como 36 espécies microbianas dominantes (Montel, *et al.*, 2014).

A diversidade entre estirpes é também substancial, mas varia entre espécies e entre os produtores. Por exemplo, mais de 43 genótipos de *Lactococcus lactis* foram identificados em amostras de leite cru em França, com 1 a 11 genótipos por produtor. Algumas estirpes subsistem durante meses no leite de um determinado produtor, tornando assim possível relacionar uma microbiota láctea específica com um determinado produtor e identificar a origem de um leite, por exemplo (Montel, *et al.*, 2014).

As práticas de refrigeração do leite cru antes do fabrico do queijo podem, no entanto, alterar completamente o equilíbrio microbiano do leite cru, especialmente quando este não é processado diretamente no local de produção. É que nestas condições podem proliferar bactérias psicotrópicas naturalmente presentes no leite, podendo atingir níveis superiores às  $10^5$  ufc/mL. São sobretudo bactérias Gram negativas do género *Pseudomonas spp.*, mas também *Acinetobacter spp.* ou *Enterobacteriaceae* como *Hafnia alvei*, todas identificadas como causadoras de alterações do leite devido à sua actividade lipolítica e proteolítica. Estas contagens podem aumentar mais de 3 log ufc/mL após armazenamento do leite 3 dias a 8 °C ou 7 dias a 4 °C., alterando completamente o equilíbrio da flora natural do leite (Montel, *et al.*, 2014). A presença destes microrganismos no leite em concentrações de cerca de  $10^6$  ufc/mL, diminui o rendimento e a qualidade da coalhada (Ladenbach, *et al.*, 2009).

O leite cru utilizado no fabrico do queijo constitui quer uma fonte direta, quer uma fonte indireta de microrganismos do queijo, ao enriquecer todo o ambiente de produção queijeira com a sua microbiota. A diversidade do queijo está ligada à complexidade da microflora do leite cru.

Efetivamente a qualidade microbiológica de leite cru fornece informações quer sobre as condições sanitárias do produto, quer sobre a sua qualidade higiénica. A nível europeu o Regulamento (CE) nº 1662/2006, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, referentes a utilização de leite cru de espécies diferentes da vaca no fabrico de produtos feitos com leite cru por um processo que não inclua tratamento térmico, define como critério a contagem em placa a 30°C, uma contagem  $\leq 5,70 \log$  ufc/mL.

### 1.7.2. Microbiologia do queijo elaborado com leite cru

Uma das principais características dos queijos elaborados com leite cru é a diversidade microbiana em termos de géneros, espécies e até estirpes. Esta diversidade é reconhecida como responsável pelo desenvolvimento da especificidade organoléptica deste tipo de queijos. Estas características distintivas resultam não de fatores isolados, mas sim de um complexo sistema de interações entre vários fatores de biodiversidade, tal como, a alimentação dos animais, o uso de leite cru com a sua flora autóctone, tecnologia de fabrico, condições de cura, em conjunto com a aplicação dos conhecimentos práticos do queijeiro.

Cada processo de fabrico e cura de um queijo está sujeito a contaminações microbianas com diferentes origens e graus de intensidade. A flora inicial do queijo provem essencialmente da microflora do leite cru utilizado que é variável, mas irá aumentar à custa da flora do ambiente da queijaria. Tal irá refletir-se na qualidade microbiológica do queijo e nos fenómenos metabólicos que ocorrem durante o seu fabrico.

As espécies/estirpes presentes no leite podem sobreviver, desenvolver-se e tornarem-se até dominantes no processo de produção do queijo. Isto vai depender do seu potencial metabólico perante as diferentes condições ambientais a que vão estar sujeitas. Primeiro serão as condições do leite imediatamente antes do processamento já condicionado pelo ambiente da queijaria, depois a coalhada acidificada e sujeita à ação do coalho a determinada temperatura e, finalmente, as condições de maturação, com diferenças na concentração de sal, humidade relativa, temperatura, concentração de gases no ambiente envolvente, entre outras. Estas condições condicionam a dinâmica microbiana e proporcionam intensas e constantes modificações da microbiota presente ao longo do processo e inclusivamente entre o interior e a superfície do queijo (Montel, *et al.*, 2014).

No interior de queijos elaborados com leite cru as espécies dominantes diferem consoante o tempo de maturação e entre variedades de queijo, já que a composição físico-química e a estrutura da pasta varia consideravelmente entre este tipo de queijos (Montel *et al.*, 2014). No entanto, as bactérias lácticas são normalmente o grupo microbiano dominante, atingindo níveis de cerca de 8 - 9 log ufc/g no primeiro dia de produção e permanecendo dominantes até ao final da cura não obstante as alterações do equilíbrio entre espécies ao longo da maturação. Pelo menos 21 espécies abrangendo 7 géneros diferentes já foram identificadas neste tipo de produto (Beresford, *et al.*, 2001; Montel, *et al.*, 2014). Os géneros dominantes são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Entre estes as espécies mais frequentes são *Lactococcus lactis*, *S. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Montel, *et al.*, 2014).

As bactérias lácticas dominantes têm como principal função a produção de ácido durante a fermentação com a consequente diminuição do pH, essencial à formação da coalhada e inibição de microrganismos indesejáveis. No entanto, também participam no processo de cura devido sobretudo à sua ação

proteolítica e ainda no desenvolvimento dos aromas específicos por utilização dos aminoácidos (Beresford, *et al.*, 2001; Montel *et al.*, 2014; Alvarenga, 2008).

Montel, *et al.*, (2014) refere o grupo das Proteobactérias como o segundo mais importante em número, podendo atingir níveis tão elevados como 8 log ufc/g. Este grupo inclui géneros pertencentes ao grupo das Enterobactérias, como *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e *Hafnia alvei* mas também os géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Psychrobacter*. A contagem de Enterobactérias em particular, pode atingir os 6-7 log ufc/g nos primeiros dias de cura, mas de seguida começam a descer mais ou menos lentamente conforme o tipo de queijo (Coton, *et al.*, 2012; Tabla *et al.*, 2016). A mesma evolução foi observada para a presença de *E. coli* mas com concentrações iniciais inferiores (1-2 log ufc/g) e redução mais abrupta da sua concentração, podendo desaparecer entre os 30-60 dias de cura (Tabla, *et al.*, 2016). Este autor refere que ao longo da cura este grupo tende a tornar-se mais homogéneo, sendo dominado por *H. alvei* cerca dos 15 dias, no caso de queijos de ovelha elaborados com leite cru.

Apesar das Enterobactérias serem reconhecidas como constituintes naturais da microbiota deste tipo de produto, a sua presença gera alguma controvérsia por razões quer sanitárias, quer tecnológicas. Por um lado, dada a sua intensa atividade proteolítica e lipolítica, estão relacionadas com características específicas de queijos artesanais, nomeadamente na componente aromática (aumentam concentração de aldeídos, cetonas e compostos de enxofre). No entanto, esta atividade nem sempre é benéfica para o queijo. Adicionalmente este grupo integra potenciais patogénicos e a sua presença constitui motivo de preocupação. Estão relacionadas com contaminação fecal e por isso o nível desta contaminação é usado como indicador de higiene na produção em causa. Finalmente a produção de gás por muitas destas bactérias pode estar relacionada com defeitos precoces do queijo, nomeadamente excesso de olhos e destruição da estrutura por rebentamento e abertura de fissuras (Coton, *et al.*, 2012; Montel *et al.*, 2014; Tabla *et al.*, 2016).

Em menor proporção regista-se a presença na pasta, de bactérias do género *Staphylococcus*. É normal a presença de pelo menos quatro espécies e contagens da ordem dos 5 log ufc/g. Estudos recentes revelam que esta concentração pode aumentar em caso de existir uma contaminação elevada no leite e nas mãos dos manipuladores, chegando no produto final a 6-7 log ufc/g. A presença e o aumento da concentração deste microrganismo ao longo do fabrico deve-se ao facto de facilmente se fixar à matriz da coalhada e ao seu ótimo crescimento no leite (Rola *et al.*, 2016). Resultados de um trabalho em queijo de ovelha com leite cru em Portugal obtiveram-se concentrações deste grupo de 5,8 e de 6,0 log ufc/g, respetivamente na superfície e na pasta de queijos com 30 dias de cura (Soares *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2011). Neste trabalho as espécies identificadas foram *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. equorum*, *S. haemolyticus* e *S. caprae*. As predominantes foram *S. equorum* (32.7%) e *S. saprophyticus* (25.2%). Alguns estafilococos coagulase positive parecem ter importância tecnológica, nomeadamente, *S. xylosum*, *S. carnosus*, e *S. equorum*, no entanto, algumas

espécies deste grupo podem representar um risco médico a vários níveis inclusivamente intoxicações alimentares (Soares, *et al.*, 2011).

Em termos quantitativos seguem-se as bactérias do grupo *Clostridiales*. O grupo *Acrinobacteria* também tem sido detetado em concentrações de cerca de 4 log ufc/g, pertencentes a pelo menos 4 géneros, sendo os mais comuns *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Brevibacterium*. Outros procariontes considerados como populações menores, mas que por vezes foram identificados neste produto foram *Chryseobacterium* e *Prevotella* (Montel, *et al.*, 2014).

Os fungos, nomeadamente leveduras e bolores, embora com crescimento mais lento que as bactérias lácticas, são também importantes, especialmente na fase de maturação, devido à sua atividade lipolítica, proteolítica, fermentação da lactose residual e assimilação dos ácidos cítrico e láctico, o que contribui para o desenvolvimento do aroma e das propriedades reológicas do queijo (Pereira, *et al.*, 2000; Delamare, *et al.*, 2012; Padilla, *et al.*, 2014; Andrade, *et al.*, 2017). Pelas mesmas razões também podem contribuir para a deterioração do queijo (Pereira, *et al.*, 2000).

A ocorrência de leveduras nos queijos está normalmente associada a condições de baixos níveis de pH, baixos teores de humidade, elevada concentração de sal e temperaturas baixas. Estas encontram-se principalmente à superfície e surgem no queijo a partir de fonte diversificadas como o leite, o coalho, equipamento, salmoura entre outros (Padilla, *et al.*, 2014). *Debaryomyces hansenii* é a espécie de levedura dominante em muitos queijos, mas *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* são também encontradas. Outras espécies presentes no queijo são *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Padilla, *et al.*, 2014; Cardoso, *et al.*, 2015). A quantificação de leveduras na pasta queijos artesanais de ovelha elaborados com leite cru (queijo Évora) com 30 dias de cura foi de 6,4 log ufc/g (Pereira, *et al.*, 2000). No entanto estes autores referem valores de 7-8 log ufc/g em outros queijos.

Ao contrário da pasta, a superfície do queijo constitui um ecossistema muito diferente e mais aberto onde se pode observar uma maior diversidade de géneros e espécies, quer de eucariotas, quer procariontes. Efetivamente, leveduras, bolores e bactérias aeróbias como *Corynebacteriaceae* e *Micrococcaceae* encontram-se mais facilmente aqui que no interior do queijo. No caso das leveduras pode-se encontrar *Debaryomyces hansenii*, *G. candidum*, *Candida catenulata*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. *Firmicutes* (bactérias lácticas e estafilococos), *Actinobacteria* e *Proteobacteria*.

São as populações bacterianas codominantes a este nível, embora a sua proporção varie com o tipo de queijo. Muitos dos géneros presentes são semelhantes aos do interior do queijo. A este nível as leveduras e os bolores metabolizam o ácido láctico e produzem amónia o que faz elevar o pH de 4,8-5,2 para 6,0-8,2, o que facilita o desenvolvimento de bactérias sensíveis ao ácido, mas tolerantes ao sal (Montel, *et al.*, 2014).

### 1.7.3. Bactérias Lácticas a flora dominante do queijo

As bactérias lácticas constituem um grupo bastante diverso de microrganismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico (Axelsson, 2004). Podem ser agrupadas em homofermentativas e heretofermentativas, de acordo com os produtos da fermentação láctica. As homofermentativas produzem apenas ácido láctico a partir da glucose enquanto as heterofermentativas produzem entre outros dióxido de carbono, ácido acético, etanol e ácido láctico (Albuquerque, 2010).

São um grupo morfológicamente heterogéneo apresentando-se como cocos ou, bacilos que podem estar dispostos em cadeia ou individualmente. São Gram-positivas, não esporuladas e catalase negativa (Silva, 2011). São microrganismos quimiorganoheterotróficos com metabolismo exclusivamente fermentativo, sendo anaeróbios aerotolerantes. Deste grupo fazem parte os géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* (atualmente subdividido em *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Enterococcus*), *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Foram recentemente incluídos outros géneros como *Weissilla*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus* e *Carnobacterium* (Silva, 2011).

A maioria são mesófilas, embora existam também estirpes termófilas e, mais raramente, psicrófilas. Aquelas crescem num intervalo de temperaturas de 5 a 45°C. Têm a capacidade de crescer a pH de 3,8. Produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais benéficas para o queijo (Lima *et al.*, 2009).

A fermentação láctica, levada a cabo pelas bactérias lácticas é está na base da produção de muitos alimentos fermentados como queijo, couve, azeitonas e os pickles. As Bactérias Lácticas convertem os açúcares em ácido láctico, originando a diminuição do pH para valores próximos de 4 sendo esta a ação conservante primária das B.L., nos alimentos fermentados. Esta condição inibe o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, permitindo aumentar o período de conservação dos produtos (Veiga, 2012).

Por outro lado, no queijo, a diminuição do pH vai originar a desnaturação da caseína do leite por destabilização da sua estrutura e carga elétrica. Durante a cura do queijo as enzimas produzidas por estas bactérias vão desencadear os processos fermentativos que dão origem a modificações na pasta do queijo, desenvolvimento do sabor e aroma típico do respetivo queijo.

Contudo as bactérias lácticas produzem outras substâncias antimicrobianas em menor quantidade e incluem peróxido de hidrogénio, diacetilo, reutina e bacteriocinas. Estas últimas são substâncias com poder bactericida comprovado e que já têm muitas aplicações práticas, nomeadamente na conservação de alimentos, onde são utilizadas como aditivos conservantes em alguns produtos alimentares. É o caso da nisina utilizada na conservação de alguns produtos lácticos.

As bactérias lácticas envolvidas na produção de queijo dividem-se entre as dominantes, também designadas como iniciadoras ou “*starters*”, e as secundárias, também designadas culturas adjuvantes ou “*non starter*” (NSLB). As iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido e contribuem para o processo de cura, enquanto as secundárias geralmente estão envolvidas na definição das características sensoriais de um queijo. Estas últimas são normalmente mesófilas dos géneros *Lactobacillus* ou *Pediococcus* com tempos de geração longos no leite e pouco acidificantes (Veiga, 2012).

### Género *Lactobacillus*

O género *Lactobacillus* tem elevado nível de biodiversidade. Têm a forma de bacilos ou cocobacilos, são estritamente fermentativas, anaeróbias aerotolerantes, mesófilas, termófilas ou psicrófilas. São o género mais tolerante à acidez (até 3,2), o que lhe permite frequentemente terminar a fermentação dum produto. No leite iniciam o crescimento, preferencialmente, em pH próximo de 5,5–6,2, reduzindo-o para valores abaixo de 4,0 (Lacasse, 2000).

Os lactobacilos podem ser divididos em três grupos baseados no produto final de sua fermentação: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos, heterofermentativos obrigatórios. Os lactobacilos heterofermentativos obrigatórios estão associados à deterioração de alimentos, enquanto os outros, na sua produção (Lacasse, 2000).

Os lactobacilos homofermentativos obrigatórios utilizam apenas hexoses como fonte de carbono. Este grupo inclui por exemplo, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* e *Lactobacillus helveticus* (Fox *et al.*, 2000; Bruno *et al.* 2009).

Os lactobacilos heterofermentativos facultativos utilizam outras fontes de carbono além de hexoses, sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol e peróxido de hidrogénio. Este grupo inclui *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, que não são dominantes, mas sim associados à fermentação secundária, benéfica durante a cura do queijo, são as bactérias lácticas não iniciadoras (NSLB) muito comuns nos processos artesanais (Fox *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2009).

Os lactobacilos heterofermentativos obrigatórios, utilizam, obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono. Podem produzir sabores indesejáveis e gás durante a cura do queijo. Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*, que também não são dominantes ou “*starter*”. São detetados com menor frequência em queijos (Fox *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2009).

### Género *Lactococcus*

As bactérias lácticas do género *Lactococcus* são homofermentativas, com produção exclusiva de ácido láctico a partir de glucose. Em termos morfológicos apresentam-se na forma de células ovóides



individuais, aos pares ou em cadeia, não esporuladas e imóveis. Têm capacidade de crescer a 10 °C, mas não a mais de 45 °C (Lacasse, 1995). e um pH ótimo de 6,0–6,5, características normalmente usadas na sua identificação. A temperatura entre 20°C e 30°C, demoram entre 10 horas a 20 horas para fermentar o leite cru (Teuber, 1995). Os Lactococos são menos tolerantes ao sal do que a maioria das bactérias lácticas. (Lacasse, 1995).

Há 5 espécies que compõem este género: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* e *Lactococcus piscium*. Todas são utilizadas na indústria dos lacticínios como culturas de arranque. O mais utilizado é *Lactococcus lactis*, destacando-se como mais importantes, as subespécies *Lactococcus lactis subsp. Lactis* e *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* (Fox *et al.*, 2000). Por sua vez, a variante *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis* é capaz de converter citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (Bruno *et al.*, 2009).

Estas bactérias são geralmente predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa. A sua presença é mínima durante o processo de cura, podendo até desaparecer após seis a oito semanas.

### **Género *Leuconostoc***

O género *Leuconostoc* distingue-se das outras bactérias lácticas por serem cocos heterofermentativos, mesófilos. São anaeróbios facultativos, apresentando-se em forma de cocos ou de bastonetes ovais, frequentemente em cadeias curtas ou em pares (Embaló, 2014).

Desenvolvem-se principalmente durante o período de maturação dos queijos, tendo um crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20-30°C e pH ideal maior que 4,0. As duas espécies associadas aos produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides subsp. Lactis* (Fox *et al.*, 2000).

Apesar da sua fraca capacidade acidificante e proteolítica, *Leuconostoc spp.* é usado nos produtos lácteos, juntamente com *Lactococcus*, como microrganismo aromatizante. A produção de diacetil, dióxido de carbono e acetona a partir do citrato, é responsável pela qualidade organoléptica, consistência, textura e formação de olhos nos queijos (Bruno *et al.*, 2009). A sua presença estimula ainda o crescimento de *Lactococcus*. Algumas espécies produzem, em meios ricos em açúcar, o dextrano, um polissacarídeo que aumenta a viscosidade do produto fermentado (Lacasse, 1995).

Estirpes deste género podem ser utilizadas na indústria de lacticínios como culturas de arranque, no entanto encontram-se muitas vezes disseminados nas salas de ordenha e nas unidades de produção de lacticínios. A sua presença em leites fermentados de modo tradicional e de fermentação espontânea é frequente (Embaló, 2014).

## Género *Streptococcus spp.*

O género *Streptococcus* é representado por cocos Gram positivos que se agrupam em cadeias mais ou menos longas ou aos pares, e distinguem-se dos restantes cocos Gram positivos não lácticos por serem catalase e oxidase negativa. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo que algumas espécies se multiplicam mais rapidamente em atmosfera rica em dióxido de carbono (5 a 10%), imóveis e não esporulados, que fermentam a glucose com produção de ácido láctico e gás a 37°C, tolerantes ao sal (2,5%) e a pH 6,5 Podem crescer a temperaturas de 45°C.

*Streptococcus thermophilus* é a única espécie do género *Streptococcus* utilizada nas fermentações lácticas, sendo considerada a segunda mais importante cultura iniciadora industrial, depois das culturas de *Lactococcus lactis*. Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos. Apresenta a faculdade de fermentar um pequeno número de carboidratos, e possui atividade proteolítica limitada. (Bruno *et al.*, 2009).

Na fermentação láctica o papel de *S. thermophilus* está relacionado com a sua rápida conversão de lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabolitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (Bruno *et al.*, 2009).

*Streptococcus thermophilus* é tradicionalmente usado na produção de iogurte e de muitos queijos. No processamento de queijos, *S. thermophilus* pode ser usado como inóculo simples ou em combinação com alguns "starters" de lactobacilos ou mesofílicos, como inóculo composto. A vantagem do uso combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus spp.* é que os lactobacilos termofílicos desempenham o importante papel de utilizar a galactose, a qual não é utilizada pelo *S. thermophilus*. Dessa maneira, os lactobacilos termofílicos complementam a acidificação do queijo e reduzem o seu escurecimento, que ocorre quando ele é aquecido (Bruno *et al.*, 2009).

### 1.7.4. Segurança alimentar dos queijos elaborados com leite cru

Os queijos caracterizam-se por um conjunto de fatores intrínsecos que, mediante a sua combinação, contribuem para a conservação dos queijos e os tornam menos perecíveis que o leite, entre eles o pH baixo (inferior a 5,3), o teor de sal de 1,5 a 5,0% que reduz a atividade da água ( $a_w$ ) e o baixo potencial de oxidação redução. Adicionalmente o fator extrínseco baixa a temperatura de maturação que também contribui para esta estabilidade (ICMSF, 2006).

A grande quantidade e diversidade de microrganismos presentes no queijo também contribui para a inibição da proliferação de patogênicos. As bactérias lácticas, flora endógena principal deste tipo de queijos, são produtoras de compostos antimicrobianos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio, o que também contribui para segurança microbiológica do queijo (Yoon, *et al.*, 2016).

No entanto, entre os produtos que suscitam alguma discussão e preocupação quanto à sua segurança encontram-se os queijos elaborados com leite cru, classificados por alguns como alimentos de risco já que alguns surtos de toxinfecções alimentares foram associados ao consumo (Verraes *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2016). Efetivamente este tipo de alimento pode estar associado com a transmissão de doenças como a brucelose, a tuberculose, o botulismo e toxinfecções provocadas por *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* ou *Campylobacter*, estando os maiores receios relacionados com a possível transmissão de *Listeria monocytogenes* (Verraes *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2016; West, 2008). Por esta razão, crianças, idosos, pessoas com o sistema imunitário debilitado e especialmente as grávidas são aconselhadas a evitar o consumo deste tipo de produto (West, 2008; FDA, 2012; Verraes *et al.*, 2015)

Yoon (2016) conclui que a atividade antimicrobiana da flora natural deste tipo de queijo, sobretudo das bactérias lácticas, parece reduzir o risco microbiológico deste relativamente aos queijos que são feitos com leite pasteurizado. No entanto, esta atividade antagonista não é consistente, pois a microflora varia de acordo com a origem do queijo e nem todos os potenciais patogénicos contaminantes do queijo podem ser garantidamente inibidos, permanecendo alguns em níveis detetáveis. Este efeito também depende do tipo de patogénico presente e da sua concentração inicial. Por outro lado, a pasteurização destrói a flora prejudicial, mas também a benéfica e, além disso, podem resistir patogénicos esporulados como *Clostridium sp.*, que não necessitam competir com outras floras. A contaminação também se pode dar após o tratamento térmico.

O mesmo autor conclui que o risco microbiológico associado ao queijo pode sempre ser reduzido através da constante monitorização da higiene no ambiente de produção do leite e do queijo e dos locais de armazenamento e, se necessário, com um período de maturação de pelo menos 60 dias. Nos Estados Unidos, a lei 21 C.F.R. part. 133, de dezembro de 2015, restabelece um período mínimo de maturação de 60 dias para queijos elaborados com leite não pasteurizado com curas a temperaturas não inferiores a 1,7°C (35°F) (GPO, 2017; FDA, 2016). Este procedimento foi adotado por outros países.

Alguns autores argumentam que os 60 dias de cura podem não garantir a ausência de patogénicos, nomeadamente *L. monocytogenes*, no entanto, um estudo desenvolvido pela FDA entre 2014 e 2016 (FDA, 2016), conclui que o risco após este tempo é mínimo. E que para garantir a segurança dos consumidores basta identificar e monitorizar de forma mais rigorosa os produtores em que se detetem indicadores de falta de higiene e segurança (FDA, 2016).

Efetivamente a qualidade microbiológica de queijo elaborado com leite cru fornece informações quer sobre as condições sanitárias do produto, quer sobre a sua qualidade higiénica. A nível europeu o Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, define os critérios microbiológicos de segurança e higiene a que deve obedecer este produto. Os critérios microbiológicos referidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Critérios microbiológicos de segurança e higiene (regulamento (CE) nº 2073/2005)

| Critérios de Segurança                   |  |
|--|--|
| <i>Salmonella</i><br><i>Listeria</i>     | Ausência em 25g  |
| Critérios de Higiene                     |  |
| Estafilococos coagulase positiva (ufc/g) | m = 10 <sup>4</sup> ufc/g (4 log)<br>M = 10 <sup>5</sup> ufc/g (5 log) |

A União Europeia tem procurado alternativas para garantir a segurança dos consumidores sem exigir a pasteurização do leite o que descaracterizaria os queijos tradicionais. Nesse sentido implementou a obrigatoriedade de instalação do sistema preventivo HACCP (Regulamento (CE) Nº 852/2004 de 29 de abril) e monitorização de procedimentos de higiene, desde a alimentação e saúde do rebanho até às etapas finais de produção e distribuição e comercialização (Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de abril). Também o Regulamento Europeu nº 2074, de 2005, considera algumas derrogações para o que denomina “produtos alimentares que apresentam características tradicionais”. Entre essas, cabe mencionar: 1) as relacionadas com os locais em que os produtos tradicionais são expostos no caso de o ambiente contribuir para o desenvolvimento das suas características; 2) as medidas de limpeza e desinfecção dos locais de produção, que devem ser adaptados à atividade produtiva, de modo a considerar a flora existente no ambiente próprio da atividade produtiva; 3) as relacionadas com a natureza dos materiais que compõem os instrumentos e equipamentos utilizados especificamente para a preparação, embalagem e acondicionamento desses produtos (Cruz, *et al.*, 2014).

### 1.7.5. Grupos microbianos não lácticos utilizados na caracterização / controlo de produtos lácteos

#### Quantificação da Flora Mesófila Total

Ao fazer a avaliação da flora mesófila total, quantificam-se todos os microrganismos, bactérias, leveduras e bolores, que se desenvolvem em aerobiose a 30°C. É um parâmetro que serve para estimar a flora total, mas sem especificar tipos de microrganismos, sendo, portanto, indicador útil do estado microbiológico geral dos alimentos. No entanto, a qualidade higiénica de produtos fermentados não pode ser avaliada por este índice, uma vez que estes produtos são obtidos pela própria atividade dos microrganismos. Este é o caso dos queijos feitos com leite cru, onde esta contagem apenas nos dá uma ideia do grau de contaminação total do queijo, sendo normalmente utilizada, paralelamente a outras determinações, para estudos da evolução da flora normal dos queijos.

A HPA (2009) refere que esta contagem não se aplica normalmente como critério de higiene na avaliação de produtos fermentados como é o caso dos queijos elaborados com leite cru. No entanto, indica como valor de referência para avaliar a estabilidade de alimentos em que a flora principal são as bactérias láctica, um máximo de 8 log ufc/g, salvo se estes microrganismos foram adicionados como inóculo.

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores entre 8,24 e 8,86 log ufc/g, no que respeita à flora mesófila total por este microrganismo no final do tempo de cura (Canada, 2001 e Roseiro, 2003). Este parâmetro também é utilizado para avaliar a qualidade higiénica do leite cru que se destina ao fabrico de queijo com leite cru, cujo valor não deve ultrapassar as 5 log ufc/mL.

### **Família *Enterobacteriaceae***

Os elementos da família Enterobactérias são microrganismos de forma bacilar, Gram negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, móveis ou imóveis, que fermentam a glucose, reduzem nitratos a nitritos, são oxidase negativos e crescem em meios contendo sais biliares (Sánchez, 1999; Montel *et al.*, 2014).

A família das enterobactérias inclui os géneros fermentadores da lactose (lactose positivos), como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, e os não fermentadores da Lactose (lactose negativos), como *Shigella*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Erwinia*, e *Morganella* e ainda fermentadores de lactose variáveis como *Serratia* (Sánchez, 1999; Montel *et al.*, 2014). Nesta família incluem-se patogénicos responsáveis por toxinfecções alimentares como *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* e muitos patogénicos oportunistas.

Este índice é utilizado principalmente como indicador da qualidade higiénica dos alimentos pois, tendo em conta a possível origem fecal de elementos deste grupo, a presença de Enterobactérias em grandes quantidades, demonstra uma elaboração inadequada, uma contaminação posterior ao fabrico ou ambas, podendo estes alimentos constituir um risco alimentar (HPA, 2009). A HPA propõe para a contagem de enterobactérias como critério de higiene em alimentos prontos a consumir, o limite máximo de 4 log ufc/g. No entanto, refere que não é aplicável a queijos em que se utilizam culturas de *Hafnia alvei* ou *Proteus vulgaris* como inóculo, pois são Enterobactérias.

A maioria dos estudos sobre a microbiologia do queijo durante a maturação incluem a contagem de enterobactérias, coliformes e *E.coli*. Contagens altas de enterobactérias são normalmente encontradas nos queijos curados fabricados com leite cru de ovelha (Sánchez, 1999; Montel *et al.*, 2014).

O interesse na contagem de enterobactérias em queijos reside não só no facto de estarmos perante microrganismos enterotoxigénicos capazes de provocar doença, mas também por serem agentes de defeitos do queijo. Como já foi referido antes, considera-se atualmente que algumas estirpes podem ter efeitos benéficos no queijo.

A alteração conhecida como inchaço precoce que é acompanhada de um odor fecal, produzida normalmente nas primeiras 48 horas de fabrico dos queijos, está associada à falta de higiene na produção e à presença de enterobactérias. Esta alteração deve-se a uma produção excessiva de gás

durante a fermentação mista da lactose em que se produz ácido láctico, ácido acético, etanol e os gases dióxido de carbono e hidrogénio, e é produzida por espécies como *Enterobacter aerogenes* e *E.coli*, com a intervenção de outros microrganismos como leveduras e espécies do género *Bacillus*. Por outro lado, algumas espécies de *Enterobacteriaceae* psicrófilas possuem atividade proteolítica e lipolítica durante a refrigeração do leite, o que produz em alguns casos desestabilização na estrutura micelar das proteínas do leite (Sánchez, 1999).

As enterobactérias também têm sido associadas a outros defeitos nos queijos como o sabor amargo, odores frutados e a ranço, devido a sua atividade proteolítica e lipolítica (Sánchez, 1999)

*Escherichia coli* é uma bactéria desta família, que tem como principal habitat o intestino humano e de outros de sangue quente e é, em princípio inofensivo, mas pode tornar-se num patogénico oportunista, responsável por diferentes doenças infecciosas incluindo gastroenterites mais ou menos intensas (Lacasse, 1995). Existem estirpes entero-patogénicas, que se manifestam sob quatro formas: entero-invasiva, enteroxigénica, entero-patogénica e entero-hemorrágica (VTEC) (Lacasse, 1995).

É um microrganismo utilizado como indicador dada a sua origem fecal. A HPA (2009) refere como critério de higiene o valor máximo de 2 log ufc/g, mas salienta que não se aplica a queijos elaborados com leite cru onde se tem detetado em quantidade superior. Mas esta agência aponta este tipo de produto como dos mais implicados em surtos por *Escherichia coli* O157 e outras *E. coli* produtoras de verotocina (VTEC)(Yoon *et al.*, 2016) e, por isso, recomenda que estes queijos sejam periodicamente avaliados relativamente aos teores de *E coli* de forma a detetar qualquer evolução anormal. Desta forma, pode depois monitorizar-se a presença de estirpes patogénicas.

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores entre 2,50 e 4,54 log ufc/g, no que respeita à contaminação por este microrganismo no final do tempo de cura (Canada, 2001; Roseiro, 2003).

O género *Salmonella* também pertence à família *Enterobacteriaceae*, constituído por bacilos Gram negativos não esporulados, anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e capazes de utilizar o citrato como fonte de carbono. A maioria é móvel, apresentando flagelos peritricos, exceções feitas à *S. pullorum* e à *S. paratyphi* (Silva, 2011).

As bactérias do género *Salmonella* são patogénicas e responsáveis por um elevado número de surtos de toxinfecções alimentares. A doença é conhecida como salmonelose, e provoca diarreia, dor abdominal e febre, sintomas mais ou menos intensos conforme as estirpes implicadas. Estas manifestações iniciam-se de 12 a 72 horas após a infeção (Lacasse, 1995).

*Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado por longo período de tempo. A contaminação, deste e outros produtos, ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de

manipulação incorretas ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. A sua presença no alimento implica a rejeição de todo o lote de produto segundo a regulamentação europeia Reg. (CE) 2073, 2005 (Silva, 2011).

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores sempre negativos, isto é, ausência em 25g de amostra, condição exigida no regulamento europeu referido como critério de segurança (Amaral, 2001; Canada, 2001).

## Estafilococos

Os estafilococos são um grupo de bactérias pertencente ao género *Staphylococcus* família *Micrococcaceae*. São cocos Gram positivos que se organizam em agrupamentos irregulares em forma de cachos. Tem como habitat a glândula mamária dos bovinos e nasofaringe e pele do Homem e outros animais de sangue quente. Com pH ótimo 4,8-8,0, temperatura ótima 30°C-40°C, aeróbia facultativa, não produz esporos, todavia certas estirpes produzem enzimas (catalase, coagulase, hemolisinas) e também toxinas; tolera nitritos e concentrações acentuadas de cloreto de sódio (Lacasse, 1995).

A capacidade em produzir coagulase classifica as espécies em dois grupos: os estafilococos coagulase positiva, que inclui *S. aureus* e outros patogénicos produtores de enterotoxinas, responsáveis por intoxicações alimentares, e os estafilococos coagulase negativos, incluindo todas as demais espécies, normalmente inofensivos (HAP, 2009; Gomes, 2013).

Os estafilococos estão entre os microrganismos não esporulados mais resistentes. Resistem à desidratação, a temperatura e toleram os desinfetantes comuns melhor que a maioria das bactérias (Gomes, 2013). Muitas pessoas são portadoras de *S. aureus* e a contaminação dos alimentos ocorre muitas vezes por manipulação dos alimentos. Outro aspeto importante é que a enterotoxina responsável pela intoxicação alimentar é termorresistente, mas só é produzida com temperaturas acima de 10°C (HPA, 2009).

Nos queijos curados o nível de *S. aureus* atinge o valor máximo 2–3 dias após a produção, mas costuma descer significativamente ao longo da maturação. Níveis superiores a 5 log ufc/g em qualquer fase do tempo de vida útil de um alimento, são indicadores de possível presença de enterotoxina em quantidade suficiente para provocar intoxicação, e o lote de queijo deve ser testado relativamente à sua presença (HPA, 2009; Reg. (CE) Nº1441 de 2007). Esta toxina permanece no alimento ainda que o microrganismo produtor atinja números aceitáveis. Segundo o Regulamento CE Nº1441 de 2007, mesmo queijos com níveis entre 4 e 5 log ufc/g já são suspeitos, e os produtores devem ser monitorizados relativamente à qualidade das matérias primas que utilizam e à higiene do processo (HPA, 2009).

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores inferiores a 4 log ufc/g, no que respeita à contaminação por este microrganismo no final do tempo de cura (Canada, 2001; Roseiro, 2003, Olga, 1996).

### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica, com forma de bastonete Gram-positivo, pequeno, não esporulada nem capsulada, anaeróbia facultativa e móvel. Tolerar altas concentrações de cloreto de sódio, sobrevivendo a 25,5% de NaCl. Cresce a uma temperatura de 0,4 a 50°C com o crescimento ótimo a 30-37°C e um pH de crescimento de 5,6 a 9,6, com mínimo inferior a 4,0. A atividade de água ótima é superior a 0,97 (Lacasse, 1995).

Os animais doentes ou portadores parecem estar na origem da estirpe de *Listeria* patogénica para os seres humanos que, a partir da urina e dos excrementos, contaminam o ambiente. O leite das vacas que sofrem de listeriose pode conter a bactéria. A contaminação fecal humana (portadores sãos) pode também contribuir para a presença do germe nos alimentos (Lacasse, 1995).

A indústria dos laticínios, principalmente a dos queijos, tem sido associada a casos e surtos de listeriose em vários países. A contaminação dos queijos por *Listeria monocytogenes* tem sido associada, principalmente, ao leite usado no seu fabrico (cru ou pasteurizado inadequadamente) ou ao ambiente de processamento tendo assim, como principais vias de introdução o leite cru, o ar, os utensílios e equipamentos contaminados, os pisos e drenos da sala de produção, as prateleiras de madeira da sala de maturação, as botas e roupas dos trabalhadores, o sistema de ventilação, a água condensada e os carros de transporte e, ainda, operários ou visitantes doentes. Veiga, 2012 e HPA, 2009 refere os queijos macios ou moles como alimentos de alto risco.

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores sempre negativos, isto é, ausência em 25g de amostra, condição exigida no regulamento europeu referido como critério de segurança (Amaral, 1996; Canada, 2001).

### **Fungos**

Os bolores são os fungos pluricelulares, dotados de micélio verdadeiro, cujo crescimento nos alimentos e meios de cultura se identifica facilmente pelo aspeto filamentosos e algodonosos das colónias. De um modo geral, são organismos aeróbios. As leveduras são fungos unicelulares que crescem sob a forma de agregado de células independentes, que formam colónias mucosas semelhantes às de bactérias. As células podem ser ovóides, piriformes, alargadas ou quase cilíndricas. Nalguns casos, formam cadeias de células que se apresentam independentes (pseudo-micélio). A maioria das leveduras são anaeróbios facultativos (Ferreira, *et al.*, 2010).



Este grupo microbiano está muito associado a alimentos e, inclusivamente, são usados em numerosos processos industriais de fermentação, como sejam o fabrico do pão, cerveja, vinhos e determinados tipos de queijos (Ferreira, *et al.*, 2010). No entanto, a importância da avaliação da contaminação fúngica dos alimentos deve-se ao seu potencial de deterioração, mas também, no caso dos bolores, à sua capacidade de produzir substâncias tóxicas (micotoxinas) para o homem e outros animais. Esta análise é considerada como um índice das condições de higiene da matéria prima e da forma como foi manipulada durante o processamento, o seu significado assemelha-se ao parâmetro da contagem total de microrganismos a 30°C (Ferreira, *et al.*, 2010).

Trabalhos efetuados no âmbito da caracterização microbiológica de queijo Serpa referem valores entre 3,77 e 4,24 log ufc/g, no que respeita à contaminação por este grupo microbiano, no final do tempo de cura (Canada, 2001; Roseiro, 2003).

## **1.8. Potencial dos microrganismos na produção de queijo**

### **1.8.1. Utilização de “Starters” na produção de queijo**

A identificação de soluções para melhorar a vida e a saúde dos consumidores, fornecendo alimentos seguros e nutritivos, é uma das maiores preocupações atuais da indústria alimentar. Para esse fim, a fermentação, também chamada de biopreservação, é um método barato e amplamente acessível que atende à crescente procura do consumidor por produtos alimentícios minimamente processados / preservados. A bioconservação com bactérias lácticas (LAB) é de facto uma das formas mais antigas e altamente eficientes do método de processamento não térmico.

A produção de queijo baseia-se na capacidade do LAB de fermentar açúcares de modo a produzir ácido láctico e substâncias aromáticas que dão sabores característicos.

A produção de queijo resultava essencialmente do desenvolvimento da microflora naturalmente presente no leite e ambiente envolvente. A qualidade do produto final seria variável consoante estes fatores. Esta modalidade é ainda a mais utilizada para produzir muitos queijos artesanais de leite cru, nomeadamente os que têm o estatuto de DOP (Denominação de Origem Protegida), que são considerados uma importante fonte de diversidade genética de LAB, bem como crucial de um ponto de vista económico.

A cultura “starter” da fermentação natural é geralmente uma mistura de microflora mal conhecida que, apesar de possuir predominância de LAB, também pode conter microrganismos não LAB, e a sua diversidade e carga microbiana é geralmente variável ao longo do tempo. De fato, os estudos direcionados à caracterização de queijos tradicionais mostram que aqueles produzidos a partir de leite cru apresentam uma grande diversidade microbiana, sobretudo de bactérias lácticas, dependendo da região geográfica. Alguns destes microrganismos podem apresentar características tecnológicas

interessantes que, após otimização, possam ter aplicações industriais. Recentemente, isolados LAB de queijos tradicionais de leite cru português revelaram vários lactobacilos com atividade antibacteriana contra patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella newport* e até *E. coli*. Estudos futuros podem permitir usar esses isolados ou seus metabolitos, aplicados “*in situ*” ou “*ex situ*”, em aplicações onde a segurança alimentar é uma preocupação. Muitas outras aplicações podem ser interessantes (Kongo, 2013).

Para além das BAL dominantes os queijos tradicionais também obtêm a sua intensidade de sabor também a partir das bactérias lácticas não iniciadoras (NSLAB), que não fazem parte da flora inicial “*starter*”, mas que se desenvolvem no produto, particularmente durante a maturação, como flora secundária (Kongo, 2013).

As Bactérias Lácticas são importantes no processamento de queijo porque (i) aumentam a inocuidade dos alimentos através da libertação de ácido láctico e bacteriocinas, (ii) produzem aromas e sabor e aceleram o processo de maturação do queijo através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas, trazendo vantagens económicas para a indústria, (iii) produzem texturas alimentares desejáveis através da libertação de polissacáridos que aumentam a viscosidade e a firmeza e reduzem a suscetibilidade à sinerese, (iv) podem ser utilizados para administrar ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) e vitaminas, (v) as estirpes probióticas específicas contribuem para a libertação de péptidos bioativos que melhoram a saúde, melhorando a absorção no trato intestinal, estimulando o sistema imunitário, exercendo efeitos anti-hipertensivos, antitrombóticos ou funcionando como veículos para minerais.

A utilização de “*Starters*” pode constituir assim um desafio inovador dado o vasto leque de possíveis aplicações, não apenas para os produtos com leite cru, mas também para recuperação de sabores tradicionais quando se usa leite tratado termicamente.

Novos conhecimentos resultantes do uso de abordagens de Bioinformática, Biologia de Sistemas e Bioengenharia oferecerão perspectivas para a aplicação de uma nova geração de culturas “*starter*” para o fabrico de queijos, com características funcionais aprimoradas e oferecendo várias vantagens em saúde e tecnologia, contribuindo para o desenvolvimento das pequenas e médias empresas, por um lado, e a diversificação dos produtos das grandes empresas, por outro (Wouters, *et al.*, 2001).

No entanto, ainda há muitos desenvolvimentos a serem alcançados no sentido de realizar plenamente o potencial previsto das LAB ou dos seus produtos. Por exemplo, a extração e purificação de bacteriocinas são ainda difíceis uma vez que formam micelas ou agregados com as fontes de azoto no meio de crescimento. Por outro lado, enquanto a engenharia genética pode oferecer muitas soluções relacionadas com o uso ótimo de bactérias lácticas, elas podem não ser facilmente permitidas pela legislação alimentar (Wouters, *et al.*, 2001).

### 1.8.2. Produtos probióticos

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos não patogênicos, que quando ingeridos em determinadas concentrações, são considerados saudáveis para o organismo do hospedeiro. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*” (FAO) definem os probióticos como microrganismos vivos que, quando são administrados de forma adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Esta é a definição atual, internacionalmente aceita. Os probióticos consistem em bactérias ou leveduras reconhecidas como alimentos funcionais, que recolonizam e restauram a microbiota intestinal.

A maioria dos probióticos insere-se no grupo das bactérias lácticas. Os gêneros mais estudados e utilizados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Dentro do gênero *Lactobacillus*, as estirpes mais estudadas e aceites como probióticos são *L. acidophilus* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *Lb. ramosus* GG, *Lb. casei* shirota, *Lb. gasseri* ADH e *Lb. reuteri*. Os benefícios do seu consumo são o fortalecimento do sistema imunitário, a redução da atividade enzimática fecal, a prevenção de doenças intestinais e de diarreias virais, tratamento e prevenção de infecções, de inflamações gastrointestinais e controlo das infecções por *Helicobacter pylori*. Possuem efeitos benéficos ao nível do sistema imunitário e o controlo de agentes patogênicos por exclusão competitiva no intestino. Salienta-se também a sua atividade anticarcinogénica e o seu papel na redução do nível do colesterol. O gênero *Bifidobacterium*, *B. breve*, *B. longum* BB536 e o *B. lactis* Bb12, por sua vez, também contribui para o bom funcionamento do intestino, reduzindo o problema de irritação deste e podem ser utilizadas no tratamento de alergias, melhoram a diarreia provocada por agentes do rotavírus e diminuem a incidência da diarreia (Silva, 2011).

Diversas espécies de *Lactobacillus* têm revelado resistência ao stress causado “*in vivo*” e algumas estirpes apresentam boas propriedades tecnológicas, explicando assim o seu uso como probióticos. *Bifidobacterium* são também normalmente utilizados, embora menos que os lactobacilos. Estas são sensíveis à presença do oxigénio e apresentam mais requerimentos para o seu crescimento. Outras espécies probióticas, à exceção das propionibactérias e enterococos, não são normalmente usadas nos produtos fermentados, mas sim em suplementos dietéticos, sob a forma de cápsulas, comprimidos ou saquetas (Silva, 2011).

Os probióticos são normalmente usados numa grande variedade de produtos lácteos fermentados, como os iogurtes, leites fermentados, kefir, queijos, bebidas lácteas e gelados.

A utilização das bactérias lácticas como probióticos obedece a critérios, nomeadamente, exercerem um efeito benéfico sobre o hospedeiro; permanecerem viáveis durante a vida de prateleira do produto; suportarem o trânsito gastrointestinal; aderirem à mucosa intestinal e colonizarem o lúmen do trato; produzirem substâncias antimicrobianas e estabilizarem a microflora intestinal e, preferencialmente, estarem associadas a benefícios para a saúde (Silva, 2011). Para atuarem como probióticos têm ainda de

ter capacidade de resistir às condições ácidas do estômago e resistir aos ácidos biliares no início do intestino delgado. A resistência aos sais biliares pode variar entre as espécies de bactérias lácticas e até entre as estirpes da mesma espécie.

Alguns dos benefícios do consumo de probióticos para o hospedeiro são a melhoria do sistema intestinal e imunitário, redução de risco de determinados tipos de cancro, redução do pH intestinal, influencia positiva na microflora intestinal, tratamento e prevenção da diarreia aguda provocada por rotavírus, redução da amónia e de outros compostos tóxicos, redução do colesterol, melhoria do funcionamento intestinal, restauração da microflora intestinal normal depois de tratamento com antibióticos, simulação da resposta imune, aumento da tolerância e digestão à lactose e produção de vitamina B (ácido fólico) (Silva, 2011).

As bactérias lácticas têm a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e esporulados. O efeito antimicrobiano das bactérias lácticas é devido, principalmente, à produção de ácido láctico e de ácidos orgânicos, fazendo com que o pH do ambiente de crescimento diminua. O pH baixo induz a que os ácidos orgânicos se tornem lipossolúveis e que se difundam através da membrana celular para o citoplasma (Silva, 2011).

Este grupo bacteriano também produz acetaldeído, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetilo, polissacarídeos e bacteriocinas, os quais podem atuar como agentes antimicrobianos (Silva, 2011).

A dose necessária para obter efeitos benéficos para a saúde varia com o tipo e a quantidade de células viáveis até ao final da vida útil do produto; a dose ingerida; as características do alimento onde foram inoculados os microrganismos e com as características do hospedeiro. A concentração mínima de bactérias lácticas no intestino para promover um efeito protetor é da ordem de  $10^9$  ufc, sendo fundamental uma ingestão regular destes agentes para se conseguir este teor (Silva, 2011).

## **1.9. Propriedades Físicas**

### **1.9.1. Cor**

A cor é uma característica muito importante dos alimentos funcionando, principalmente, como o primeiro índice de qualidade. A cor dos produtos lácteos tem origem, principalmente, em pigmentos lipossolúveis, os carotenoides, obtidos a partir da dieta animal, uma vez que os animais não os sintetizam (Moreira, 2011).

Os carotenoides, pigmentos secundários envolvidos na fotossíntese, são utilizados como pró-vitamina A e armazenados nos tecidos animais, sendo a cor amarelada dependente do teor absorvido de pigmentos. No caso das vacas, estes pigmentos podem ser transferidos do tecido adiposo para o leite, permitindo

que os seus produtos sejam mais amarelos que os de cabra e ovelha, que são mais brancos. A cor amarelada do queijo feito a partir do leite de vaca pode tornar, por isso, o produto menos aceitável (Moreira, 2011).

Os produtos lácteos são expostos à luz natural ou artificial, durante o processamento, distribuição, embalagem, bem como, ao nível do retalho. A exposição à luz induz a degradação de lípidos, proteínas e vitaminas, causando a mudança de cor, que prejudica a qualidade dos produtos e a sua comercialização (Moreira, 2011)

A avaliação da cor instrumental no interior da pasta e da crosta do queijo é feita utilizando o sistema de coordenadas *CIELab* definido pela “*Commission Internationale de L'éclairage*” – “*CIE 1976 L\*a\*b\* Uniform Colour Space*”. A coordenada  $L^*$  mede a luminosidade claro (100%) e escuro (0%), a coordenada  $a^*$  mede a tonalidade vermelha (+60) e verde (-60) e a coordenada  $b^*$  mede as tonalidades amarela (+60) e azul (-60) (Alvarenga, 2000).

Ao longo da cura os valores do parâmetro  $L^*$  e  $a^*$  vão diminuindo, enquanto que os valores de  $b^*$  vão aumentando, o que significa que, com o desenvolvimento da cura, a pasta torna-se um pouco mais escura, mais esverdeada e mais amarela. O desenvolvimento de algumas bactérias, durante a cura, pode ter um papel muito importante na produção de pigmentos que podem ir do amarelado ao vermelho. Por outro lado, os parâmetros cromáticos podem ser influenciados pela composição em gordura, por exemplo, queijos com maior teor de gordura apresentam-se mais amarelos e menos avermelhados do que queijos com menores teores de gordura (Alvarenga, 2008).

### 1.9.2. Textura

A textura é uma propriedade extremamente complexa, constituída por diferentes parâmetros interrelacionados entre si. A textura representa um papel fundamental na aceitação dos alimentos pelos consumidores e, em particular nos queijos. É um dos atributos mais importantes na determinação da identidade do produto e na preferência dos consumidores (Moreira, 2011).

Bourne (1982) definiu textura como um conjunto de propriedades físicas que deriva da estrutura dos alimentos, tem o seu lugar próprio dentro das propriedades físicas do alimento, é sentida pela perceção ao toque na boca, mãos ou outras partes do corpo, não está relacionada com as sensações químicas de aroma e sabor e a sua medição objetiva faz-se recorrendo a funções de massa, distância e tempo. A textura do queijo é condicionada pelo pH e pela razão entre a caseína e a humidade (Alvarenga, 2008).

A Organização Internacional de Normalização (ISO 5492, 1992) define textura como o conjunto das propriedades reológicas e atributos estruturais de um alimento percebido por meios mecânicos, tácteis e, quando apropriados, os recetores auditivos e visuais.

As características de textura sofrem modificações significativas ao longo da maturação devido ao desenvolvimento e atividade microbiana, a diminuição da  $a_w$ , atividade enzimática, redistribuição do sal, alterações do pH e produção de ácido láctico.

Na determinação de perfil de textura usa-se o texturómetro “*Texture Analyser Model TAHDi®*” (Stable Micro Systems). O teste de perfil de textura (TPA) é um teste imitativo, caracterizado por duas penetrações na amostra com uma pausa entre elas, simulando a ação de duas dentadas no alimento sendo, também, designado como o teste das duas dentadas.

Através destes testes são obtidos gráficos força/tempo onde se calcula os parâmetros como a dureza (N), adesividade (-N.mm), coesividade (adimensional), Elasticidade (adimensional), Gomosidade e a Mastigabilidade (Alvarenga, 2008).

O parâmetro mais importante da textura, no que diz respeito às preferências dos consumidores, é a dureza. A dureza aumenta com o teor de proteína e pH, mas elevados teores de água provocam a sua diminuição, bem como, o aumento do teor de sal no queijo (Alvarenga, 2000).

## 1.10. Propriedades Químicas

### 1.10.1. Atividade da água ( $a_w$ )

O desenvolvimento microbiano ocorre apenas na presença de água. O parâmetro que dá indicação sobre a quantidade de água disponível para o crescimento microbiano é designado por atividade da água ( $a_w$ ). Os valores da atividade da água variam entre 0 e 1 (água pura). A adição de substâncias aos alimentos diminui o valor deste parâmetro. Quanto mais baixo for o valor da atividade da água maior a segurança do produto. O leite tem uma grande percentagem de água (88 - 89%) na sua composição. Este nível corresponde a uma elevada quantidade de água disponível, o que contribui para que o leite seja um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos. A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação em meios com reduzida atividade da água varia conforme os microrganismos. Considerando que há exceções, os principais grupos de microrganismos apresentam os seguintes valores de atividades de água, como mínimos para o seu desenvolvimento: > Maioria das bactérias: 0,90 – 0,91 > Maioria das leveduras: 0,87 – 0,94 > Maioria dos bolores: 0,70 – 0,80 (Alvarenga, 2008).

Os queijos com maior atividade da água apresentam uma maior tendência para se deteriorarem ou para suportarem o crescimento de bactérias patogénicas uma vez que, quanto a este aspeto, constituem um meio de cultivo mais favorável para os microrganismos do que os queijos com atividade da água mais baixa. A atividade da água vai decrescendo quando passamos de um queijo de pasta mole (0,95) para um queijo de pasta dura (0,85), fator que reforça a proteção do produto contra a presença de microrganismos (Tabela 6). Nos queijos com baixa atividade da água crescem preferencialmente leveduras e fungos (Alvarenga, 2008).

Tabela 6 – Valores mínimos aproximados da atividade da água para vários microrganismos patogênicos relevantes para o queijo.

| Microrganismos Patogênicos     | Atividade da água ( $a_w$ ) (%) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | 0,92                            |
| <i>Salmonella spp.</i>         | 0,95                            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 0,86                            |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0,95                            |
| <i>Escherichia coli</i>        | 0,95                            |

A atividade da água é considerada um fator de segurança importante; quanto mais baixo for o seu valor maior será a estabilidade microbiológica do produto.

A atividade da água dos queijos tem valores próximos de 0,960 em queijos produzidos na primavera e de valores próximos de 0,965 em queijos produzidos no inverno (Canada, 2001).

### 1.10.2. pH

O pH tem importância decisiva nas propriedades texturais do queijo, devido ao seu efeito na estrutura das caseínas, quer através de alterações provocadas na carga, quer a partir da desmineralização que pode ocorrer por ação de uma diminuição do pH (Alvarenga, 2008).

Na monitorização do pH ao longo da maturação, observa-se uma fase inicial de diminuição do pH, correspondente ao consumo da lactose e produção de ácido láctico pela ação do crescimento das bactérias ácido-lácticas e uma fase final da cura, em que se verifica um aumento de pH, atribuído à utilização do ácido láctico com formação de produtos neutros ou alcalinos (Alvarenga, 2008).

O abaixamento de pH observado na fase inicial da cura é mais evidente em queijos obtidos a partir de leite cru do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado, no entanto, quando se combina a utilização de bactérias de arranque em leite cru, a descida de pH é ainda mais evidente (Alvarenga, 2008).

O pH é uma característica importante durante o processo de produção e o seu valor final indica como decorreu o processo, e se há ou não ausência de defeitos, como uma elevada acidez. Estudos feitos por Roseiro et al. (2003) referem valores médios de pH próximo de 5,2 e 5,8 em amostras de Queijo Serpa com 30 dias de cura, monitorizado a 20°C. Amaral (1996) refere valores médios de pH de 5,67, Alvarenga (2008) refere valores médios de 5,7 e Canada (2001) refere valores entre 5,63 e 5,68.

### 1.10.3. Humidade

A humidade final da maioria dos queijos curados é condicionada pela taxa e a duração da sinérese e pela compactação da estrutura de caseína. Após a coagulação, os processos que se seguem, como moldagem,

prensagem e salga, que diferem conforme o tipo de queijo, são acompanhados por um abaixamento de pH e originam uma perda de humidade considerável, através da remoção do soro.

A variação do teor da humidade no queijo ao longo da maturação está relacionado com o valor do pH, da população microbiana do queijo, da temperatura e do tempo de maturação, do teor de sal. O teor de humidade e sal no queijo determinam a ação dos microrganismos na degradação dos compostos do queijo contribuindo para a aparência externa, a textura e as propriedades organolépticas do produto final. (Rebello, 1994).

O teor de humidade referida ao queijo isento de gordura (HQIG) é usado para classificar queijos quanto à consistência, existindo diversas classificações, com diferentes classes (Alvarenga, 2008). Na tabela 7 classifica os queijos quanto a consistência expresso em %, de acordo com a Portaria 73/90 (DR 1990) (DR, 1990).

Tabela 7 – Classificação do queijo segundo a sua consistência

| Tipo de queijo | Teor de Humidade isento de gordura (HQIG) |
|----------------|---|
| Extra Duro     | HQIG < 51%                                |
| Duro           | 49% < HQIG < 56%                          |
| Semiduro       | 54% < HQIG < 63%                          |
| Semi mole      | 61% < HQIG < 69%                          |
| Mole           | HQIG > 67%.                               |

A Humidade apresenta valores médios entre os 40,3 e 56,3% em amostras de queijo Serpa com 30 dias de cura (Bettencourt, *et al.*, 2008).

#### 1.10.4. Gordura

A gordura tem influência fundamental no desenvolvimento das características texturais e na formação de aroma (Canada, 2001). A gordura encontra-se no queijo sob a forma de glóbulos gordos, estes têm dimensões elevadas relativamente às micelas, a gordura é aprisionada durante a formação da matriz proteica que ocorre durante o processo de coagulação.

Uma matriz proteica com menor quantidade de glóbulos gordos contribui para uma textura mais dura ou com propriedades mais elásticas. Uma matriz proteica com grande quantidade de glóbulos gordos, contribui para uma textura mais macia e homogénea.

Quanto à participação da gordura na formação do aroma do queijo, a gordura do leite caracteriza-se por ter uma elevada concentração de ácidos gordos de cadeia curta que, no decurso da maturação, podem ser libertados por ação da lipólise condicionando fortemente o aroma do queijo. A lipólise é catalisada por enzimas lipolíticas que são libertadas pelos microrganismos contaminantes gram-negativos negativos (Alvarenga, 2008).



A influência da gordura na produção do aroma característico dos queijos depende de fatores com o tipo de queijo, bem como a alimentação e o período de lactação, devido à influência que estes fatores podem ter na composição da fração gorda nos diferentes ácidos gordos (Alvarenga, 2008). Na Tabela 8 estão classificados os queijos quanto ao teor de gordura referida ao resíduo seco, expresso em %, de acordo com a Portaria 73/90 (DR 1990).

Tabela 8 – Classificação dos queijos quanto ao teor de gordura referida ao resíduo seco (GRS).

| Tipo de queijo | % Gordura (Resíduo Seco) |
|----------------|--------------------------|
| Extra Gordo    | GRS > 60%                |
| Gordo          | 45% < GRS < 60%          |
| Meio Gordo     | 25% < GRS < 45%          |
| Pouco Gordo    | 10% < GRS < 25%          |
| Magro          | GRS < 10%                |

Para a gordura são referidos valores entre os 51,0 e 58,0% em queijo Serpa com 30 dias de cura (Roseiro, et al., 2003).

### 1.10.5. Cloretos

O teor de NaCl é um parâmetro estatisticamente significativo para todas as características microbiológicas e físico-químicas devido à sua capacidade de reduzir a atividade da água, a qual afeta o desenvolvimento microbiano (Canada, 2001). Assim, o sal atua como conservante e contribui, diretamente, para o sabor e qualidade.

A adição de sal não modifica a composição bruta dos queijos, mas, em qualquer variedade, há uma relação inversa entre os níveis de sal e humidade; concentrações elevadas de sal são associadas ao aumento dos níveis de gordura e proteína, devido à perda de água. Quando se relacionam os níveis de gordura e humidade, estes apresentam uma proporção inversa. As concentrações de ácido láctico, lactose e o pH do queijo dependem da atividade da cultura “*starter*” e, conseqüentemente, do conteúdo de sal (Moreira, 2011).

As variações na concentração de sal também são utilizadas para controlo da maturação, a qual é retardada quando o sal está presente em elevadas concentrações, uma vez que tem um efeito inibidor sobre as enzimas. As baixas concentrações de sal são inconvenientes, pois a atividade enzimática é excessiva ou desequilibrada, produzindo compostos de aromas indesejáveis, como a amargura (Moreira, 2011).

### 1.10.6. Acidez total

A acidificação do leite é o passo fundamental na fabricação do queijo, ela é essencial para o desenvolvimento do sabor e da textura. Ela promove a coagulação e a redução do pH inibindo a multiplicação de agentes patogênicos e deteriorantes. A acidificação é normalmente obtida a partir da

fermentação da lactose pelas culturas iniciadoras bacterianas presentes no fermento láctico, produzindo ácido láctico.

A acidificação é proporcionada pela fermentação da lactose para ácido láctico pelas bactérias lácticas adicionadas ao leite ou pela acidificação direta com adição de ácido láctico em alguns casos.

#### **1.10.7. Azoto total**

A caseína, durante o processo de coagulação, é incorporada na matriz proteica em seguida, no processo de cura vai-se transformando em péptidos cada vez mais pequenos até se formar aminoácidos e outros produtos do processo de proteólise. O estudo da proteólise envolve, muitas vezes, a determinação de frações azotadas, como o azoto solúvel em água. O azoto não proteico e o azoto aminoácido, que correspondem à percentagem de cada um destes componentes azotados em relação ao azoto total. Para a proteína bruta são referidos valores entre os 22,0 e 34,1% em queijo Serpa (Alvarenga, 2008)

#### **1.10.8. Azoto solúvel em água**

A fração de azoto solúvel em água (NSA) é normalmente encarada como um indicador de maturação e aumenta durante a cura. O coeficiente de maturação relaciona o azoto solúvel com o azoto total e relaciona as proteínas do soro e os produtos da hidrólise das caseínas, dos péptidos de elevado e baixo peso molecular e dos aminoácidos.

Esta fração é definida como a extensão da proteólise uma vez que apenas tem capacidade de medir a composição em frações peptídicas solúveis em água, independentemente da dimensão destas. Os valores de NSA aumentam ao longo da cura, sendo mais pronunciado em queijos obtidos com coalho animal do que queijos em obtidos com coalho vegetal. A qualidade de um queijo está associada ao seu coeficiente de maturação. (Alvarenga, 2008). O valor do coeficiente de maturação característico de um queijo Serpa de boa qualidade é de 46,4% (Bettencourt, *et al.*, 2008). Outros estudos realizados (Amaral, 1996) (Canada, 2001) referem valores médios de coeficiente de maturação entre os 12,4 e os 34,6% para queijo Serpa com 40 dias de cura.

#### **1.10.9. Lactose**

A concentração da Lactose no leite é muito dependente da fase da lactação em que se encontram as ovelhas. O aumento ou diminuição da lactose no leite ou na coalhada pouca interferência tem no teor da lactose no queijo fresco, face à pequena percentagem de lactose residual (0,8 a 1,5%) que fica retida na massa. A taxa de degradação da lactose depende fundamentalmente da relação sal/humidade no queijo, influenciando deste modo a estirpe da flora presente, condicionando o pH e os fenómenos bioquímicos que têm lugar durante a maturação. Tem provavelmente pouco impacto no sabor do queijo, embora, a

produção de compostos metabólicos, contribuam para a textura e/ou sabor de algumas variedades de queijo (Bettencourt, *et al.*, 2008).

O principal açúcar do leite é a Lactose, que é o composto da matéria seca total. É sintetizado da glicose na glândula mamária, com a participação ativa da  $\alpha$ -lactoalbumina, proteína do leite. É um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e galactose, que podem estar presentes em pequenas quantidades livres.

### 1.11. Análise Sensorial

A análise sensorial é definida segundo o *Institute of Food Technologists* (IFT) como um método científico usado para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (IFT, 1981); ou exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos (ISO 6658:2005).

Segundo a Norma Portuguesa (NP 4263, 1994) a Análise Sensorial ou Exame Organolético pode definir-se como o exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos, onde, organolética é definida como “quantifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”.

A finalidade da avaliação sensorial é traduzir as preferências dos consumidores em atributos bem definidos para um determinado produto. A análise sensorial deve comparar e examinar as características sensoriais de alimentos distintos com o objetivo de estabelecer os seus aspetos positivos e negativos, desta maneira, o fabricante poderá potenciar os primeiros e eliminar dentro dos possíveis os segundos até obter um produto adaptado às exigências dos consumidores (Canada, 2001).

A análise sensorial em queijos tem como principais objetivos avaliar a sua qualidade, caracterizar queijos durante o desenvolvimento do produto e testar a sua aceitação no consumidor. No entanto, nem sempre as características desejadas pelos consumidores se correlacionam com as avaliadas pelos provadores treinados (Moreira, 2011).

Para determinar o perfil sensorial de um queijo, bem como, a influência de mudanças individuais durante o processamento nas características sensoriais, o método mais adequado é o de análise descritiva. Esta análise consiste na quantificação e intensidade de diferentes descritores, nomeadamente, a identificação de sabores, aromas texturas, entre outras qualidades (Moreira, 2011).

Esta análise deve ser realizada por um painel de provadores apto para descrever as características do queijo e quantificar os atributos sensoriais de forma adequada, sendo capazes de marcar individualmente a intensidade de cada característica, numa escala linear com um extremo inferior e outro superior. Para atingir um bom nível de objetividade e reprodutibilidade, é necessário um treino intensivo dos

provadores com diversos tipos de queijos, isto é, sujeitos a diferentes processamentos, matérias –primas, fases de maturação, entre outros. Desta forma, é possível o desenvolvimento de produtos inovadores. A análise sensorial torna-se mais eficaz quando se valida as relações entre as propriedades sensoriais e químicas, através de medições instrumentais e preferência dos consumidores. A determinação destas relações é uma das aplicações mais importantes, uma vez que este conhecimento pode ser utilizado por investigadores, na área da tecnologia, microbiologia e química. Por exemplo, ao ser conhecida a composição desejada pelos consumidores, o processo de fabrico pode ser otimizado de forma a obter as características pretendidas (Moreira, 2011).

## 2. Metodologias

### 2.1. Análises microbiológicas

#### 2.1.1. Amostragem

As amostras analisadas foram obtidas em 3 produtores de queijo Serpa com denominação de origem protegida (DOP) nos moldes do Regulamento (CEE) nº 2081/92, Despacho nº 52/94 de 15/2 e também foram recolhidos quatro queijos sem denominação de origem protegida em duas queijarias da região. Os queijos foram produzidos segundo o protocolo de produção tradicional que exclui a adição de “*starter*” de bactérias lácticas, tal como estabelecido no caderno de especificações do produto. As queijarias de origem estão localizadas na área de região demarcada constante no Decreto Regulamentar nº 39/87 de 29/6.

Em cada produtor de queijos DOP foram recolhidas em tempos distintos, em condições de assepsia e para recipientes esterilizados, três amostras de leite e duas amostras de queijo Serpa DOP com 30 dias de maturação (tempo mínimo de maturação), em duas épocas do ano, Primavera e Inverno. Em cada um dos produtores não certificados, foram recolhidos dois queijos na época da primavera, perfazendo entre todos um total de dezasseis queijos de lotes distintos e dezoito leites de diferentes fabricos. No caso dos queijos, cada amostra era constituída por duas unidades, uma para as análises microbiológicas e físico-químicas e outra para análise sensorial.

As amostras foram transportadas a cerca 4°C numa geleira portátil e foram mantidas no laboratório nas mesmas condições até ao momento da análise que ocorreu sempre até às 24 horas seguintes.

Cada unidade de amostra, constituída pelo leite (frascos) e queijo intacto foi dividida em 4 partes iguais sendo duas delas congeladas (-80°C) e as outras utilizadas para caracterização microbiológica e físico-química. A segunda unidade de cada lote de queijo foi utilizada na análise sensorial.

#### 2.1.2. Análises microbiológicas

##### Preparação da amostra

No laboratório, em condições de assepsia, foram pesadas 20g de cada queijo e foram homogeneizadas em 180 mL de solução de citrato de sódio (GPR) (2%, w/v) esterilizado através da utilização do “*Stomacher*” (400 *Circulator*) durante 3 minutos. No leite, foram medidos 10 mL de leite e foram homogeneizados num frasco esterilizado com 90 mL de Ringer (*Oxoid-BR0052G*) esterilizado. Ficou-se desta forma com as diluições  $10^{-1}$ .

Paralelamente, pesou-se 25g de queijo e mediu-se 25 mL de leite, a que se adicionaram 225 mL de *Caldo Half Fraser (CM0895 OXOID)* para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e 225 mL do meio de enriquecimento não seletivo (*Água Peptonada Tamponada – CM1049 OXOID*) para a pesquisa de *Salmonella*. As amostras foram colocadas em sacos estéreis (*Alempack PA/PE 3 SOLD.*) e levou-se a homogeneizar no *Stomacher (400 Circulator)* durante 3 minutos a 45°C. A amostra foi passada dos sacos para frasco esterilizados e foi a incubar. O *Caldo Half Fraser* foi a incubar a 30°C/24 horas e a *Água Peptonada Tamponada* foi incubada a 37°C/24 horas.

### Preparação das diluições

As diluições decimais foram realizadas conforme a técnica descrita na NP 3005:1985.

A partir da diluição mãe ( $10^{-1}$ ) foi transferido 1 mL de amostra para um tubo de ensaio contendo 9 mL de *Ringer (Oxoid-BR0052G)* esterilizado obtendo-se a diluição ( $10^{-2}$ ) que se homogeneizou no vortex. Foram efetuadas mais 6 diluições decimais ( $10^{-2}$  –  $10^7$ ).

#### 2.1.3. Contagem de Microrganismos a 30°C (NP 4405:2002)

Para a contagem de microrganismos a 30°C foi utilizada a Norma NP 4405:2002. A partir das diluições decimais foi transferido 1,0 mL de inóculo para cada uma de duas caixas de Petri esterilizadas, foi utilizado o método da contagem em placa pela técnica de incorporação, sendo adicionado a cada uma das placas o meio de cultura, *Plate Count Agar - PCA (Oxoid CM0325)*, previamente fundido e arrefecido. As placas foram homogeneizadas e incubadas a 30°C durante 72 horas. Contam-se todas as colônias presentes. Os resultados foram expressos em ufc/g ou mL.

#### 2.1.4. Contagem de Enterobactérias (NP 4137:1991)

Segundo a norma NP 4137:1991, para a contagem de Enterobactérias, utilizou-se o método da contagem em placa pela técnica de incorporação. Foi transferido 1,0 mL de inóculo, em duplicado, para caixas de Petri a partir das diluições decimais e adicionado a cada placa o meio de cultura, *Violet Red Bile Glucose Agar – VRBG (Himedia – M581)*, previamente fundido e arrefecido. Após a solidificação, deitou-se sobre o meio uma nova camada do mesmo meio de cultura. As placas foram a incubar a 37°C durante 24 horas.

Contaram-se as colônias características (cor rosa a vermelho com ou sem halo de precipitação ou incolores mucosas. Para a confirmação das colônias suspeitas, foram isoladas cinco destas colônias em *Agar Nutritivo (OXOID - CM0003)* e incubadas a 37°C durante 24 horas.

A partir de cada uma das cinco colônias bem isoladas foi feita a confirmação bioquímica através da pesquisa de oxidase e do ensaio da fermentação da glucose. As Enterobactérias são oxidase negativa e glucose positiva.

O número de ufc/g ou mL foi calculado com base na percentagem de colónias confirmadas como *Enterobacteriaceas*.

#### **2.1.5. Contagem da *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001)**

Para a contagem da *E. coli* foi utilizada a norma ISO 16649-2:2001. Foi utilizada a contagem em placa por incorporação, a partir das diluições decimais foi transferido 1,0 mL de inoculo em duplicado, para placas de Petri esterilizadas e adicionado a cada uma das placas o meio de cultura *Agar Triptona-Bilis-Glucorónico – TBX (OXOID-CM0945)*, previamente fundido e arrefecido. As placas assim preparadas foram a incubar a 44°C durante 24h.

Foi efetuado a contagem das colónias características (azuis/verdes) das placas com menos de 150 colónias características e não características. Os resultados foram expressos em ufc/g ou mL.

#### **2.1.6. Contagem de Estafilococos (ISO 6888-1:1999).**

Para a contagem de Estafilococos foi utilizada a norma ISO 6888-1:1999. Utilizou-se o método da contagem em placa, pela técnica de espalhamento à superfície. Para tal transferiu-se, em duplicado, 0,1 mL de inoculo das diluições decimais para a superfície bem sólida e seca do meio de cultura *Agar Baird-Parker (Oxoid – CM0275)*. Espalhou-se bem o inóculo sobre toda a superfície do meio, com o auxílio de um espalhador esterilizado. As placas foram incubadas a 37°C/24 a 48h.

A contagem das colónias foi efetuada nas placas que apresentaram entre 15 a 150 colónias características e/ou não características em duas diluições sucessivas.

Foram isoladas cerca de 20% de colónias características e não características e a cada uma das colónias foi realizado o teste da catalase, e o teste da coagulase e um Gram.

Foram quantificados como estafilococos as colónias de cocos Gram positivos agrupadas em cacho, coagulase positiva ou negativa, e catalase positiva. Os resultados foram expressos em ufc/g e mL.

#### **2.1.7. Contagem de Fungos (NP 3277:1987)**

Para a contagem de Fungos utilizou-se o método da contagem em placa, pela técnica de espalhamento à superfície segundo a norma NP3277:1987. Foi transferido 1 mL de inoculo das diluições decimais para a superfície bem sólida e seca do meio de cultura *Agar Rosa Bengala com cloranfelicol (LIOFILCHEM 690090)*, previamente distribuído em 5 caixas de Petri esterilizadas, à razão de 0,2 mL por placa. Espalhou-se bem o inóculo sobre toda a superfície do meio, com o auxílio de um espalhador. As placas foram incubadas a 25°C durante 120 h. A contagem das colónias foi efetuada nas 5 placas da diluição cujo número de colónias, por placa, seja inferior a 300. Os resultados foram expressos em ufc/g ou mL.

## 2.1.8. Contagem de Bactérias Lácticas (ISO 15214:1998).

### Meios de Cultura e inoculação

Os meios de cultura utilizados para isolamento e replicação de bactérias lácticas foram:

- *Agar MRS (Oxoid CM1153)* de pH 5,7 para a contagem de *Lactobacillus*,
- *Agar M17 (BK0188)* para a contagem de *Lactococcus*,
- *Agar MSE (BK087)* para a contagem de *Leuconostoc*,
- *Agar Slanetz and Bartley (Oxoid CM0377)* para a contagem de *Streptococcus*.

Para a contagem de bactérias lácticas utilizou-se o método da contagem em placa, pela técnica de espalhamento à superfície. Transferiu-se, em duplicado, 0,1 mL de inoculo das diluições decimais para a superfície bem sólida e seca de cada um dos meios de cultura seletivos de cada um dos géneros de bactérias lácticas em placas de Petri esterilizadas. Espalhou-se bem o inóculo sobre toda a superfície do meio, com o auxílio de um espalhador esterilizado. Procedeu-se de igual forma para as diluições seguintes.

### Condições de incubação

Para a contagem de *Lactobacillus spp.* e de *Lactococcus spp.* as placas foram incubadas a 30°C/72h em condições de anaerobiose. Na contagem de *Streptococcus spp.* a incubação ocorreu a 37°C durante 24h e para *Leuconostoc spp.* a 21°C durante 4 dias, com observações diárias.

### Caracterização e identificação dos diferentes isolados

A contagem das colónias foi efetuada nas placas que apresentaram entre 15 a 300 colónias em duas diluições sucessivas. Foram isoladas cerca de 20% de colónias e a cada uma das colónias foi realizado o teste da catalase e da oxidase e um Gram. Foram quantificados como pertencentes a cada um dos grupos de bactérias lácticas as colónias com catalase e oxidase negativa, cocos ou bacilos Gram positivos. Os resultados foram expressos em ufc/g ou mL.

## 2.1.9. Conservação das culturas

À medida que os isolados foram considerados puros, foram mantidos nos respetivos meios de cultura sólidos, em tubo de ensaio a uma temperatura de 4°C.

Paralelamente os isolados foram inoculados em meios de cultura líquidos adequados e, de seguida passados para tubos “Eppendorf” com glicerol a 60% e congelados a 80°C negativos.



### 2.1.10. Pesquisa de *Salmonella* sp. (ISO 6579:2002)

A pesquisa de *Salmonella* foi utilizada a norma ISO 6579:2002. Depois da incubação em APT, meio de enriquecimento não seletivo, foi feito um enriquecimento seletivo. Para tal foi transferido 1 mL da cultura de pré-enriquecimento para um tubo de 10 mL de *Caldo Muller – Kauffmann Tetrationsato/novobiocina (MKTTn) (CM1048 OXOID)* e foi a incubar a 37°C/24 horas. Noutro tubo de ensaio contendo 10 mL de *Caldo Rappaport – Vassiliadis com soja (CM0866 OXOID)* foi inoculado 0,1 mL da cultura pré-enriquecida e foi a incubar a 41,5°C durante 24 horas.

De seguida foi feito o isolamento a partir das culturas anteriores (*MKTTn* e *Rappaport*). Para tal as culturas do enriquecimento selectivo foram semeadas com uma ansa esterilizada, por esgotamento à superfície, em placas de *Agar Xilose Lisina Dexosicolato (XLD – CM0469 OXOID)* e dos seguintes meios seletivos: *Aes Lab. Salmonella Agar Plate (ASAP – P05098A OXOID)*, *Agar Rambach* ou *Agar verde Brillante (HC389933 MERCK)* e *vermelho Fenol (BGA – CM0263 OXOID)*.

No caso de serem identificadas colónias suspeitas, procede-se aos testes bioquímicos e serológicos de identificação, que irão concluir a presença ou ausência da *Salmonella* spp. na quantidade de amostra em estudo, neste caso 25g. Ausência de colónias suspeitas após incubação indica ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra.

### 2.1.11. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2:1998).

A pesquisa de *Listeria* foi baseada na norma ISO 11290-2:1998. A partir do enriquecimento primário, já referido, foi feito o enriquecimento secundário. Para tal foi transferido 0,1 mL da cultura (enriquecimento primário) para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo *Fraser II (CM0895 OXOID)*. Foi homogeneizado e incubado a 37°C durante 48 horas.

O isolamento de colónias foi feito a partir do enriquecimento secundário e foi semeado com uma ansa esterilizada e arrefecida, por esgotamento à superfície, uma placa de *Agar Oxford (CM0856 OXOID)* e uma placa de *Palcam (CM0877 OXOID)*. De seguida foi a incubar a 37°C durante 24 horas.

Ao fim deste tempo de incubação foram examinadas as placas. *Agar Oxford*, as colónias são pequenas, acinzentadas e rodeadas de halo negro. *Agar Palcam* as colónias são pequenas, cinzento esverdeado ou verde azeitona, por vezes com centro escuro e sempre rodeadas por um halo negro.

Para a confirmação da *Listeria* spp. foi retirado das placas de cada meio seletivo, 5 colónias suspeitas. Estas colónias foram semeadas, pela técnica de esgotamento à superfície, em placas de Petri com *Agar Triptona* de soja com extrato de Levedura (*CM0131 OXOID*), de modo a obter colónias isoladas. As placas foram a incubar a 37°C 24 horas.

No caso de serem identificadas colônias suspeitas, procede-se aos testes bioquímicos e serológicos de identificação, que irão concluir sobre a presença ou ausência da *Listeria* na quantidade de amostra. Ausência de colônias suspeitas após incubação indica ausência de *Listeria* em 25 g de amostra.

## 2.2. Análises Físico-químicas

Os reagentes químicos usados neste trabalho foram das seguintes marcas comerciais: *Merck*, *Panreac*, *Riedel*, *Sigma*, *Fluka* e José Manuel Gomes dos Santos, todos com uma pureza mínima do tipo pró-análise (p.a.), de acordo com as normas ACS (*American Chemical Society*) ou ISO (*International Standard Organization*). Para todos os parâmetros químicos foram analisadas três réplicas por amostra.

### 2.2.1. aw

A determinação do aw é feita através do medidor *Rtronic Hygropalm*®. Nesta determinação foi colocado uma pequena porção de amostra previamente moída nas placas destinadas a esta análise a uma temperatura entre os 20 e os 22°C, com o cuidado de não sujar os bordos. A amostra demora 15 minutos a analisar. Procede-se a leitura da atividade da água no medidor *Rtronic Hygropalm*®.

### 2.2.2. pH

A determinação do pH foi efetuada diretamente na pasta do queijo, à temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para esta determinação utilizou-se um potenciômetro, marca *METROHM 744 pH Meter*® equipado com um eletrodo de penetração. Precisão do método:  $\pm 0,01$  (escala *Sorensen*).

### 2.2.3. Humidade (H)

Na determinação da humidade usou-se o método gravimétrico (AOAC, 1990b), sendo a diferença de massas da amostra determinada após secagem em estufa a  $101 \pm 1^\circ\text{C}$ , até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método:  $\pm 0,01\%$  (m/m).

### 2.2.4. Gordura (G)

O teor da matéria gorda foi determinado pelo *método de Van Gulik*, segundo a (NP 2105, 1983). Este método consiste na separação da fase gorda da amostra por centrifugação (1000-1200 rpm), através da mistura desta com álcool e ácido sulfúrico num butirómetro *Van Gulik*, após dissolução das proteínas do queijo pelo ácido sulfúrico e com a separação da gordura facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool isoamílico. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método:  $\pm 0,1\%$  (m/m).

### 2.2.5. Cloretos (C)

Para a determinação do teor dos cloretos de sódio (NaCl), foi determinado pelo *método de Mohr* (AOAC, 1990b), onde se adicionou excesso de nitrato de prata a amostra, formando-se um sal de baixa solubilidade que precipita. O nitrato de prata residual determinou-se por titulação com tiocianato de potássio. Como o cloreto de prata é mais solúvel do que o tiocianato de potássio, removeu-se o cloreto de prata por titulação. Os resultados obtidos em % (m/m).

### 2.2.6. Acidez Total (A)

A acidez total determinou-se por titulação com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1N, após extração dos componentes solúveis em água a 40°C (AOAC, 1990a). Os resultados foram obtidos em cm<sup>3</sup> de solução de hidróxido de Sódio 1N, necessários à neutralização dos ácidos existentes em 100 g de amostra. Precisão do método:  $\pm 0,01$  cm<sup>3</sup> NaOH N/100g.

### 2.2.7. Azoto total (NT)

O azoto total determinou-se pelo método de *Kjeldahl* (AOAC, 1990b). Foi utilizado um digestor marca *DK20 Heating Digestor* e um destilador *Foss Kjeltex 8100 Distillation Unit (Foss Analytical AB, Sweden)*. Na determinação deste parâmetro, a amostra sofre uma mineralização em meio ácido, a quente, na presença de uma mistura catalisadora metálica (sulfato de potássio e sulfato de cobre). A digestão leva à conversão de todo o azoto orgânico em ião amônio, que é posteriormente convertido em amoníaco, por adição de hidróxido de sódio, destilado em corrente de vapor e recolhido em ácido bórico e colocado previamente num balão com uma gota de indicador de *Tashiro*, e titulado com ácido clorídrico de título conhecido. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método:  $\pm 0,01\%$  (m/m). A % (m/m) de **Proteína Bruta** obteve-se pela multiplicação da média do teor de azotos totais pelo fator de conversão 6,38.

### 2.2.8. Azoto solúvel em água (NSA)

O azoto solúvel em água foi quantificado a partir de uma extração aquosa dos componentes-azotados (Kuchroo, *et al.*, 1982), utilizando água aquecida a  $\pm 40$  °C, de modo a obter uma emulsão homogênea, num balão volumétrico com volume rigorosamente conhecido. A esta mistura conservada em formalina e permaneceu em repouso durante 12 horas, para extração dos componentes solúveis. Filtrou-se e determinou-se o teor em azoto solúvel numa alíquota, pelo método de *Kjeldahl*. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m) e em percentagem relativamente ao azoto total (NSA%). Precisão do método:  $\pm 0,01\%$  (m/m). Através da relação do azoto solúvel em água com o azoto total, determinou-se o **coeficiente de maturação** em %.

### 2.2.9. Cor

A determinação de cor foi realizada com uma pistola colorimétrica *Minolta CR-300®* (*Minolta, Osaka, Japan*). A sonda usa uma lâmpada de Xénon de arco pulsado (PXA), que origina uma iluminação difusa, com um ângulo de 0° e têm uma área de 8mm de diâmetro para medição da cor. Apenas a luz refletida perpendicularmente à superfície da amostra é recolhida por um cabo de fibras óticas para análise de cor (Minolta, 1991). Antes das medições o equipamento foi calibrado com um padrão branco ( $L^* = 97,10$ ;  $a^* = -4,88$ ;  $b^* = 7,04$ ). Os resultados foram obtidos a partir de um ângulo visual de 2° e foram expressos de acordo com o sistema de coordenadas CIELAB:  $L^*$  corresponde à luminosidade que varia entre 0 (preto) e 100 (branco),  $a^*$  corresponde à tonalidade verde/vermelho (-60 é verde e +60 é vermelho) e  $b^*$  tonalidade azul/amarelo (-60 é azul e +60 é amarelo). Foram efetuadas cinco medições por amostra: duas no centro do queijo e as restantes três na borda (Minolta, 1991).

### 2.2.10. Textura

Na determinação de perfil de textura usou-se o texturómetro "*Texture Analyser Model TAHDi®*" (*Stable Micro Systems*), com uma célula de carga de 25 kg ". Foram realizadas 3 réplicas por amostra. O teste foi realizado com uma sonda cilíndrica de alumínio de 20 mm de diâmetro (penetração da sonda na pasta do queijo), à temperatura de  $20 \pm 1$  °C. O teste foi programado nas seguintes condições: velocidade de teste 1,00 mm/s, tempo de repouso entre o primeiro e o segundo dentada 5s, profundidade de penetração da sonda na amostra 20 mm. Foram assim obtidos os gráficos força/tempo onde se calcularam os parâmetros dureza (N), adesividade (-N.mm) e coesividade (adimensional) (Alvarenga, 2000; Alvarenga, 2008).

### 2.2.11. Milko-Scan (Análises ao Leite)

O *Milko-Scan* (*Foss Electric*) é um aparelho semiautomático, modelo *Milko-Scan 133B*, é controlado por um microprocessador para a determinação rápida e exata de: Gordura, Proteína, Lactose, Sólidos Totais e Sólidos não Gordos em amostras de leites e produtos lácteos (soro, sorelho, natas), é semelhante a um espectrofotómetro de infravermelhos. Antes de usar o aparelho procedeu-se a sua lavagem, o sistema de líquidos deve purgar (tirar ar das tubagens) e depois colocou-se em zero com uma solução de triton a 0,1% e aqueceu-se a 40°C. As amostras foram introduzidas num frasco, homogeneizadas e colocadas no *Milko-Scan*. A amostra foi aspirada e os resultados são impressos numa Impressora Epson LX-800.

## 2.3. Análises Sensorial

O perfil sensorial caracterizou-se pelo método da análise quantitativa descritiva (*QDA – "quantitative descriptive analysis"*), foi realizado com base nas propriedades sensoriais do queijo Serpa. Foram realizadas doze sessões de avaliação sensorial do queijo por um grupo de doze provadores de queijo

Serpa selecionados e treinados (NP ISO 8586 – 1 , 2001). As provas decorreram numa sala de provas com especificações normalizadas (NP ISO 8586 – 2 , 2001).

A metodologia utilizada na constituição, seleção e treino do painel de provadores, foi efetuada de acordo com as normas internacionais em vigor, bem como com recurso à terminologia aceite (ISO 3972, 1991) (ISO 5492, 1992) e encontra-se descrita em anteriores trabalhos de análise sensorial de queijo Serpa (Canada, 2001).

A avaliação sensorial foi efetuada através da aplicação de dois tipos de testes. Uma em que se utilizou uma ficha de prova por atributos e outra em que se aplicou o boletim de análise sensorial para a certificação de queijo Serpa.

Os atributos que se apresentam na ficha de prova, foram estabelecidos com a participação do painel de provadores e selecionados de acordo com os objetivos do trabalho. Os atributos selecionados foram a Forma, Cor da Casca, Cor da Pasta, Olhos, Cheiro (Característico e Amoniacal), Textura (Granulosa, Amanteigada), Sabor (Doce, Salgado, Acido, Picante e Amargo), Flavor (Característico e Manteiga), Persistência e Gosto Residual). Os resultados das fichas foram convertidos numa escala quantitativa de 1 a 9, do mínimo ao máximo para cada atributo, com auxílio de um acetato com graduação em cada uma das escalas, no sentido de dividir a escala contínua da ficha de prova em escala graduada com nove secções.

Estabeleceu-se neste trabalho que a classificação dos queijos em estudo, com base nesta avaliação, seria feita em maus desde que a pontuação inferior ou igual a 14, bons com pontuação entre os 14 e 16,5 e finalmente, muito bons desde que a pontuação superior a 16,5.

No caso do Boletim de análise sensorial queijo Serpa são avaliados separadamente a Crosta, Forma e Consistência, Textura e Cor da Pasta e Sabor/Aroma, com uma escala de 0 a 4 ou de 0 a 6. A certificação do queijo exige uma pontuação igual ou superior a 14 pontos e com um mínimo de 4 pontos atribuídos no atributo “sabor e aroma”.

As amostras de queijo foram codificadas de maneira uniforme, utilizando letras e números, escolhidos aleatoriamente. Colocou-se à disposição dos provadores água, para efetuar a lavagem da boca e evitar a fadiga. A cada provador foram apresentadas duas amostras.

## 2.4. Identificação dos microrganismos isolados mediante técnicas de biologia molecular

A identificação dos microrganismos ao nível da espécie foi efetuada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR), seguida de sequenciação do fragmento obtido, utilizando o método descrito por Benito, *et al.*, (2008).

De cada um dos grupos bacterianos quantificados foram selecionadas cerca de cinco colónias a partir das placas com colónias contáveis. Após o bom isolamento foram cultivadas em 5 mL de caldo MRS (*Oxoid CM0359*) no caso das bactérias lácticas e em caldo BHI (*Oxoid CM1135*) no caso das outras bactérias e incubadas à temperatura adequada durante 18-24h, para posterior extração do ADN. Após a extração foi efetuada a amplificação por PCR, utilizando “*primers*” específicos para a região V2-V3 do ADNr 16S. colónias.

### 2.4.1. Extração do ADN das bactérias e leveduras

Para a extração do ADN das bactérias colónias centrifugou-se 1 mL de cada cultura em meio líquido em tubos de 1,5 mL, a 10000 rpm durante 5 minutos. Após este passo retirou-se o sobrenadante e prosseguiu-se a extração ou congelaram-se as células a 20°C até à sua utilização.

Para a extração do ADN das leveduras, A utilizou-se o método descrito por Ruiz Moyano (2006) com algumas modificações. Assim, semeou-se cada um dos isolados guardados em glicerol em placas de PDA de cada uma das estirpes previamente isoladas em glicerol e incubou-se durante 120 horas a 25°C. As colónias foram recolhidas para microtubos de 1,5 µL esterilizados aos quais se havia adicionado areia estéril para facilitar, posteriormente, a rutura da parede aquando da homogeneização com o tampão de lise com um moedor (*Pet pellet, Sigma*). A partir daqui a técnica é semelhante para os dois tipos de microrganismos.

Para a extração do ADN das células obtidas previamente, resuspenderam-se em 500 µL de TES buffer pH 8 (tris 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,05M) com 2 µg/µL de lisozima. Para eliminar as proteínas e ARN adicionou-se 25 µL de proteinase K (10µg/µL) e 25 µL de RNase (10µg/µL), incubando-se a mistura a 55°C durante 30 minutos. Adicionou-se depois 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% incubando-se durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente, adicionou-se fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) ao microtubos na proporção de 1:1 e centrifugou-se a 6500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Recolheu-se cuidadosamente a fase superior para novos tubos de 1,5 mL e precipitou-se o ADN adicionando 0,1 volumes (150 µL aproximadamente) de acetato de sódio 3M e dois volumes de etanol (100% v/v) a -20°C. A precipitação do ADN foi completada em congelação a -20°C durante um mínimo de duas horas. Depois desta fase o preparado anterior centrifugou-se a 6500 rpm durante 5 minutos a 4°Ce, após a eliminação do sobrenadante, voltou-se a lavar o precipitado com etanol (70% v/v) a -20°C, raspando as paredes do

microtubo, e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Depois destas lavagens secou-se durante 10 minutos numa centrifugadora a vácuo a 37 °C, após o que se suspendeu- o ADN em 50 µL de água pura estéril. Caso não se pretenda prosseguir o ADN mantém-se a -20°C até a sua utilização.

### **Avaliação da qualidade do ADN de bactérias e leveduras**

Para a avaliação da qualidade do ADN realizou-se uma eletroforese horizontal em gel de agarose (Pronadisa) a 1% de concentração.

Para preparar o gel utilizou-se um tampão de corrida TAE (1X), obtido a partir de TAE (50X) (Tris Base 2M; 5,71% de ácido acético glacial (v/v); EDTA 0,05M (pH 8)). Para a visualização do ADN utilizou-se coloração com brometo de etídio adicionado ao gel numa concentração final de 0,5 µL/mL (p/v). Após a preparação do gel deixa-se solidificar em formas próprias com os pentes adequados colocados para formar os poços de colocação da amostra.

A eletroforese realizou-se em tinas *MIDICELL Primo System* modelo EC330, *MAXICELL Primo System* modelo EC340. Para aplicar a corrente da eletroforese utilizou-se uma fonte *SCIE-PLAS* modelo *PSU 400/200*.

Para a corrida das amostras utilizou-se 10 µL (5 µL nas leveduras) do ADN extraído previamente homogeneizado em 3 µL de tampão de amostra (40% (p/v) de sacarose e 0,25% (p/v) de azul de bromofenol) e aplicou-se uma corrente constante de 100 mV durante 1 hora, após colocação da mistura anterior nos poços previamente efetuados no gel. O marcador do peso molecular utilizado foi o *GeneRuler 100 bp Plus ADN Ladder, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific INC.81, Wyman Street. 02451 Waltham, MA, USA)*. A concentração do marcador foi de 0,5 µg/µL.

O marcador contém 14 fragmentos de ADN com os seguintes pares de bases: 3000pb, 2000pb, 1500pb, 1200pb, 1000pb, 900pb, 800pb, 700pb, 600pb, 500pb, 400pb, 300pb, 200pb e 100pb. Depois da eletroforese em gel de 1µg e da mistura de fragmentos num gel a 1% de agarose (p/v), são visíveis 14 bandas (Figura 5).

A visualização do ADN extraído, após a corrida, foi levada a cabo utilizando um transiluminador de UV e foi fotografado com o *Gene Genius Bio Imaging System (Syngene)* e através do programa informático *Gene Snap* versão 3.06 (*SynGene, Division of Synoptics Ltd, Beacon House, Nuffield Road, Cambridge CB 4 1 TF, England*).

A concentração de ADN foi determinada por comparação com o marcador do peso molecular utilizado. De acordo com os resultados obtidos, diluiu-se o ADN extraído de forma a ficar com uma concentração de 10 µg/µL.

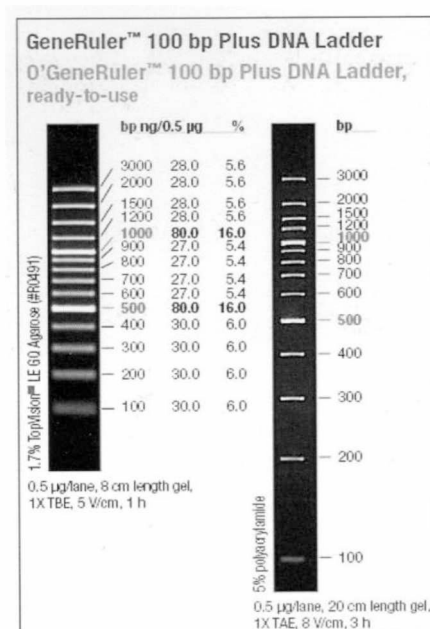


Figura 5 - Marcador *GeneRuler 100bp Plus ADN Ladder*, *Thermo Scientific*, utilização da técnica PCR-RFLP.

### Realização da PCR para identificação das bactérias

O ADN extraído das bactérias utilizou-se para a amplificação da região 16S do ADNr utilizando os primers universais PA e PH para as bactérias (Figura 6 e Tabela 9).

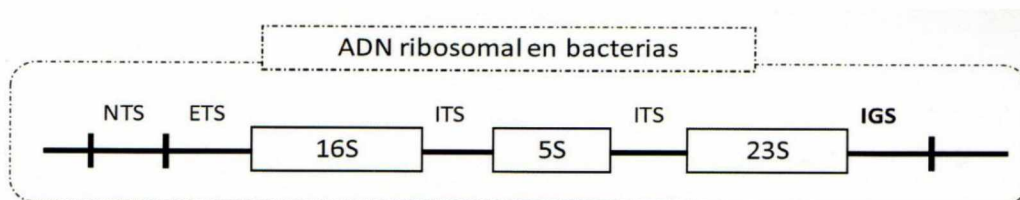


Figura 6 - Estrutura do ADN ribossomal das bactérias

Para obter a sequenciação do ADN, através da eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR, como se descreveu anteriormente, as bandas selecionadas de 1500 pb foram purificadas através do kit “*High Pure PCR Product Purification Kit*” (Rocha, 2005).

Tabela 9 - Sequencia dos “*primers*” utilizado para realizar o PCR

| “ <i>Primers</i> ” | Sequencia 5’- 3’     |
|--------------------|----------------------|
| PA                 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| PH                 | AAGGAGGTGATCCAGCCGCA |

As quantidades dos reagentes utilizados para a amplificação do ADN foram as apresentadas na Tabela 10.



Tabela 10 - Concentração inicial e volume dos reagentes utilizados no PCR (por amostra)

| Concentração inicial de cada reagente   | Volume utilizado por reação |
|---|-----------------------------|
| H <sub>2</sub> O  | 76,5 µL                     |
| DNTp (nucleótidos): 10 mM   | 2 µL                        |
| PA (primer) 10 µM   | 5 µL                        |
| PH (primer) 10 µM   | 5 µL                        |
| Tampão: 10X (500 mM 23 tris-HCl, pH9,2, 140 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 22,5mM MgCl <sub>2</sub> ) | 10 µL                       |
| Enzimas: 5 unidades / µL de ADN polimerase (Thermo Scientific)  | 0,5 µL                      |
| ADN extraído (10 µg/µL)   | 1 µL                        |

A PCR realizou-se num volume total de 100 µL e a amplificação num termociclador *BIORAD T100*, mediante 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos, seguido de uma amplificação final de 10 minutos a 72°C (Tabela 11).

Tabela 11 - Condições de amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos 16S do ADN ribossomal.

| Etapas         | Temperatura (°C) | Tempo | Nº Ciclos |
|----------------|------------------|-------|-----------|
| Desnaturação   | 94               | 1     | 35        |
| Hibridização   | 55               | 1     | 35        |
| Extensão       | 72               | 1,5   | 35        |
| Extensão final | 72               | 10    | 1         |

### Caracterização das leveduras mediante as técnicas PCR-RFLP

Do material genético extraído das leveduras amplificou-se, mediante a técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR), as regiões ITS1-5,8S ARNr-ITS2, figura 7 que corresponde aos espaçadores internos ITS e ARNr 5,8S. Mediante uma PCR utilizou-se o par de “primers” ITS1F-ITS4. Na amplificação do ADN mediante a técnica de PCR utilizou-se um termociclador *Biorad T100*.

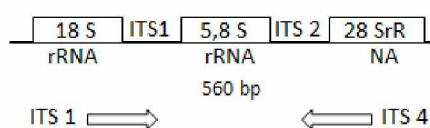


Figura 7 - Estrutura do ARN ribossomal da levedura.

A reação de PCR desenvolveu-se com 50 µL de volume num termociclador *Biorad T100*, seguindo a metodologia descrita por (Gallardo, *et al.*, 2014), para tal utilizaram-se os seguintes reagentes com a concentração final referida a seguir.

- 0.2 mM de dNTP
- PCR Buffer 1X
- 1,5 uL Dream Taq ADN polimerase
- 50 pmol de cada iniciador (ITSIF e ITS4)
- 1 µL de solução de ADN (10ng/µL)
- H<sub>2</sub>O estéril MiliQ até completar o volume da Reação

A Tabela 12, descreve as sequências dos iniciadores usados em PCR

Tabela 12 - Sequência dos iniciadores utilizados para a reação em cadeia da polimerase das leveduras.

| "Primers" | Sequencia 5' - 3'      |
|-----------|------------------------|
| ITS-1F    | CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA |
| ITS-4     | TCCTCCGCTTATTGATATGC   |

Uma vez adicionados os reativos, realizou-se a amplificação. As condições utilizadas foram as descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições da amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos ITS1-5,8S ARNr-ITS2 das leveduras.

| Etapas         | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Nº Ciclos |
|----------------|------------------|-------------|-----------|
| Desnaturação   | 94               | 1           | 35        |
| Hibridização   | 55               | 1           | 35        |
| Extensão       | 72               | 1           | 35        |
| Extensão final | 72               | 10          | 1         |

O resultado da PCR das leveduras foi visualizado em gel de agarose a 1% na sequência de uma eletroforese, tal como já descrita antes, antes dos cortes com enzimas de restrição.

### Cortes com enzimas de restrição - leveduras

Para a análise da região ITS-5,8S ARNr-ITS2 mediante cortes com enzimas, as enzimas ensaiadas foram Taq I, Sal 3AI, Dde I e Hae III (10U/μL). A reação realizou-se com um volume final de 20 μL com os reagentes que se descrevem na Tabela 14, nas quantidades apresentadas. As misturas preparadas incubaram-se a 37°C durante 12 horas, no caso de Sau 3AI, Dde I e Hae III, e a 65°C durante 12 horas para a enzima TaqI.

Tabela 14 – Reagentes e respectivas quantidades ampliados utilizados para a análise com enzimas de restrição

| Tampão 10X | Enzima (10U/μL) | Produto PCR | H <sub>2</sub> O |
|------------|-----------------|-------------|------------------|
| 2 μL       | 0,5 μL          | 10 μL       | 7,5 μL           |

### Avaliação e análise dos produtos da PCR e do corte com enzimas de restrição

Os géis de agarose preparam-se como se descreveu para avaliação da qualidade do ADN. As concentrações dos géis foram de 1% de agarose para visualizar os perfis de bandas dos distintos isolamentos para as leveduras e de 1,5% em casos dos cortes com enzimas.

A eletroforese realizou-se com uma corrente constante de 80 mV durante 2,5 horas, utilizando o marcador de peso molecular *GeneRuler* 100 bp ADN de 10 fragmentos de ADN com os seguintes pares de bases: 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb e 100 pb.

## Identificação dos isolados mediante a sequenciação

Uma vez realizados os cortes com enzimas de restrição e agrupados os diferentes perfis de bandas com a combinação das quatro enzimas utilizadas, foram utilizados dois representantes de cada OTU (*Operational Taxonomic Unit*) para a sua identificação mediante sequenciação da região 26 do ADNr. Para isso o ADN extraído das leveduras foi utilizado para a amplificação da região 26S do ARNr utilizando os “primers” universais NL1 e NL4 (Tabela 15 e Figura 8).

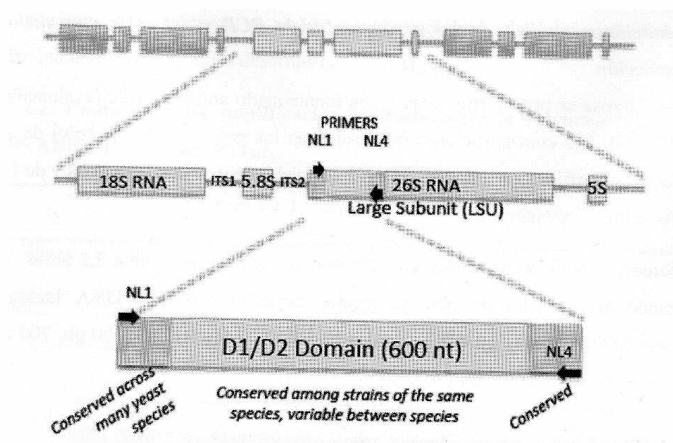


Figura 8 - Estrutura do ARN ribossomal da levedura

Para fazer a sequenciação do ADN, depois da eletroforese em gel dos produtos da PCR, tal como se descreveu anteriormente, as bandas selecionadas com cerca de 600 pb, segundo a espécie, foram purificadas com o kit “High Pure PCR Product Purification Kit” (Rocha, 2005).

Tabela 15 - Sequencia dos iniciadores para realizar o PCR

| “Primers” | Sequencia 5’- 3’         |
|-----------|--------------------------|
| NL1       | GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG |
| NL4       | GGTCCGTGTTTCAAGACGG      |

Neste caso com o fim de obter uma maior quantidade de produto da PCR, a reação realizou-se num volume final de 100 µL. As quantidades de reagentes utilizados para a amplificação do ADN foram as que se apresentam na Tabela 16.

Tabela 16 - Concentração inicial e volume dos reagentes utilizados na PCR (por amostra)

| Concentração inicial de cada reagente   | Volume utilizado por reação |
|---|-----------------------------|
| H <sub>2</sub> O  | 76,5 µL                     |
| DNTp (nucleótidos): 10 mM   | 2 µL                        |
| PA (iniciador) 10 µM  | 5 µL                        |
| PH (iniciador) 10 µM  | 5 µL                        |
| Buffer: 10X (500 mM 23 tris-HCl, pH9,2, 140 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 22,5mM MgCl <sub>2</sub> ) | 10 µL                       |
| Enzimas: 5 unidades / µL de ADN polimerase ( <i>Thermo Scientific</i> )   | 0,5 µL                      |
| ADN extraído (10 µg/µL)   | 1 µL                        |

A PCR realizou-se num volume total de 100 µL e a amplificação realizou-se num termociclador *BIORAD* T100, mediante a programação apresentada na tabela 17.

Tabela 17 - Condições de amplificação utilizadas para a obtenção dos fragmentos 26S do ARN ribossomal.

| Etapas         | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Nº Ciclos |
|----------------|------------------|-------------|-----------|
| Desnaturação   | 94               | 1           | 35        |
| Hibridização   | 55               | 1           | 35        |
| Extensão       | 72               | 1           | 35        |
| Extensão final | 72               | 10          | 1         |

### 2.4.3. Identificação dos isolamentos mediante a sequenciação (bactérias e leveduras)

Para obter a sequenciação do ADN os produtos purificados foram enviados ao serviço de sequenciação da UEX (SAIUEX, Universidad de Extremadura, Campus de Badajoz) e uma vez recebidas as sequencias, essas foram analisadas com os programas informáticos *Chromas Pro, version 1.49 Beta (Technelysium pty LTD)*; *ADN Star Lasergene EditSeq versão 7.1.0*; ou *ADN Star Lasergene SeqBuilder versios 7.1.0*; *DM version 3.3.8*. Uma vez obtida a sequencia dos ácidos nucleicos deste fragmento genómico, completou-se a identificação dos isolamentos mediante a sua comparação com a base de dados *GenBank* usando o *BLAST algorithm*. A identificação dos isolamentos a nível de espécie foi determinada com base na máxima similaridade.

### 2.5. Tratamentos estatísticos – estatística descritiva

Os tratamentos estatísticos usados dependeram do ensaio e dos objetivos em causa. Nesta fase, pretende-se fazer um pequeno resumo dos objetivos gerais de cada metodologia. Todos os tratamentos e gráficos foram elaborados pelo “software” Microsoft Excel 2016 (*Microsoft Corporation, 2016*) e “*IBM SPSS Statistics*” (IBM, 2015).

Os valores médios foram obtidos a partir de duas ou três amostras semelhantes (dependendo do ensaio) e, em cada amostra, foram utilizadas entre 3 ou 10 réplicas laboratoriais (dependendo do parâmetro).

Para além das médias dos atributos foram determinados os desvios padrão, para incluir nas tabelas de resultados, bem como o intervalo de confiança a 95%, que foi usado para a apresentação gráfica das médias. Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores médios obtidos para um determinado parâmetro, foi efetuado o teste de comparação de médias “*ANOVA post hoc comparisons Scheffé contrasts*”.

### 3. Registo e Discussão de Resultados

#### 3.1. Análise Sensorial

##### 3.1.1. Caracterização sensorial com base nas regras de certificação do Queijo Serpa DOP

Na Tabela 18 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a análise sensorial das amostras do Queijo Serpa, segundo o boletim para certificação do queijo Serpa.

Tabela 18 - Valores médios, desvio padrão resultados da análise sensorial do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes, referentes a análise sensorial segundo o boletim de certificação.

|     | Crosta                    | Forma/Consistência       | Textura/Cor Pasta        | Sabor/Aroma               | Soma                        |
|-----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| PA1 | 3,30(0,26) <sup>a</sup>   | 3,40(0,21) <sup>a</sup>  | 5,10(0,52) <sup>a</sup>  | 5,05(0,44) <sup>a</sup>   | 16,85(0,94) <sup>a</sup>    |
| PA2 | 3,35(0,24) <sup>ab</sup>  | 3,40(0,21) <sup>a</sup>  | 4,90(0,57) <sup>a</sup>  | 5,20(0,54) <sup>a</sup>   | 16,85(1,08) <sup>a</sup>    |
| PC1 | 3,33(0,35) <sup>ab</sup>  | 3,39(0,33) <sup>a</sup>  | 4,11(1,17) <sup>ab</sup> | 4,44(1,07) <sup>abc</sup> | 15,28(2,46) <sup>ab</sup>   |
| PC2 | 3,11(0,60) <sup>abc</sup> | 3,33(0,35) <sup>a</sup>  | 5,00(0,50) <sup>a</sup>  | 5,00(0,66) <sup>a</sup>   | 16,44(1,78) <sup>ab</sup>   |
| PG1 | 3,50(0,25) <sup>a</sup>   | 3,33(0,25) <sup>a</sup>  | 4,78(0,75) <sup>ab</sup> | 4,94(0,85) <sup>a</sup>   | 16,56(1,49) <sup>ab</sup>   |
| PG2 | 3,39(0,33) <sup>ab</sup>  | 3,28(0,26) <sup>a</sup>  | 5,00(0,61) <sup>a</sup>  | 5,39(0,22) <sup>a</sup>   | 17,06(0,98) <sup>a</sup>    |
| IA3 | 2,64(0,45) <sup>abc</sup> | 2,82(0,51) <sup>ab</sup> | 5,05(0,42) <sup>a</sup>  | 4,86(0,87) <sup>a</sup>   | 15,36(1,72) <sup>ab</sup>   |
| IA4 | 3,50(0,32) <sup>a</sup>   | 3,27(0,26) <sup>a</sup>  | 4,95(0,57) <sup>a</sup>  | 5,14(0,60) <sup>a</sup>   | 16,86(1,38) <sup>a</sup>    |
| IC3 | 2,30(0,42) <sup>cd</sup>  | 2,70(0,42) <sup>ab</sup> | 3,25(0,42) <sup>b</sup>  | 3,15(0,67) <sup>c</sup>   | 11,40(1,29) <sup>d</sup>    |
| IC4 | 2,50(0,58) <sup>bcd</sup> | 2,85(0,34) <sup>ab</sup> | 3,55(0,69) <sup>ab</sup> | 2,90(0,57) <sup>c</sup>   | 11,80(0,63) <sup>cd</sup>   |
| IG3 | 3,15(0,41) <sup>abc</sup> | 3,25(0,35) <sup>a</sup>  | 4,35(0,67) <sup>ab</sup> | 4,20(0,82) <sup>abc</sup> | 14,95(1,04) <sup>abc</sup>  |
| IG4 | 3,30(0,35) <sup>ab</sup>  | 3,30(0,35) <sup>a</sup>  | 4,70(0,54) <sup>ab</sup> | 4,45(0,72) <sup>abc</sup> | 15,75(1,01) <sup>ab</sup>   |
| IB1 | 3,28(0,57) <sup>ab</sup>  | 3,28(0,44) <sup>a</sup>  | 3,61(0,55) <sup>ab</sup> | 3,28(0,36) <sup>bc</sup>  | 13,44(1,31) <sup>bcd</sup>  |
| IB2 | 3,54(0,33) <sup>a</sup>   | 3,50(0,30) <sup>a</sup>  | 4,63(0,74) <sup>ab</sup> | 4,71(0,75) <sup>ab</sup>  | 16,38(1,55) <sup>ab</sup>   |
| IV1 | 1,96(0,50) <sup>d</sup>   | 2,17(0,65) <sup>b</sup>  | 3,83(1,07) <sup>ab</sup> | 3,88(0,64) <sup>abc</sup> | 11,79(2,01) <sup>cd</sup>   |
| IV2 | 3,00(0,41) <sup>abc</sup> | 2,95(0,37) <sup>ab</sup> | 4,05(0,90) <sup>ab</sup> | 3,95(0,60) <sup>abc</sup> | 13,95(1,92) <sup>abcd</sup> |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0,05$ ,  $n=10$  (teste *Scheffé*)

Com base nestes resultados os queijos foram classificados em maus (M), bons (B) e muito bons (MB). Na Tabela 18, assim como em todas as próximas tabelas e gráficos, as linhas a vermelho representam resultados dos queijos classificados como maus, as linhas azuis os queijos bons e as linhas verdes os queijos muito bons.

Os queijos classificados como muitos bons (>15,5) foram cinco (PA1, PA2, PG1, PG2 e IA4), todos pertencentes aos produtores DOP, sendo quatro de Primavera e um de inverno. Os queijos classificados como bons (14-15,4) foram seis (PC1, PC2, IA3, IG3, IG4, IB2), cinco DOP. Todos obtiveram uma pontuação superior a 4,0 no sabor/aroma. Os cinco queijos classificados como maus (<14,0), foram os queijos IC3, IC4, queijos DOP e os queijos IB1, IV1 e IV2, queijos de ovelha não DOP. Todos da época de inverno. Todos estes queijos tiveram a pontuação de Sabor/Aroma inferior a 4,0, o mínimo imposto para certificação.

Na pontuação total, correspondente ao somatório das pontuações obtidas nos vários parâmetros, os valores variaram entre o 11,40 e os 17,06, num máximo possível de 20,0. O queijo com menor pontuado foi o queijo IC3 e o de maior valor foi PG2. Os queijos PA1, PA2, PG2, e IA4 são semelhantes, entre os restantes queijos verificaram-se diferenças significativas.

Quanto à crosta a pontuação variou entre 1,96 para o queijo IV1 e os 3,54 para o queijo IB2, num máximo de 4,0, com diferenças significativas entre os queijos. A maior pontuação corresponde a uma crosta lisa, bem formada, fina, uma cor amarela palha e uniforme. Os queijos IB2, PG1 e IA4, foram os que se aproximaram mais desta condição. De uma maneira geral os queijos com pontuações totais mais baixas, foram os que tiveram avaliações mais baixas para a crosta, ou seja, com crosta pouco aderentes, malformada, dificuldade na contenção da massa, dura ou espessa, cor branca ou manchada.

Quanto a forma/consistência os valores variaram entre os 2,17 para o queijo IV1 e 3,50 para o queijo IB2, num máximo de 4,0. A diferença é significativa nos queijos. O queijo IB2 foi o que mais se aproximou da forma/consistências ideal neste queijo, ou seja, regular pouco abaulado lateralmente e um pouco na face superior, sem arestas, consistência semi-mole com alguma flutuação, som maciço ou ligeiramente timpânico (olhos). Os restantes queijos, em maior ou menor proporção, foram considerados com superfícies planas, falta de abaulamento lateral, arestas vivas, sem flutuação, duro ou deformável por excesso de amanteigado, som timpânico acentuado (muitos olhos).

Quanto à textura e cor da pasta os valores variaram entre 3,25 para o queijo IC3 e os 5,10 para o queijo PA1, num máximo de 6,0. Nenhum dos queijos foi pontuado no intervalo máximo de 5,5-6,0 que corresponde ao melhor aspeto e cor. Pode deduzir-se que em todos os queijos se verificou algum ou vários defeitos possíveis como pasta mal ligada, aberta, centros duros, abatida ou irregular, água intersticial, cor branco-mate, centros brancos, coloração irregular e manchas.

Os valores do sabor e aroma variaram entre 2,90 para o queijo IC4 e os 5,39 para o queijo PG2. Todos os queijos bons e muito bons obtiveram a pontuação mínima exigida de pelo menos 4,0, no entanto, nenhum obteve a classificação máxima entre 5,5 e 6,0. Em todos os queijos, foi detetado algum ou vários dos defeitos de sabor, embora de forma pouco acentuada, de sabor algo insípido, sabão, salgado, ácido, amargo, picante, impreciso ou desagradável.

Considerou-se que, não havendo queijos excepcionais, a avaliação sensorial comprovava a existência de diferenças significativas pelo menos entre os queijos classificados como maus e os muito bons. Esta amostra poderia assim ser utilizada na caracterização microbiológica com vista ao desenvolvimento de inóculos autóctones, já que poderia servir para associar atributos positivos e negativos com a flora microbiana.

### 3.1.2. Caracterização sensorial com base na ficha de descrição do produto

Na Tabela 19 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a análise sensorial das amostras do Queijo Serpa, segundo a ficha descritiva do produto.

Foram elaborados perfis sensoriais (Figura 9, 10 e 11) em que os atributos foram agrupados em três conjuntos: Aspeto e cheiro, sabor e, finalmente, textura, flavour, persistência e gosto residual. Para facilitar a interpretação de acordo com a classificação prévia dos queijos em maus, bons e muito bons, e correlacionar atributos positivos e negativos com uns ou outros, os perfis foram elaborados a partir das médias entre os queijos com a mesma classificação. Os atributos da análise sensorial apresentam algumas diferenças significativas.

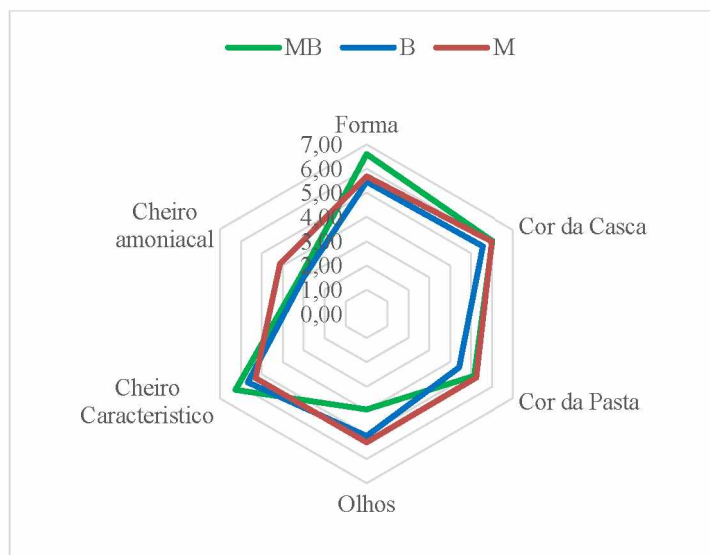


Figura 9 - Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos do aspeto e cheiro dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus).

Relativamente aos atributos estudados na Figura 9, o do cheiro é o que mais diferencia os queijos maus dos restantes, através da identificação de cheiro amoniacal, e logo um afastamento mais pronunciado do cheiro característico. Quanto aos queijos classificados como muitos bons (MB) caracterizaram-se por apresentar forma mais regular, menos olhos e claro, um cheiro mais característico.

Quanto ao sabor (Figura 10), o que mais foi associado aos queijos com menos pontuação e os diferencia dos restantes, foram os sabores picante e amargo. Os queijos muito bons destacaram-se pelo sabor menos ácido e mais doce.

Pela análise do perfil sensorial apresentado na Figura 11 podemos constatar que os atributos relacionados com o flavour e textura são os que mais diferenciam os queijos maus dos restantes.

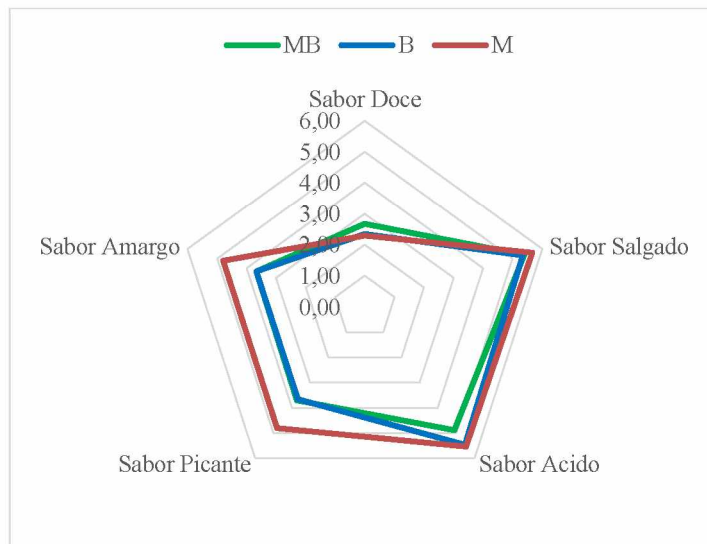


Figura 10 - Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos do sabor dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus).

Estes queijos foram caracterizados como apresentando textura pouco amanteigada e granulosa e um flavour que se afasta do característico. Esta última influenciada pelos sabores também não característicos observados.

Os queijos muito bons diferenciam-se pelo flavour característico, um pouco amanteigado, e pela textura menos granulosa. Relativamente ao gosto residual e persistência do mesmo os queijos pouco se diferenciam, mas possivelmente por motivos diferentes, num caso persistirá o bom e no outro o mau.

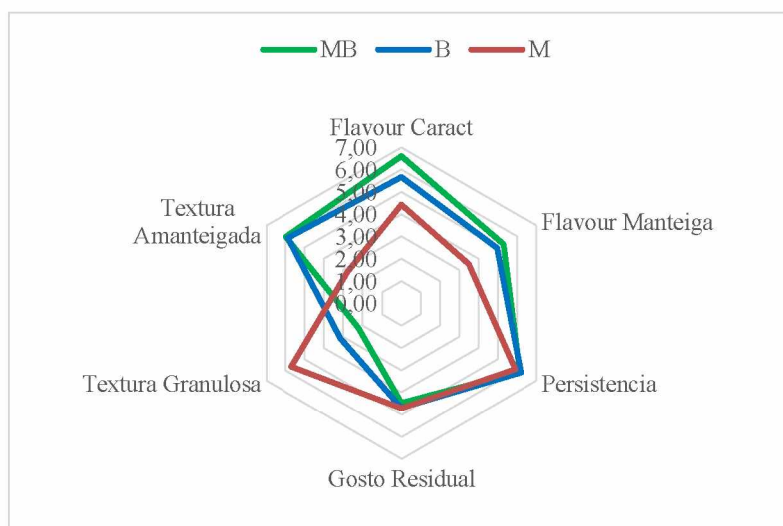


Figura 11 - Perfil sensorial com base nos valores médios da análise sensorial dos atributos textura, flavour, persistência e gosto residual dos queijos classificados em MB (Muito Bons), B (Bons) e M (Maus).

O desenvolvimento de cheiros e sabores anormais nos queijos, logo os flavours, assim como texturas que se afastam do expectável nestes produtos, podem ser o resultado do desenvolvimento de determinados microrganismos. No Apêndice IV, está a tabela referente à análise sensorial, em maior escala.



Tabela 19 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a análise sensorial.

|     | Forma                     | Cor da Casta            | Cor da Pasta             | Olhos                      | Cheiro (Característico) | Cheiro (Amoniacal)      | Textura (Granulosa)         | Textura (Amanteigada)      | Sabor (Doce)            | Sabor (Salgado)         | Sabor (Acido)           | Sabor (Plante)          | Sabor (Amargo)          | Flavour (caract.)         | Flavour (Manteiga)      | Persistência            | Gosto Residual          |
|-----|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PAL | 7,00(0,94) <sup>a</sup>   | 6,60(0,84) <sup>a</sup> | 5,50(1,27) <sup>ab</sup> | 4,30(1,83) <sup>abcd</sup> | 6,40(1,28) <sup>a</sup> | 4,20(2,10) <sup>a</sup> | 2,40(0,70) <sup>ef</sup>    | 5,50(1,65) <sup>abcd</sup> | 2,60(1,51) <sup>a</sup> | 5,40(1,65) <sup>a</sup> | 4,70(1,83) <sup>a</sup> | 3,70(1,70) <sup>a</sup> | 3,80(2,04) <sup>a</sup> | 6,10(1,29) <sup>abc</sup> | 5,20(1,23) <sup>a</sup> | 6,40(0,97) <sup>a</sup> | 4,10(2,08) <sup>a</sup> |
| PA2 | 6,90(0,57) <sup>a</sup>   | 5,80(0,92) <sup>a</sup> | 5,10(1,52) <sup>ab</sup> | 4,40(1,71) <sup>abcd</sup> | 6,10(1,37) <sup>a</sup> | 3,20(1,55) <sup>b</sup> | 2,90(1,20) <sup>def</sup>   | 5,10(1,79) <sup>abcd</sup> | 3,10(1,73) <sup>b</sup> | 4,90(1,79) <sup>a</sup> | 4,10(1,60) <sup>a</sup> | 3,50(1,72) <sup>a</sup> | 3,30(2,26) <sup>b</sup> | 6,00(1,63) <sup>abc</sup> | 4,60(2,01) <sup>a</sup> | 6,10(1,60) <sup>a</sup> | 4,60(2,27) <sup>a</sup> |
| PC1 | 6,11(1,27) <sup>a</sup>   | 5,22(1,30) <sup>a</sup> | 4,56(1,33) <sup>ab</sup> | 4,67(1,80) <sup>abcd</sup> | 5,33(1,73) <sup>a</sup> | 2,89(1,36) <sup>a</sup> | 3,33(2,00) <sup>bcd</sup>   | 5,33(1,87) <sup>abcd</sup> | 2,11(0,93) <sup>a</sup> | 4,89(1,54) <sup>a</sup> | 4,44(2,24) <sup>a</sup> | 3,11(1,69) <sup>a</sup> | 3,22(1,48) <sup>a</sup> | 5,78(1,56) <sup>abc</sup> | 4,33(1,94) <sup>a</sup> | 5,67(1,00) <sup>a</sup> | 4,11(1,69) <sup>a</sup> |
| PC2 | 5,78(1,48) <sup>ab</sup>  | 6,56(0,88) <sup>a</sup> | 5,44(1,42) <sup>ab</sup> | 3,22(1,56) <sup>bcd</sup>  | 5,78(1,86) <sup>a</sup> | 2,89(1,69) <sup>a</sup> | 2,56(0,73) <sup>def</sup>   | 6,78(1,56) <sup>b</sup>    | 2,56(1,88) <sup>b</sup> | 4,89(1,62) <sup>a</sup> | 5,22(2,59) <sup>a</sup> | 3,44(1,67) <sup>a</sup> | 3,33(1,87) <sup>a</sup> | 6,00(0,71) <sup>abc</sup> | 4,78(2,05) <sup>a</sup> | 6,56(1,51) <sup>a</sup> | 5,22(2,17) <sup>a</sup> |
| PG1 | 6,67(1,32) <sup>a</sup>   | 6,11(1,27) <sup>a</sup> | 5,11(1,17) <sup>ab</sup> | 4,44(1,74) <sup>abcd</sup> | 6,33(1,32) <sup>a</sup> | 3,00(1,87) <sup>a</sup> | 2,22(0,67) <sup>ef</sup>    | 5,22(2,05) <sup>abcd</sup> | 2,33(1,00) <sup>a</sup> | 5,56(1,33) <sup>a</sup> | 5,22(1,86) <sup>a</sup> | 3,44(1,74) <sup>a</sup> | 3,00(1,50) <sup>a</sup> | 7,00(0,87) <sup>ab</sup>  | 5,00(1,87) <sup>a</sup> | 6,33(0,87) <sup>a</sup> | 4,89(1,96) <sup>a</sup> |
| PG2 | 6,44(1,33) <sup>a</sup>   | 6,33(1,00) <sup>a</sup> | 5,56(1,24) <sup>ab</sup> | 4,33(1,66) <sup>abcd</sup> | 6,44(1,33) <sup>a</sup> | 3,11(1,90) <sup>a</sup> | 2,00(0,50) <sup>f</sup>     | 6,22(1,72) <sup>ab</sup>   | 2,33(1,22) <sup>b</sup> | 5,44(1,51) <sup>a</sup> | 4,78(1,72) <sup>a</sup> | 4,00(2,18) <sup>a</sup> | 3,78(1,79) <sup>b</sup> | 7,33(0,50) <sup>a</sup>   | 5,67(1,80) <sup>a</sup> | 6,22(1,48) <sup>a</sup> | 4,56(1,94) <sup>a</sup> |
| IA3 | 3,09(1,79) <sup>ab</sup>  | 3,73(1,56) <sup>a</sup> | 4,55(1,63) <sup>ab</sup> | 4,27(2,05) <sup>abcd</sup> | 5,55(1,51) <sup>a</sup> | 2,64(2,01) <sup>a</sup> | 2,55(1,63) <sup>def</sup>   | 6,45(1,81) <sup>a</sup>    | 3,55(2,11) <sup>a</sup> | 5,00(1,10) <sup>a</sup> | 5,00(1,79) <sup>a</sup> | 3,64(1,69) <sup>a</sup> | 3,91(2,30) <sup>a</sup> | 6,18(1,83) <sup>abc</sup> | 5,45(1,63) <sup>a</sup> | 5,82(1,17) <sup>a</sup> | 4,27(2,53) <sup>a</sup> |
| IA4 | 6,00(1,79) <sup>ab</sup>  | 5,18(1,72) <sup>a</sup> | 4,45(1,81) <sup>a</sup>  | 2,27(1,10) <sup>d</sup>    | 6,00(1,90) <sup>a</sup> | 2,18(0,75) <sup>b</sup> | 1,55(0,52) <sup>f</sup>     | 7,82(0,75) <sup>b</sup>    | 3,00(1,48) <sup>b</sup> | 5,64(1,50) <sup>a</sup> | 5,64(1,96) <sup>a</sup> | 3,91(1,97) <sup>a</sup> | 4,45(2,54) <sup>b</sup> | 6,64(1,80) <sup>abc</sup> | 6,00(1,67) <sup>a</sup> | 5,64(1,21) <sup>a</sup> | 4,27(2,37) <sup>a</sup> |
| IC3 | 4,90(1,97) <sup>abc</sup> | 6,10(2,23) <sup>a</sup> | 3,90(1,45) <sup>b</sup>  | 6,60(1,51) <sup>ab</sup>   | 4,30(1,57) <sup>a</sup> | 4,80(1,99) <sup>a</sup> | 5,50(2,72) <sup>abcde</sup> | 2,80(1,99) <sup>bcd</sup>  | 1,80(0,79) <sup>a</sup> | 5,50(2,17) <sup>a</sup> | 6,90(1,29) <sup>a</sup> | 4,10(2,23) <sup>a</sup> | 5,30(2,50) <sup>a</sup> | 3,40(1,71) <sup>c</sup>   | 3,50(2,22) <sup>a</sup> | 5,50(2,12) <sup>a</sup> | 5,00(2,45) <sup>a</sup> |
| IC4 | 5,20(2,10) <sup>abc</sup> | 6,10(2,38) <sup>a</sup> | 4,10(1,45) <sup>bc</sup> | 6,20(1,55) <sup>abc</sup>  | 4,30(2,16) <sup>a</sup> | 5,80(2,20) <sup>a</sup> | 6,60(1,51) <sup>ab</sup>    | 2,30(1,06) <sup>bcd</sup>  | 1,90(1,29) <sup>b</sup> | 5,60(2,17) <sup>a</sup> | 7,30(1,06) <sup>b</sup> | 4,90(2,56) <sup>a</sup> | 6,40(1,84) <sup>b</sup> | 3,30(1,77) <sup>c</sup>   | 3,10(2,13) <sup>a</sup> | 5,80(2,15) <sup>a</sup> | 4,70(2,31) <sup>a</sup> |
| IG3 | 6,30(1,34) <sup>a</sup>   | 6,00(1,70) <sup>a</sup> | 3,70(1,49) <sup>b</sup>  | 6,90(0,88) <sup>a</sup>    | 5,80(1,87) <sup>a</sup> | 3,40(1,96) <sup>a</sup> | 3,40(1,78) <sup>bcd</sup>   | 5,50(1,58) <sup>abc</sup>  | 1,90(0,74) <sup>a</sup> | 6,10(1,29) <sup>a</sup> | 6,40(1,35) <sup>a</sup> | 4,30(1,77) <sup>a</sup> | 3,80(1,75) <sup>a</sup> | 5,30(2,26) <sup>abc</sup> | 5,00(2,00) <sup>a</sup> | 6,40(0,84) <sup>a</sup> | 4,80(1,99) <sup>a</sup> |
| IG4 | 6,00(1,05) <sup>ab</sup>  | 6,30(1,57) <sup>a</sup> | 3,90(1,37) <sup>b</sup>  | 6,20(0,92) <sup>abc</sup>  | 5,90(1,66) <sup>a</sup> | 3,30(1,95) <sup>a</sup> | 3,90(1,73) <sup>abc</sup>   | 5,30(1,49) <sup>abcd</sup> | 1,60(0,70) <sup>a</sup> | 5,80(0,92) <sup>a</sup> | 6,30(1,16) <sup>a</sup> | 3,80(1,55) <sup>a</sup> | 4,10(2,02) <sup>b</sup> | 5,10(2,02) <sup>abc</sup> | 5,30(2,11) <sup>a</sup> | 6,60(0,70) <sup>a</sup> | 5,10(2,13) <sup>a</sup> |
| IB1 | 7,22(0,97) <sup>a</sup>   | 6,00(1,32) <sup>a</sup> | 5,11(1,54) <sup>ab</sup> | 6,22(2,05) <sup>abc</sup>  | 4,56(1,94) <sup>a</sup> | 4,25(2,49) <sup>a</sup> | 7,00(1,22) <sup>a</sup>     | 1,78(0,67) <sup>b</sup>    | 2,56(1,74) <sup>a</sup> | 5,56(2,19) <sup>a</sup> | 5,67(1,41) <sup>a</sup> | 4,56(2,19) <sup>a</sup> | 5,00(1,87) <sup>a</sup> | 3,44(1,24) <sup>b</sup>   | 2,67(1,12) <sup>a</sup> | 5,78(1,56) <sup>a</sup> | 4,56(1,59) <sup>a</sup> |
| IB2 | 7,67(0,49) <sup>a</sup>   | 5,00(1,60) <sup>a</sup> | 4,33(1,72) <sup>ab</sup> | 5,67(0,89) <sup>abcd</sup> | 6,25(0,97) <sup>a</sup> | 2,50(1,17) <sup>b</sup> | 3,17(1,40) <sup>bcd</sup>   | 4,83(1,75) <sup>abcd</sup> | 2,75(1,48) <sup>b</sup> | 4,50(1,24) <sup>a</sup> | 3,75(1,29) <sup>b</sup> | 4,00(1,76) <sup>a</sup> | 3,33(1,92) <sup>b</sup> | 6,33(1,07) <sup>abc</sup> | 4,92(1,73) <sup>a</sup> | 6,17(1,27) <sup>a</sup> | 4,50(2,02) <sup>a</sup> |
| IV1 | 2,50(1,24) <sup>a</sup>   | 7,25(1,71) <sup>a</sup> | 7,33(1,30) <sup>a</sup>  | 4,17(1,75) <sup>abcd</sup> | 6,08(2,11) <sup>a</sup> | 4,17(2,12) <sup>a</sup> | 6,00(1,48) <sup>abc</sup>   | 2,42(1,56) <sup>bcd</sup>  | 2,33(1,07) <sup>a</sup> | 6,00(1,91) <sup>a</sup> | 5,25(1,29) <sup>a</sup> | 5,92(1,56) <sup>a</sup> | 4,92(2,02) <sup>a</sup> | 4,92(1,56) <sup>abc</sup> | 3,00(2,65) <sup>a</sup> | 6,50(1,17) <sup>a</sup> | 5,25(2,26) <sup>a</sup> |
| IV2 | 6,60(1,07) <sup>a</sup>   | 5,50(1,84) <sup>a</sup> | 6,70(1,06) <sup>ab</sup> | 3,00(1,56) <sup>cd</sup>   | 6,30(0,95) <sup>a</sup> | 3,30(1,83) <sup>a</sup> | 5,90(1,66) <sup>abcd</sup>  | 2,60(0,97) <sup>bcd</sup>  | 2,40(1,35) <sup>b</sup> | 6,80(1,40) <sup>a</sup> | 4,40(1,65) <sup>a</sup> | 5,30(1,95) <sup>a</sup> | 3,80(2,04) <sup>a</sup> | 5,20(1,87) <sup>abc</sup> | 3,90(1,85) <sup>a</sup> | 5,70(1,34) <sup>a</sup> | 4,30(1,83) <sup>a</sup> |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas P<0,05, n=10 (teste Scheffé)

## 3.2. Análises Químicas

### 3.2.1. Análises Químicas Leite

Na Tabela 20 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análise de variância referentes às propriedades químicas do leite para produção do Queijo Serpa, nomeadamente, a Lactose, pH, Acidez, Gordura, Proteína, Azoto, teor de sólidos e Sólidos não gordos (SNF). O valor médio de cada parâmetro está associado a 3 repetições de cada análise(n=3).

Para avaliar as médias, desvio padrão e diferenças significativas foi utilizado o programa “IBM SPSS Statistics”. Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores médios para um determinado parâmetro, foi efetuado o teste de comparação das médias através do teste “Scheffé”.

Pela leitura da Tabela 20 podemos observar que em todos os parâmetros se observam diferenças significativas entre as diferentes amostras. Estas diferenças entre leites utilizados pelos diferentes produtores e mesmo entre os leites utilizados pelo mesmo produtores são indicadoras das diferentes proveniências dos leites utilizados, dada a dificuldade que existe em arranjar leite em quantidade suficiente para a produção aos níveis atuais. Esta diferença nas características do leite utilizado pode ser problemática em termos tecnológicos e ter influencia na qualidade do queijo obtido.

Os valores mínimos e máximos para cada parâmetro podem ser observados na Tabela referida e estão de acordo com os obtidos noutros trabalhos para leite de ovelha.

Os valores da lactose obtidos nos diferentes leites variaram entre os 4,35 e os 5,15, sendo o valor mínimo para o leite ILG5 e o máximo para o PLG2, curiosamente leite utilizado pelo mesmo produtor, embora em estações de anos diferentes, inverno com o valor mais baixo e primavera com o mais elevado.

Os valores do pH obtidos nos diferentes leites variaram entre 6,55 e os 7,14, sendo o valor mínimo para o leite PLG3 e o máximo para o ILC5. Neste caso as maiores diferenças entre a primavera e o inverno, com o valor mais baixo na primavera. Outros trabalhos revelam valores entre os 6,43 a 6,62 (Canada, 2001)

Na acidez verificou-se superior no leite utilizado na queijaria A, na primavera (PLA2) e menor na amostra ILC6, de outra queijaria e de inverno, numa concentração de 30,33 e 20,00, respetivamente. Outros trabalhos revelam valores entre os 29,67 a 33,00 (Canada, 2001), pelo que alguns leites estudados apresentam concentrações mais baixas neste parâmetro.

Os valores da Gordura obtidos nos diferentes leites variaram entre os 5,68 e os 8,34, sendo o valor mínimo para o leite PLC1 e o máximo para o ILA5. Novamente amostras de diferentes estações do ano, co maior teor de gordura no inverno o que parece acontecer na maior parte dos leites de inverno

relativamente aos de primavera. Outros trabalhos revelam valores entre os 5,63 a 6,18 (Canada, 2001), pelo que alguns leites estudados apresentam concentrações mais altas neste parâmetro.

Os valores da Proteína obtidos nos diferentes leites variam entre os 5,11 e os 5,91, sendo o valor mínimo para o leite PLA1 e o máximo para o PLC2, ambos obtidos na primavera, mas a utilizar por diferentes produtores. Outros trabalhos revelam valores de 5,87 (Canada, 2001).

Tabela 20 - Valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades químicas das amostras do leite para produção do Queijo Serpa.

|      | Lactose<br>(g/100g)       | pH                       | Acidez<br>(ml/NaOH/L)      | Gordura<br>(g/100g)      | Proteína<br>(g/100g)      | Azoto<br>(g/100g)          | Teor de Sólidos<br>(g/100g) | SNF<br>(g/100g)             |
|------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| PLA1 | 5,04(0,03) <sup>ab</sup>  | 6,70(0,05) <sup>de</sup> | 23,33(0,58) <sup>def</sup> | 6,58(0,03) <sup>e</sup>  | 5,11(0,03) <sup>f</sup>   | 0,80(0,08) <sup>abcd</sup> | 17,43(0,08) <sup>ef</sup>   | 10,85(0,06) <sup>feh</sup>  |
| PLA2 | 5,00(0,04) <sup>bcd</sup> | 6,70(0,01) <sup>de</sup> | 30,33(0,58) <sup>a</sup>   | 6,28(0,01) <sup>gh</sup> | 5,16(0,03) <sup>f</sup>   | 0,85(0,05) <sup>abcd</sup> | 17,15(0,08) <sup>fg</sup>   | 10,86(0,07) <sup>feh</sup>  |
| PLA3 | 5,12(0,03) <sup>ab</sup>  | 6,64(0,00) <sup>ef</sup> | 23,00(0,00) <sup>ef</sup>  | 5,70(0,02) <sup>j</sup>  | 5,42(0,02) <sup>de</sup>  | 0,75(0,00) <sup>cd</sup>   | 16,93(0,06) <sup>g</sup>    | 11,24(0,05) <sup>cd</sup>   |
| PLC1 | 4,99(0,05) <sup>cd</sup>  | 6,70(0,01) <sup>de</sup> | 21,00(0,00) <sup>gh</sup>  | 5,68(0,03) <sup>j</sup>  | 5,78(0,05) <sup>abc</sup> | 0,85(0,04) <sup>abcd</sup> | 17,14(0,13) <sup>fg</sup>   | 11,46(0,09) <sup>abcd</sup> |
| PLC2 | 4,81(0,03) <sup>f</sup>   | 6,72(0,01) <sup>d</sup>  | 23,33(0,58) <sup>def</sup> | 6,59(0,01) <sup>e</sup>  | 5,91(0,06) <sup>a</sup>   | 0,92(0,02) <sup>a</sup>    | 17,98(0,06) <sup>cd</sup>   | 11,39(0,05) <sup>bcd</sup>  |
| PLC3 | 4,98(0,03) <sup>cde</sup> | 6,71(0,01) <sup>de</sup> | 22,00(0,00) <sup>fg</sup>  | 5,68(0,03) <sup>j</sup>  | 5,86(0,03) <sup>ab</sup>  | 0,82(0,01) <sup>abcd</sup> | 17,22(0,09) <sup>ef</sup>   | 11,54(0,06) <sup>abc</sup>  |
| PLG1 | 5,09(0,01) <sup>ab</sup>  | 6,56(0,01) <sup>e</sup>  | 26,00(0,00) <sup>c</sup>   | 6,32(0,01) <sup>g</sup>  | 5,83(0,01) <sup>abc</sup> | 0,87(0,01) <sup>abc</sup>  | 17,93(0,01) <sup>d</sup>    | 11,61(0,01) <sup>ab</sup>   |
| PLG2 | 5,15(0,01) <sup>a</sup>   | 6,57(0,01) <sup>fg</sup> | 25,33(0,58) <sup>c</sup>   | 5,85(0,01) <sup>i</sup>  | 5,83(0,01) <sup>abc</sup> | 0,81(0,06) <sup>abcd</sup> | 17,53(0,01) <sup>e</sup>    | 11,68(0,02) <sup>a</sup>    |
| PLG3 | 4,91(0,01) <sup>def</sup> | 6,55(0,01) <sup>e</sup>  | 26,00(0,00) <sup>c</sup>   | 6,66(0,02) <sup>e</sup>  | 5,72(0,13) <sup>abc</sup> | 0,72(0,01) <sup>d</sup>    | 18,07(0,02) <sup>cd</sup>   | 11,40(0,03) <sup>bcd</sup>  |
| ILA4 | 4,48(0,00) <sup>h</sup>   | 6,93(0,01) <sup>c</sup>  | 24,33(0,58) <sup>cd</sup>  | 6,41(0,11) <sup>fg</sup> | 5,86(0,01) <sup>ab</sup>  | 0,84(0,04) <sup>abcd</sup> | 17,44(0,10) <sup>ef</sup>   | 11,03(0,01) <sup>ef</sup>   |
| ILA5 | 4,40(0,02) <sup>hi</sup>  | 6,93(0,01) <sup>c</sup>  | 23,33(0,58) <sup>def</sup> | 8,34(0,02) <sup>a</sup>  | 5,78(0,03) <sup>abc</sup> | 0,75(0,71) <sup>bcd</sup>  | 19,23(0,08) <sup>a</sup>    | 10,88(0,06) <sup>feh</sup>  |
| ILA6 | 4,63(0,02) <sup>g</sup>   | 6,61(0,03) <sup>fg</sup> | 22,00(0,00) <sup>fg</sup>  | 6,66(0,04) <sup>e</sup>  | 5,40(0,03) <sup>de</sup>  | 0,84(0,01) <sup>abcd</sup> | 17,39(0,08) <sup>ef</sup>   | 10,73(0,05) <sup>gh</sup>   |
| ILC4 | 4,36(0,01) <sup>j</sup>   | 7,00(0,01) <sup>bc</sup> | 21,67(0,58) <sup>feh</sup> | 6,15(0,02) <sup>h</sup>  | 5,30(0,01) <sup>ef</sup>  | 0,85(0,01) <sup>abcd</sup> | 16,51(0,03) <sup>h</sup>    | 10,36(0,02) <sup>i</sup>    |
| ILC5 | 4,50(0,00) <sup>h</sup>   | 7,14(0,01) <sup>a</sup>  | 24,33(0,58) <sup>cd</sup>  | 6,54(0,00) <sup>ef</sup> | 5,71(0,01) <sup>abc</sup> | 0,89(0,00) <sup>ab</sup>   | 17,44(0,01) <sup>ef</sup>   | 10,91(0,01) <sup>fg</sup>   |
| ILC6 | 4,87(0,03) <sup>ef</sup>  | 6,71(0,01) <sup>d</sup>  | 20,00(0,00) <sup>h</sup>   | 1,06(0,01) <sup>d</sup>  | 5,66(0,03) <sup>bc</sup>  | 0,86(0,03) <sup>abcd</sup> | 18,28(0,07) <sup>c</sup>    | 11,22(0,06) <sup>cd</sup>   |
| ILG4 | 4,52(0,03) <sup>gh</sup>  | 6,56(0,01) <sup>e</sup>  | 25,00(0,00) <sup>cd</sup>  | 8,03(0,01) <sup>b</sup>  | 5,83(0,04) <sup>abc</sup> | 0,79(0,01) <sup>abcd</sup> | 19,08(0,08) <sup>ab</sup>   | 11,05(0,06) <sup>ef</sup>   |
| ILG5 | 4,35(0,01) <sup>j</sup>   | 7,01(0,01) <sup>b</sup>  | 28,00(0,00) <sup>b</sup>   | 7,63(0,02) <sup>c</sup>  | 5,61(0,03) <sup>cd</sup>  | 0,73(0,01) <sup>cd</sup>   | 18,28(0,01) <sup>c</sup>    | 10,65(0,03) <sup>h</sup>    |
| ILG6 | 4,84(0,01) <sup>f</sup>   | 6,57(0,01) <sup>e</sup>  | 25,67(0,58) <sup>c</sup>   | 7,57(0,03) <sup>c</sup>  | 5,77(0,01) <sup>abc</sup> | 0,86(0,02) <sup>abc</sup>  | 18,87(0,02) <sup>b</sup>    | 11,30(0,01) <sup>cd</sup>   |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0,05$ ,  $n=3$  (teste *Scheffé*)

Os valores da Azoto obtidos nos diferentes leites variam entre os 0,72 e os 0,92, sendo o valor mínimo para o leite PLG3 e o máximo para o PLC2.

Os valores do Teor de Sólidos obtidos nos diferentes leites variam entre os 16,51 e os 19,23, sendo o valor mínimo para o leite ILC4 e o máximo para o ILA5. O teor de sólidos das amostras, apresentam diferenças significativas entre elas.

Os valores da SNF (Sólidos não gordos) obtidos nos diferentes leites variam entre os 10,36 e os 11,68, sendo o valor mínimo para o leite ILC4 e o máximo para o PLG2. O SNF das amostras, apresentam diferenças significativas entre elas.

### 3.2.2. Análises Químicas Queijo

Na Tabela 21 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades químicas das amostras do Queijo Serpa, nomeadamente, pH,  $a_w$ , Humidade, HQIMG,

Acidez, Cloretos, Gordura, MGRS%, Proteína, Azoto total, Azoto solúvel e coeficiente de maturação. Estes valores médios foram obtidos a partir de duas amostras da mesma época, em duas épocas diferentes (Primavera e Inverno) de três produtores DOP e de dois produtores não certificados (apenas temporada Inverno). O valor médio está associado a 3 repetições de cada análise (n=3).

O pH tem uma grande importância na maturação do queijo devido a sua influência na atividade proteolítica e no seu controlo durante e depois do processo para provar que a fermentação láctica se desenvolve em condições normais.

Os valores do pH obtidos nos diferentes queijos variam entre 4,86 e os 5,51, sendo o valor mínimo para o queijo PC1 e o máximo para o PA1, ambos pertencentes a um produtor DOP. O pH das amostras, apresentam diferenças significativas entre elas. Os valores estão segundo o regulamento 39/87 (4,9 e 5,7), menos a amostra PC1 (4,89). O valor médio do pH é 5,17. Os resultados são idênticos aos estudados em trabalhos anteriores, Canada (1991), Canada (2001), Amaral (1996), Roseiro (2003) Alvarenga (2008).

Os valores da acidez variam entre os 5,33 e os 13,60, sendo o maior valor para o queijo IB1. A acidez das amostras, apresentam diferenças significativas, tendo as amostras IV2 e IA4 maior diferença significativa em relação as outras amostras. As amostras PC1, PC2, IG3, IG4 e IB2 também apresentam diferenças significativas em relação às outras amostras. O valor médio da acidez é 9,78. Os resultados obtidos são comparáveis com os obtidos em trabalhos anteriores como Roseiro (2003), mas superiores a outros trabalhos Canada (1991), Canada (2001), Amaral (1996) e Alvarenga (2008).

Os valores da humidade obtidos dos diferentes queijos oscilam entre 37,89 e os 52,81, sendo o de menor valor o queijo IV2 e o de maior pertence ao queijo IB2, ambos são queijos que não pertencem aos DOP. Os queijos PG1, IG3 e IG4, pertencentes aos queijos DOP, tiveram características similares, os restantes dos queijos tiveram diferenças significativas. O valor médio da Humidade é 46,49. Os resultados obtidos são idênticos aos estudados em trabalhos anteriores Alvarenga (2000). Segundo o Reg. 39/87 (61-67) os valores estão abaixo destes parâmetros.

Os valores obtidos do HQIMG (humidade isenta de matéria gorda) variam entre os 55,18 e os 65,81. O maior valor pertence ao queijo IB1 e o menor valor o queijo IV2, ambos queijos que não pertencem aos DOP. Os queijos PA2, PC1 e PG2 tiveram valores similares, como os queijos IA4, IC3 e IG3. Os restantes queijos tiveram diferenças significativas. Quanto ao teor de humidade isento de gordura os queijos PA1, PC2, IG4 e IV2 é classificado como queijos semiduros, os restantes queijos são classificados em semi-moles. O valor médio da HQIMG é 62,54. Os queijos PA1, PC2, IV1 e IV2 estão abaixo do valor indicado para queijo Serpa (61 a 69%), no Reg. 39/87. Os resultados obtidos são idênticos aos estudados em trabalhos anteriores Canada (1991).

Os valores do  $a_w$  variam entre 0,877 e 0,995, sendo o maior valor dos queijos PA1 e PA2 do grupo dos queijos DOP e o menor valor dão queijo IV2, queijo não DOP. Apenas o queijo IV2 apresentou diferenças

Tabela 21 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes as análises químicas.

|     | pH                       | a <sub>w</sub> (%)        | Umidade %<br>(m/m)          | HQIMG<br>% (m/m)             | Acidez<br>(NaOH<br>N/100ml) | Cloretos<br>% (m/m)      | Gordura<br>% (m/m)        | MGRS %                      | Azoto total<br>% (m/m)     | Proteína<br>% (m/m)         | Azoto Solúvel<br>% (m/m) | Coefficiente de<br>Maturação (%) |
|-----|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| PA1 | 5,51(0,03) <sup>a</sup>  | 0,995(0,00) <sup>a</sup>  | 46,00(0,09) <sup>efg</sup>  | 59,75(0,11) <sup>g</sup>     | 11,73(0,46) <sup>ab</sup>   | 2,76(0,01) <sup>c</sup>  | 23,00(0,00) <sup>e</sup>  | 42,60(0,07) <sup>gh</sup>   | 5,54(0,06) <sup>a</sup>    | 35,32(0,37) <sup>a</sup>    | 1,13(0,03) <sup>b</sup>  | 20,47(0,72) <sup>def</sup>       |
| PA2 | 5,46(0,03) <sup>a</sup>  | 0,995(0,00) <sup>a</sup>  | 48,50(0,14) <sup>cd</sup>   | 64,38(0,42) <sup>abcd</sup>  | 11,20(0,00) <sup>ab</sup>   | 2,44(0,00) <sup>fg</sup> | 24,67(0,29) <sup>de</sup> | 47,89(0,68) <sup>def</sup>  | 5,42(0,05) <sup>a</sup>    | 34,56(0,29) <sup>a</sup>    | 1,11(0,04) <sup>b</sup>  | 20,43(0,56) <sup>def</sup>       |
| PC1 | 4,86(0,06) <sup>d</sup>  | 0,994(0,00) <sup>a</sup>  | 43,99(0,35) <sup>gh</sup>   | 64,85(0,49) <sup>abcd</sup>  | 8,00(1,06) <sup>cd</sup>    | 1,75(0,00) <sup>k</sup>  | 32,17(0,29) <sup>a</sup>  | 57,43(0,51) <sup>a</sup>    | 3,12(0,15) <sup>de</sup>   | 19,91(0,95) <sup>e</sup>    | 0,89(0,01) <sup>d</sup>  | 28,50(1,15) <sup>bcd</sup>       |
| PC2 | 5,12(0,08) <sup>c</sup>  | 0,994(0,00) <sup>a</sup>  | 42,85(0,34) <sup>h</sup>    | 60,64(0,25) <sup>fg</sup>    | 8,00(0,40) <sup>cd</sup>    | 2,19(0,01) <sup>j</sup>  | 29,33(0,58) <sup>bc</sup> | 51,32(0,76) <sup>bc</sup>   | 3,14(0,02) <sup>cde</sup>  | 20,01(0,12) <sup>e</sup>    | 1,13(0,04) <sup>b</sup>  | 36,16(1,06) <sup>ab</sup>        |
| PG1 | 5,35(0,10) <sup>ab</sup> | 0,974(0,00) <sup>a</sup>  | 47,59(0,56) <sup>cdef</sup> | 65,19(0,76) <sup>abc</sup>   | 11,47(0,83) <sup>ab</sup>   | 2,35(0,02) <sup>h</sup>  | 27,00(0,00) <sup>cd</sup> | 51,52(0,54) <sup>bc</sup>   | 3,84(0,37) <sup>bcd</sup>  | 24,52(2,36) <sup>bc</sup>   | 0,93(0,01) <sup>cd</sup> | 24,48(2,81) <sup>de</sup>        |
| PG2 | 5,36(0,12) <sup>ab</sup> | 0,978(0,01) <sup>a</sup>  | 45,60(0,40) <sup>g</sup>    | 64,23(0,37) <sup>abcd</sup>  | 10,40(0,69) <sup>bc</sup>   | 2,39(0,01) <sup>gh</sup> | 29,00(1,00) <sup>bc</sup> | 53,30(1,46) <sup>ab</sup>   | 2,92(0,02) <sup>e</sup>    | 18,62(0,14) <sup>e</sup>    | 1,03(0,05) <sup>bc</sup> | 35,15(1,46) <sup>abc</sup>       |
| IA3 | 5,00(0,01) <sup>cd</sup> | 0,959(0,02) <sup>a</sup>  | 48,43(0,59) <sup>cde</sup>  | 62,89(0,77) <sup>cdef</sup>  | 11,40(0,20) <sup>ab</sup>   | 2,66(0,03) <sup>d</sup>  | 23,00(0,00) <sup>e</sup>  | 44,60(0,51) <sup>gh</sup>   | 3,31(0,08) <sup>bode</sup> | 21,12(0,49) <sup>cote</sup> | 0,92(0,00) <sup>cd</sup> | 27,81(0,66) <sup>bcd</sup>       |
| IA4 | 5,16(0,01) <sup>bc</sup> | 0,969(0,01) <sup>a</sup>  | 49,10(0,51) <sup>bc</sup>   | 63,77(0,66) <sup>abcde</sup> | 5,33(0,46) <sup>d</sup>     | 2,54(0,01) <sup>e</sup>  | 23,00(0,00) <sup>e</sup>  | 45,19(0,45) <sup>efgh</sup> | 3,77(0,02) <sup>bcd</sup>  | 24,08(0,16) <sup>bcd</sup>  | 0,44(0,02) <sup>f</sup>  | 11,63(0,45) <sup>f</sup>         |
| IC3 | 5,01(0,01) <sup>cd</sup> | 0,984(0,00) <sup>a</sup>  | 58,85(0,56) <sup>bcd</sup>  | 63,03(0,61) <sup>bcdef</sup> | 10,53(1,01) <sup>bc</sup>   | 2,49(0,01) <sup>ef</sup> | 22,50(0,50) <sup>e</sup>  | 43,99(0,83) <sup>gh</sup>   | 3,40(0,06) <sup>bode</sup> | 21,70(0,40) <sup>bode</sup> | 0,71(0,02) <sup>e</sup>  | 20,86(0,20) <sup>de</sup>        |
| IC4 | 5,05(0,02) <sup>cd</sup> | 0,986(0,00) <sup>a</sup>  | 46,56(1,25) <sup>cdef</sup> | 62,52(0,44) <sup>def</sup>   | 11,73(0,61) <sup>ab</sup>   | 2,32(0,01) <sup>h</sup>  | 24,50(0,71) <sup>de</sup> | 46,40(0,66) <sup>defg</sup> | 3,27(0,10) <sup>bode</sup> | 21,69(1,71) <sup>bode</sup> | 0,71(0,02) <sup>e</sup>  | 21,04(1,19) <sup>de</sup>        |
| IG3 | 4,95(0,01) <sup>cd</sup> | 0,957(0,05) <sup>a</sup>  | 47,70(0,41) <sup>cdef</sup> | 63,05(1,03) <sup>bcdef</sup> | 8,93(0,61) <sup>bc</sup>    | 2,23(0,02) <sup>i</sup>  | 24,33(0,58) <sup>e</sup>  | 46,54(1,48) <sup>defg</sup> | 3,07(0,12) <sup>de</sup>   | 19,60(0,78) <sup>e</sup>    | 0,65(0,02) <sup>e</sup>  | 21,21(1,44) <sup>de</sup>        |
| IG4 | 4,94(0,01) <sup>cd</sup> | 0,991(0,00) <sup>a</sup>  | 46,72(1,20) <sup>cdef</sup> | 61,20(0,88) <sup>efg</sup>   | 9,07(0,83) <sup>bc</sup>    | 2,07(0,01) <sup>j</sup>  | 23,67(1,15) <sup>e</sup>  | 44,41(1,37) <sup>gh</sup>   | 3,02(0,16) <sup>de</sup>   | 19,24(1,04) <sup>e</sup>    | 0,62(0,00) <sup>e</sup>  | 20,59(1,06) <sup>de</sup>        |
| IB1 | 4,96(0,02) <sup>cd</sup> | 0,952(0,01) <sup>ab</sup> | 51,00(0,10) <sup>ab</sup>   | 65,81(0,38) <sup>a</sup>     | 13,60(0,40) <sup>a</sup>    | 0,00(0,00) <sup>i</sup>  | 22,50(0,50) <sup>e</sup>  | 45,92(0,98) <sup>efg</sup>  | 2,66(0,56) <sup>e</sup>    | 20,47(0,34) <sup>de</sup>   | 0,69(0,02) <sup>e</sup>  | 26,73(6,02) <sup>cd</sup>        |
| IB2 | 5,10(0,06) <sup>c</sup>  | 0,966(0,01) <sup>a</sup>  | 52,81(0,07) <sup>a</sup>    | 65,60(0,63) <sup>ab</sup>    | 9,07(0,46) <sup>bc</sup>    | 2,53(0,04) <sup>e</sup>  | 19,50(0,87) <sup>f</sup>  | 41,32(1,78) <sup>h</sup>    | 3,47(0,04) <sup>bode</sup> | 22,17(0,30) <sup>bode</sup> | 0,59(0,05) <sup>e</sup>  | 17,01(1,31) <sup>ef</sup>        |
| IV1 | 5,46(0,02) <sup>a</sup>  | 0,933(0,01) <sup>ab</sup> | 40,32(0,21) <sup>i</sup>    | 57,05(0,36) <sup>h</sup>     | 10,00(0,80) <sup>bc</sup>   | 3,43(0,01) <sup>b</sup>  | 29,33(0,58) <sup>bc</sup> | 49,15(0,86) <sup>bode</sup> | 3,39(0,14) <sup>bc</sup>   | 25,27(0,88) <sup>b</sup>    | 1,49(0,04) <sup>a</sup>  | 37,73(2,38) <sup>a</sup>         |
| IV2 | 5,52(0,04) <sup>a</sup>  | 0,864(0,01) <sup>b</sup>  | 37,89(0,06) <sup>i</sup>    | 55,18(0,32) <sup>h</sup>     | 6,00(0,00) <sup>d</sup>     | 4,16(0,03) <sup>a</sup>  | 31,33(0,29) <sup>ab</sup> | 50,45(0,51) <sup>bcd</sup>  | 4,03(0,03) <sup>b</sup>    | 25,63(0,34) <sup>b</sup>    | 1,15(0,03) <sup>b</sup>  | 28,52(0,96) <sup>bcd</sup>       |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas P<0,05, n=3 (teste Scheffé)

significativas em relação aos restantes. O valor médio da  $a_w$  é 0,97. Os valores dos queijos IA3, IA4, IG3, IB1, IB2 são idênticos aos estudados em trabalhos anteriores Canada (2001), já o queijo IV1 e IV2 tem os valores mais baixos que os observados por este investigador.

A determinação dos cloretos é um parâmetro importante em termos físico-químicos, mas também microbiológicos devido à influência que exerce sobre a atividade da água, a qual afeta o desenvolvimento microbiano (Canada, 2001). O sal atua assim como conservante e contribui, diretamente, para o sabor e qualidade.

Os valores dos cloretos variaram entre 1,75 e 4,16, pertencendo o menor valor ao queijo PC1 que é um queijo DOP e o maior valor ao queijo IV2 que é um queijo que não pertence aos DOP. Para o queijo IB1 não foi efetuada a determinação de cloretos. Quanto aos cloretos, há diferenças significativas entre todos os queijos. O valor médio dos Cloretos é 2,39. De uma maneira geral os resultados são idênticos aos obtidos em estudos anteriores, exceto os do PC1 e do IV2, (Canada, 1991; Canada, 2001; Amaral,1996; Alvarenga,2000).

A gordura tem uma influência fundamental no desenvolvimento das características texturais e na formação de aroma. Os valores da gordura variam entre 19,50 e 32,17, sendo o valor menor para o queijo IB2 e o maior valor para o queijo PC1. Os queijos PA1, IA3, IA4, IC3, IG3, IG4, e IB1 não apresentam diferenças significativas entre eles, ao contrário dos restantes. O valor médio da Gordura é 25,55. Os resultados são idênticos a estudos efetuados anteriormente (Alvarenga,2000).

No MGRS % (Matéria Gorda no Resíduo Seco) os valores variam entre 41,3 e 57,43. O maior valor corresponde ao queijo PC1 e o menor valor pertence ao queijo IB2. Os queijos IC4 e IG3 tem valores similares, enquanto os restantes queijos tem diferenças significativas. O valor médio da MGRS% é 47,63. Segundo o Reg. 39/97, os queijos PA1, IA3, IG4 e o IB2 estão abaixo do estipulado (45% a 60%) para queijo Serpa. No entanto os valores obtidos são idênticos aos resultados estudados em trabalhos anteriores (Alvarenga, 2000; Roseiro, 2003).

Os valores do azoto total variam entre 2,67 e 5,54. O valor mínimo corresponde ao queijo IB1 e o de maior valor corresponde ao queijo PA1. Os queijos IA3, IC3, IC4 são queijos DOP e IB2 é um queijo que não pertence aos queijos DOP, apresentam valores semelhantes. Os restantes queijos têm diferenças significativas no que respeita ao teor de azoto. O valor médio do azoto total é 3,62. Os valores são semelhantes a outros estudos efetuados em queijo Serpa (Alvarenga, 2008).

A proteína apresenta valores entre 18,62 e 35,32, sendo o maior valor o do queijo PA1 e o menor valor o do queijo PG2, ambos pertencentes ao grupo dos queijos DOP. OS queijos PC1, PC2, PG2, IG3 e IG4 não apresentam diferenças significativas, os restantes apresentam diferenças significativas. O valor médio da Proteína é 23,37. Os valores são semelhantes a estudos efetuados anteriormente (Canada, 1991; Canada,

2001; Amaral,1996) exceto as amostras PA1 e PA2 que apresentam valores superiores aos observados nesses trabalhos.

Os valores do azoto solúvel variam entre os 0,44 e 1,49. O menor valor corresponde ao queijo IA4 que é um queijo DOP e ao de maior valor corresponde ao queijo IV1 que é que queijo que não pertence os DOP. OS queijos IC3, IC3, IG3, IG4, IB1 e IB2 tem características semelhantes. Os restantes queijos apresentam diferenças significativas. O valor médio do azoto solúvel é 0,89. Os valores são semelhantes aos estudos feitos por Alvarenga (2008), mas valores mais baixos do que os obtidos por Alvarenga (2000).

Relativamente ao Coeficiente de Maturação os valores variam entre 11,63 e os 37,73. O menor valor corresponde ao queijo IA4 e o de maior valor corresponde ao queijo IV1. Entre os queijos IC3, IC4, IG3 e IG4 não há diferenças significativas, já nos outros queijos existem diferenças significativas neste parâmetro. O valor médio do coeficiente de maturação é 24,90. Os valores estão abaixo do estabelecido pelo Reg. 38/87. Os valores estão próximos dos obtidos em trabalhos anteriores (Amaral, 1996).

### 3.3. Análises Físicas

Na Tabela 22 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades físicas das amostras do Queijo Serpa, nomeadamente os parâmetros da Textura, Dureza, Adesividade e Coesividade. Quanto às propriedades da textura os queijos que não pertencem aos DOP apresentam valores muito superiores aos queijos DOP.

Tabela 22 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a dureza, adesividade e coesividade.

|     | Dureza (N)                | Adesividade(-N.mm)        | Coesividade                  |
|-----|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| PA1 | 7,51(0,36) <sup>d</sup>   | 30,85(3,02) <sup>a</sup>  | 0,57(0,01) <sup>bcddef</sup> |
| PA2 | 11,22(0,26) <sup>d</sup>  | 44,25(3,85) <sup>a</sup>  | 0,61(0,02) <sup>bcd</sup>    |
| PC1 | 2,54(0,11) <sup>d</sup>   | 15,52(1,79) <sup>a</sup>  | 0,69(0,01) <sup>ab</sup>     |
| PC2 | 2,23(0,07) <sup>d</sup>   | 13,51(2,08) <sup>a</sup>  | 0,65(0,07) <sup>abc</sup>    |
| PG1 | 5,46(0,80) <sup>d</sup>   | 11,61(1,10) <sup>a</sup>  | 0,58(0,07) <sup>bcde</sup>   |
| PG2 | 5,65(1,00) <sup>d</sup>   | 13,25(3,27) <sup>a</sup>  | 0,56(0,04) <sup>bcddef</sup> |
| IA3 | 7,39(0,16) <sup>d</sup>   | 27,50(1,34) <sup>a</sup>  | 0,59(0,02) <sup>bcd</sup>    |
| IA4 | 3,45(0,47) <sup>d</sup>   | 16,17(0,46) <sup>a</sup>  | 0,89(0,18) <sup>a</sup>      |
| IC3 | 10,66(0,81) <sup>d</sup>  | 6,63(0,82) <sup>a</sup>   | 0,32(0,01) <sup>f</sup>      |
| IC4 | 6,55(0,63) <sup>d</sup>   | 5,92(0,51) <sup>a</sup>   | 0,33(0,01) <sup>ef</sup>     |
| IG3 | 3,73(0,19) <sup>d</sup>   | 9,00(4,73) <sup>a</sup>   | 0,45(0,03) <sup>bcddef</sup> |
| IG4 | 5,79(0,27) <sup>d</sup>   | 11,02(3,26) <sup>a</sup>  | 0,46(0,02) <sup>bcddef</sup> |
| IB1 | 49,74(10,03) <sup>b</sup> | 56,99(17,02) <sup>a</sup> | 0,36(0,01) <sup>def</sup>    |
| IB2 | 16,25(0,76) <sup>d</sup>  | 81,71(92,05) <sup>a</sup> | 0,54(0,05) <sup>bcddef</sup> |
| IV1 | 33,89(1,75) <sup>c</sup>  | 68,26(11,23) <sup>a</sup> | 0,43(0,01) <sup>def</sup>    |
| IV2 | 91,83(4,63) <sup>a</sup>  | 99,49(50,97) <sup>a</sup> | 0,39(0,05) <sup>def</sup>    |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0.05$ ,  $n=3$  (teste *Scheffé*)

A textura dá-nos informações sobre a estrutura do queijo. As características de textura sofrem modificações significativas ao longo da maturação devido ao desenvolvimento e atividade microbianos, a diminuição da  $a_w$ , atividade enzimática, redistribuição do sal, alterações do pH e produção de ácido láctico.

A dureza varia entre os 2,23 e os 91,83. O menor valor corresponde ao queijo PC2, queijo DOP e o maior valor corresponde ao queijo IV2, queijo que não pertence aos DOP. Os queijos DOP são semelhantes, só existindo diferenças significativas entre os queijos que não pertencem aos DOP. A média da dureza é 16,49. Os queijos DOP tem valores semelhantes aos obtidos por Alvarenga (2008).

Quanto à adesividade o valor mais baixo, 5,92 corresponde ao queijo IC4 e o maior, 99,49 corresponde ao queijo IV2. Embora a média e o desvio padrão sejam diferentes nas amostras não há diferenças significativas entre os queijos. A média da adesividade é 31,99. Os queijos DOP tem valores aproximados ao obtidos em trabalhos anteriores por Alvarenga (2008).

A coesividade tem como valor mais baixo 0,32 que corresponde ao queijo IC3 e de maior valor que corresponde ao queijo IA4. A média da coesividade dos queijos é 0,53. Os queijos PA1, PG2, IG3, IG4 e IB2 são semelhantes. Os outros queijos têm diferenças significativas. OS valores são próximos dos obtidos por Alvarenga (2008).

Na Tabela 23 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades físicas das amostras do Queijo Serpa, nomeadamente os parâmetros da cor da crosta e a cor da pasta.

Tabela 23 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, para os parâmetros da cor da pasta e cor da crosta.

|     | Crosta                        |                           |                             | Pasta                      |                             |                           |
|-----|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|     | Cor Crosta L*                 | Cor Crosta a*             | Cor Crosta b*               | Cor Pasta L*               | Cor Pasta a*                | Cor Pasta b*              |
| PA1 | 59,78(1,09) <sup>ef</sup>     | -5,43(0,31) <sup>e</sup>  | 23,20(0,86) <sup>abc</sup>  | 81,54(0,89) <sup>de</sup>  | -5,69(0,17) <sup>hi</sup>   | 16,15(0,55) <sup>d</sup>  |
| PA2 | 62,13(0,65) <sup>bcdef</sup>  | -6,52(0,17) <sup>f</sup>  | 23,49(1,01) <sup>abc</sup>  | 84,15(0,87) <sup>bcd</sup> | -5,80(0,15) <sup>j</sup>    | 16,57(0,50) <sup>cd</sup> |
| PC1 | 67,59(0,91) <sup>abc</sup>    | -3,77(0,20) <sup>cd</sup> | 21,33(1,39) <sup>bcd</sup>  | 85,13(1,46) <sup>bcd</sup> | -5,63(0,14) <sup>fghi</sup> | 17,88(0,45) <sup>bc</sup> |
| PC2 | 63,23(0,56) <sup>abcdef</sup> | -3,78(0,18) <sup>cd</sup> | 20,38(0,84) <sup>cde</sup>  | 85,35(1,73) <sup>bcd</sup> | -5,66(0,18) <sup>ghi</sup>  | 18,47(0,60) <sup>b</sup>  |
| PG1 | 60,57(1,23) <sup>def</sup>    | -4,47(0,56) <sup>de</sup> | 22,49(1,05) <sup>abcd</sup> | 85,39(2,70) <sup>bcd</sup> | -5,25(0,20) <sup>defg</sup> | 16,33(0,80) <sup>d</sup>  |
| PG2 | 61,10(0,44) <sup>cdef</sup>   | -3,98(0,22) <sup>cd</sup> | 21,84(1,87) <sup>abcd</sup> | 84,38(1,58) <sup>bcd</sup> | -5,23(0,11) <sup>cdef</sup> | 16,71(0,74) <sup>cd</sup> |
| IA3 | 57,94(0,44) <sup>f</sup>      | -3,27(0,21) <sup>c</sup>  | 14,36(0,54) <sup>f</sup>    | 83,88(3,28) <sup>cd</sup>  | -4,47(0,21) <sup>ab</sup>   | 12,81(0,45) <sup>f</sup>  |
| IA4 | 68,63(10,11) <sup>ab</sup>    | -3,38(0,27) <sup>c</sup>  | 17,60(0,86) <sup>ef</sup>   | 86,83(2,26) <sup>abc</sup> | -4,11(0,26) <sup>a</sup>    | 13,48(1,43) <sup>ef</sup> |
| IC3 | 69,61(3,49) <sup>a</sup>      | -1,98(1,34) <sup>b</sup>  | 24,63(3,34) <sup>ab</sup>   | 91,05(5,39) <sup>a</sup>   | -5,23(0,15) <sup>cdef</sup> | 16,39(0,61) <sup>cd</sup> |
| IC4 | 67,32(4,18) <sup>abcd</sup>   | -0,38(0,61) <sup>a</sup>  | 20,14(2,18) <sup>cde</sup>  | 89,03(1,30) <sup>ab</sup>  | -5,26(0,15) <sup>defg</sup> | 16,55(0,38) <sup>cd</sup> |
| IG3 | 65,37(1,04) <sup>abcde</sup>  | -3,23(0,35) <sup>c</sup>  | 20,69(0,91) <sup>cde</sup>  | 85,09(1,18) <sup>bcd</sup> | -4,82(0,21) <sup>bc</sup>   | 14,41(0,59) <sup>e</sup>  |
| IG4 | 65,41(1,00) <sup>abcde</sup>  | -3,70(0,12) <sup>cd</sup> | 19,45(0,47) <sup>de</sup>   | 86,65(1,20) <sup>abc</sup> | -4,84(0,18) <sup>bcd</sup>  | 14,17(0,66) <sup>ef</sup> |
| IB1 | 62,06(0,99) <sup>bcdef</sup>  | -3,51(0,46) <sup>cd</sup> | 25,15(2,11) <sup>a</sup>    | 84,77(2,24) <sup>bcd</sup> | -5,16(0,15) <sup>cde</sup>  | 14,57(0,32) <sup>e</sup>  |
| IB2 | 62,45(0,69) <sup>bcdef</sup>  | -3,69(0,13) <sup>cd</sup> | 15,14(1,59) <sup>f</sup>    | 82,48(0,93) <sup>cde</sup> | -5,34(0,13) <sup>defg</sup> | 14,43(0,48) <sup>e</sup>  |
| IV1 | 65,06(1,05) <sup>abcde</sup>  | -0,50(0,39) <sup>a</sup>  | 20,54(1,08) <sup>cde</sup>  | 80,89(1,54) <sup>de</sup>  | -7,21(0,26) <sup>k</sup>    | 20,94(0,80) <sup>a</sup>  |
| IV2 | 65,53(0,60) <sup>abcde</sup>  | -3,46(0,16) <sup>cd</sup> | 22,05(0,91) <sup>abcd</sup> | 78,81(1,13) <sup>e</sup>   | -6,69(0,18) <sup>j</sup>    | 19,27(0,43) <sup>b</sup>  |

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0,05$ ,  $n=5$  (teste *Scheffé*)



Quanto à cor da crosta dos queijos obtiveram-se valores de luminosidade entre 57,94 e os 69,61, com maior luminosidade para o queijo IC3 e menor luminosidade para o queijo IA3. Quanto ao parâmetro  $a^*$  os resultados obtidos variam entre -6,52 e os -0,38, o que indica que a cor dos queijos se encontra próximo do centro do eixo verde/vermelho que varia entre os -60 e os +60, com ligeira tendência para o verde. O queijo mais esverdeado é o queijo PA2. Em relação ao parâmetro  $b^*$ , azul/amarelo (-60/+60), varia entre os 14,36 e os 25,15, este parâmetro põe em evidencia a cor amarela dos queijos. O queijo IB1 é o queijo mais amarelado, o queijo menos amarelado é o queijo IA3.

Quanto à cor da pasta dos queijos obtiveram-se valores de luminosidade entre 78,81 e os 91,05, com maior luminosidade para o queijo IC3 e menor luminosidade para o queijo IV2. Quanto ao parâmetro  $a^*$  os resultados obtidos variam entre -7,21 e os -4,11, o que indica que as cores dos queijos se encontram um pouco afastados do centro do eixo verde/vermelho que varia entre os -60 e os +60, com tendência para o verde. O queijo mais esverdeado é o IC3 e o menos esverdeado é o queijo IV1. Em relação ao parâmetro  $b^*$ , azul/amarelo (-60/+60), varia entre os 12,81 e os 20,94. O queijo com a pasta mais amarelada é o queijo IV1, o queijo com a pasta menos amarelada é o queijo IA3. Há diferenças significativas na cor dos queijos.

Comparando os parâmetros da cor da crosta e a cor da pasta estes diferem nos três parâmetros. Quanto à crosta os parâmetros  $L^*$  e  $a^*$ , os queijos são mais escuros e menos esverdeados do que a pasta. No parâmetro  $b^*$ , a crosta é mais amarelada que a pasta.

### 3.4. Análises Microbiologias

#### 3.4.1. Caracterização microbiológica quantitativa de leite utilizado no fabrico de queijo Serpa

Na caracterização microbiológica do leite utilizado na produção de queijo Serpa é de salientar a ausência de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella spp.* em todas as amostras estudadas.

Na Tabela 24 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades microbiológicas das amostras do leite para fabrico do Queijo Serpa, expressos em log ufc/g, nomeadamente para a contagem total, Enterobactérias, *E. coli*, Estafilococos coagulase positiva e negativa, Fungos e bactérias lácticas como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

A contagem total de microrganismos mesófilos fornece uma ideia sobre a população microbiana total nas amostras estudadas. A contagem total nos leites varia entre 3,63 log ufc/mL e os 6,59 log ufc/mL. A menor contagem corresponde ao leite PLC2 e a maior contagem corresponde ao leite PLG1, ambos de primavera. Estes leites apresentam diferenças significativas em relação aos outros leites. Verificam-se diferenças significativas entre os valores obtidos para a contagem total das diferentes amostras.

Tabela 24 - Valores médios, desvio padrão e resultados da variância do Leite para fabrico do Queijo Serpa de vos produtores e duas épocas difere em log ufc/g.

|      | Contagem total mesófilos | Enterobactérias              | <i>E. coli</i>           | Estafilococos coag. positiva | Estafilococos coag. negativa | <i>Lactobacillus spp.</i>   | <i>Lactococcus spp.</i>      | <i>Leuconostoc spp.</i>  | <i>Streptococcus spp.</i>   | Fungos                     |
|------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| PLA1 | 4,53(0,05) <sup>g</sup>  | 3,83(0,57) <sup>cdef</sup>   | 3,62(0,31) <sup>a</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,20(0,06) <sup>cdef</sup>   | 3,39(0,15) <sup>f</sup>     | 3,58(0,01) <sup>defg</sup>   | 1,37(0,07) <sup>fg</sup> | 3,24(0,09) <sup>bcdde</sup> | 2,56(0,15) <sup>defg</sup> |
| PLA2 | 5,45(0,01) <sup>cd</sup> | 3,97(0,01) <sup>cdef</sup>   | 3,79(0,06) <sup>a</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,26(0,02) <sup>cdef</sup>   | 3,75(0,01) <sup>def</sup>   | 3,18(0,00) <sup>fg</sup>     | 0,75(0,18) <sup>gh</sup> | 2,39(0,03) <sup>e</sup>     | 3,03(0,07) <sup>cdef</sup> |
| PLA3 | 4,73(0,01) <sup>g</sup>  | 1,53(0,01) <sup>f</sup>      | 1,00(0,00) <sup>e</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,18(0,06) <sup>def</sup>    | 2,79(0,19) <sup>g</sup>     | 2,94(0,08) <sup>g</sup>      | 1,00(0,00) <sup>gh</sup> | 2,50(0,15) <sup>ef</sup>    | 2,20(0,08) <sup>g</sup>    |
| PLC1 | 4,98(0,05) <sup>f</sup>  | 5,07(0,02) <sup>ab</sup>     | 1,45(0,08) <sup>cd</sup> | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,02(0,09) <sup>efg</sup>    | 4,27(0,09) <sup>bcd</sup>   | 4,10(0,09) <sup>bcdde</sup>  | 2,67(0,33) <sup>cd</sup> | 3,88(0,02) <sup>ab</sup>    | 3,20(0,00) <sup>c</sup>    |
| PLC2 | 3,63(0,07) <sup>i</sup>  | 4,17(0,03) <sup>bcddef</sup> | 1,54(0,01) <sup>cd</sup> | 2,94(0,48) <sup>ab</sup>     | 3,18(0,17) <sup>def</sup>    | 3,68(0,29) <sup>ef</sup>    | 3,48(0,47) <sup>efg</sup>    | 1,97(0,12) <sup>ef</sup> | 3,05(0,01) <sup>cdef</sup>  | 3,53(0,00) <sup>bc</sup>   |
| PLC3 | 5,31(0,05) <sup>de</sup> | 2,09(0,04) <sup>f</sup>      | 1,77(0,03) <sup>bc</sup> | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,12(0,08) <sup>def</sup>    | 3,80(0,10) <sup>cdef</sup>  | 4,20(0,09) <sup>bcdde</sup>  | 1,88(0,29) <sup>ef</sup> | 2,37(0,02) <sup>e</sup>     | 3,17(0,01) <sup>cd</sup>   |
| PLG1 | 6,59(0,01) <sup>a</sup>  | 3,77(0,09) <sup>def</sup>    | 0,00(0,00) <sup>e</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,70(0,07) <sup>bcd</sup>    | 5,18(0,03) <sup>e</sup>     | 4,78(0,03) <sup>ab</sup>     | 2,93(0,01) <sup>bc</sup> | 4,19(0,07) <sup>a</sup>     | 2,97(0,04) <sup>cdef</sup> |
| PLG2 | 5,96(0,00) <sup>b</sup>  | 3,72(0,56) <sup>def</sup>    | 0,00(0,00) <sup>e</sup>  | 3,26(0,35) <sup>a</sup>      | 3,33(0,26) <sup>cdef</sup>   | 5,23(0,03) <sup>a</sup>     | 4,73(0,01) <sup>ab</sup>     | 3,39(0,10) <sup>b</sup>  | 3,86(0,00) <sup>abc</sup>   | 3,99(0,02) <sup>ab</sup>   |
| PLG3 | 5,45(0,03) <sup>cd</sup> | 3,19(0,35) <sup>e</sup>      | 0,00(0,00) <sup>e</sup>  | 2,74(0,39) <sup>ab</sup>     | 3,00(0,08) <sup>efg</sup>    | 4,11(0,12) <sup>bcdde</sup> | 4,41(0,16) <sup>abcd</sup>   | 3,41(0,01) <sup>b</sup>  | 2,54(0,71) <sup>ef</sup>    | 2,40(0,50) <sup>fg</sup>   |
| ILA4 | 5,12(0,00) <sup>ef</sup> | 3,49(0,07) <sup>def</sup>    | 1,77(0,07) <sup>bc</sup> | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,17(0,09) <sup>def</sup>    | 2,79(0,19) <sup>g</sup>     | 3,94(0,08) <sup>g</sup>      | 0,00(00) <sup>gh</sup>   | 2,41(0,02) <sup>e</sup>     | 2,51(0,10) <sup>efg</sup>  |
| ILA5 | 5,09(0,00) <sup>ef</sup> | 3,53(0,11) <sup>def</sup>    | 1,13(0,09) <sup>de</sup> | 2,34(0,38) <sup>b</sup>      | 2,52(0,38) <sup>g</sup>      | 4,04(0,08) <sup>bcdde</sup> | 3,95(0,04) <sup>bcddef</sup> | 2,19(0,08) <sup>de</sup> | 2,79(0,01) <sup>ef</sup>    | 2,93(0,04) <sup>cdef</sup> |
| ILA6 | 5,27(0,02) <sup>de</sup> | 4,04(0,00) <sup>cdef</sup>   | 1,26(0,12) <sup>de</sup> | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,82(0,07) <sup>bc</sup>     | 4,35(0,00) <sup>bc</sup>    | 4,35(0,01) <sup>abcd</sup>   | 0,77(0,07) <sup>gh</sup> | 3,04(0,02) <sup>def</sup>   | 3,24(0,09) <sup>c</sup>    |
| ILC4 | 4,09(0,01) <sup>h</sup>  | 4,05(0,01) <sup>cdef</sup>   | 2,03(0,11) <sup>b</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,05(0,01) <sup>efg</sup>    | 4,13(0,12) <sup>bcdde</sup> | 3,75(0,55) <sup>cdefg</sup>  | 0,59(0,15) <sup>h</sup>  | 2,36(0,02) <sup>e</sup>     | 4,20(0,02) <sup>a</sup>    |
| ILC5 | 5,27(0,02) <sup>de</sup> | 4,29(0,06) <sup>abcde</sup>  | 2,08(0,00) <sup>b</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,59(0,01) <sup>bcd</sup>    | 4,39(0,08) <sup>b</sup>     | 4,57(0,15) <sup>abc</sup>    | 1,17(0,16) <sup>gh</sup> | 2,72(0,04) <sup>ef</sup>    | 4,14(0,02) <sup>ab</sup>   |
| ILC6 | 5,28(0,12) <sup>de</sup> | 4,80(0,07) <sup>abc</sup>    | 2,05(0,04) <sup>b</sup>  | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 3,97(0,00) <sup>ab</sup>     | 4,06(0,01) <sup>bcdde</sup> | 4,21(0,02) <sup>bcdde</sup>  | 1,34(0,22) <sup>fg</sup> | 2,96(0,00) <sup>def</sup>   | 3,11(0,03) <sup>cde</sup>  |
| ILG4 | 5,65(0,09) <sup>c</sup>  | 3,50(0,11) <sup>def</sup>    | 1,23(0,12) <sup>de</sup> | 2,51(0,00) <sup>ab</sup>     | 2,91(0,21) <sup>fg</sup>     | 4,60(0,10) <sup>b</sup>     | 3,93(0,03) <sup>bcddef</sup> | 3,26(0,04) <sup>bc</sup> | 2,71(0,01) <sup>ef</sup>    | 3,12(0,02) <sup>cde</sup>  |
| ILG5 | 6,18(0,08) <sup>b</sup>  | 5,26(0,03) <sup>a</sup>      | 1,48(0,09) <sup>cd</sup> | 2,97(0,00) <sup>ab</sup>     | 3,15(0,00) <sup>def</sup>    | 5,17(0,09) <sup>a</sup>     | 3,93(0,03) <sup>bcddef</sup> | 4,22(0,04) <sup>a</sup>  | 2,42(0,00) <sup>e</sup>     | 3,19(0,01) <sup>cd</sup>   |
| ILG6 | 6,51(0,02) <sup>a</sup>  | 4,63(0,08) <sup>abcd</sup>   | 1,57(0,03) <sup>cd</sup> | 0,00(0,00) <sup>c</sup>      | 4,51(0,09) <sup>a</sup>      | 4,19(0,03) <sup>bcdde</sup> | 5,08(0,00) <sup>a</sup>      | 3,42(0,00) <sup>b</sup>  | 3,73(0,02) <sup>abcd</sup>  | 3,01(0,19) <sup>cdef</sup> |

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0,05$ ,  $n=3$  (teste *Scheffé*)

Na contagem em placa a 30°C, nos leites PLG1, PLG2, ILG5 E ILG6 é superior ao valor máximo estipulado no regulamento (CE) nº 1662/2006 de 18 de novembro ( $\leq 5,70 \log \text{ ufc/mL}$ ).

### ***Staphylococcus* coagulase negativa e positiva**

Quanto à contagem de estafilococos verificámos a presença em todos os leites de estafilococos coagulase negativa. A contagem variou entre os 2,52 log ufc/mL e os 4,51 log ufc/mL. A menor contagem foi no leite ILA5 e a maior no leite ILG6. A presença de estafilococos coagulase positiva apenas se verificou-se nos leites PLC2, PLG2, PLG3, ILA5, ILG4 e ILG5 e a contagem variou entre os 2,34 log ufc/mL para o leite ILA5 e 4,51 log ufc/mL para o leite ILG6. Verificam-se diferenças significativas entre as amostras de leite relativamente ao teor destes dois grupos microbianos. Outros trabalhos revelam valores inferiores a 4 log ufc/mL (Canada, 2001; Roseiro, 2003)

Para as bactérias da família das Enterobactérias, observaram-se contagens entre 1,53 log ufc/mL e 5,26 log ufc/mL. O leite com maior contagem foi ILG5 e o de menor contagem foi o leite PLA3. As amostras apresentam contagens com diferenças significativas. Estas diferenças podem estar relacionadas com as condições de higiene na obtenção do leite, no transporte ou na receção do leite na queijaria. A presença desta bactéria nos alimentos está normalmente associada à falta de higiene na produção e/ou qualidade da matéria-prima. Outros trabalhos revelam valores entre os 2 a 4 log ufc/mL (Montel, et al., 2014).

*E.coli* são bactérias fecais que indicam possível contaminação com esta origem. Nas contagens efetuadas a máxima concentração encontrada foi 3,79 log ufc/mL, sendo que se verificou ausência de *E. coli*, na quantidade de amostra em estudo, nas amostras PLA3, PLG1, PLG2 e PLG3. Nas outras amostras de leite, os valores variaram entre 1,13 log ufc/mL e os 3,79 log ufc/mL. A menor contagem foi no leite ILA5 e a maior contagem foi no leite PLA2. Há diferenças significativas entre as amostras de leite para a contagem de *E.coli*.

Na contagem de fungos é de salientar em primeiro lugar a ausência de bolores em todas as amostras, na quantidade de amostra em estudo, tendo-se apenas quantificado leveduras.

No que diz respeito a leveduras verificou-se que estas aparecem em maior número nas amostras da queijaria ILC4 e em menor número na amostra PLA3, numa concentração de 4,20 log ufc/mL e 2,20 log ufc/mL, respetivamente. Outros trabalhos revelam valores entre os 2 a 4 log ufc/mL (Montel, et al., 2014).

Na contagem de presumíveis Lactobacilos em meio de cultura MRS, podemos observar que os valores variam entre os 2,79 log ufc/mL e os 5,23 log ufc/mL. A amostra com maior valor é a amostra do leite PLG2 e a de menor valor é a amostra do leite PLA3. Existem diferenças significativas entre as amostras do leite quanto a esta quantificação. Outros trabalhos revelam valores entre os 3 a 4 log ufc/mL (Montel, et al., 2014).

As contagens de presumíveis *Lactococcus* obtidas apresentaram valores entre 2,94 log ufc/mL e os 5,08 log ufc/mL. O maior valor corresponde a amostra do leite ILG6 e a de menor valor a amostra do leite PLA3. Existem diferenças significativas entre as amostras do leite nesta quantificação. Outros trabalhos revelam valores de 4 log ufc/mL (Montel, *et al.*, 2014).

As bactérias lácticas do género *Leuconostoc* crescem com um aspeto típico transparente, mucoso e gelatinoso. Verificou-se a ausência de *Leuconostoc* na quantidade de amostra em estudo, nas amostras PLA3 e ILA4. Nas outras amostras de leite a contagem variou entre os 0,59 log ufc/mL e os 4,22 log ufc/mL. O maior valor corresponde a amostra de leite ILG5 e o menor valor ILC4. Existem diferenças significativas entre as amostras do leite, neste parâmetro. Outros trabalhos revelam valores entre os 4 a 5 log ufc/mL (Montel, *et al.*, 2014), pelo que alguns dos leites estudados apresentam concentrações muito baixas deste microrganismo.

As contagens de *Streptococcus* apresentaram valores entre os 2,36 log ufc/mL e os 4,19 log ufc/mL. O menor valor corresponde ao leite ILC4 e o de maior valor ao leite ILG5. Existem diferenças significativas entre as amostras de leite. Outros trabalhos revelam valores entre os 2 a 4 log ufc/mL (Montel, *et al.*, 2014).

Na amostra estudada de leites utilizados no fabrico de queijo Serpa, os resultados obtidos indicam o domínio das bactérias lácticas, representadas pelos microrganismos presumivelmente do género *Lactobacillus* e *Lactococcus*, com concentrações entre cerca de 3 e 4-5 log ufc/mL, seguidos do grupo dos *Streptococcus* com concentrações entre 2 e 4 log ufc/mL. Entre os restantes grupos é constante a presença de leveduras, estafilococos coagulase negativa e enterobactérias, com uma média de 3 log ufc/mL. A presença de *E. coli* e Estafilococos coagulase positiva e *Leuconostoc* é inconstante, não se verificando em todas as amostras.

### 3.4.2. Caracterização microbiológica quantitativa de queijo Serpa

Relativamente à pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* verificou-se em todos os queijos ausência em 25 g de amostra. Estes valores estão em concordância com o regulamento (CE) nº 2073/2005. Em todos os trabalhos realizados sobre este tipo de queijo verificou-se esta condição nos queijos estudados (Canada, 2001; Roseiro, 2003; Amaral; 1996).

Na Tabela 25 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades microbiológicas das amostras do Queijo Serpa, expressos em log ufc/g, nomeadamente para a contagem total, Enterobactérias, *E. coli*, Estafilococos coagulase positiva e negativa, Fungos, Clostrídios e bactérias lácticas como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

A contagem total de microrganismos mesófilos específica uma ideia da população microbiana nas amostras estudadas. A contagem varia entre 8,11 e os 9,72 log ufc/g nos queijos estudados. A menor

contagem corresponde ao queijo IC4 e a maior contagem corresponde ao queijo IC3. Os queijos com contagem total mais elevada apresentam diferenças significativas em relação aos outros queijos com contagens mais baixas que não diferem muito nas contagens. Estes valores concordam com os apresentados noutros trabalhos sobre queijo Serpa (Canada, 2011; Roseiro, 2003; Amaral, 1996).

Valores muito elevados na contagem total podem ser indicadores de condições sanitárias não satisfatórias da matéria-prima, durante o processamento ou armazenamento. Não existem limites legislados para este parâmetro neste tipo de alimento. No entanto, neste tipo de queijo o número de microrganismos totais mesófilos elevado parece dever-se essencialmente ao elevado número de bactérias lácticas. Roseiro, (2003) concluiu que a elevação do total de mesófilos ao longo da cura estava associado a elevação do número de bactérias lácticas.

Quanto à contagem de estafilococos coagulase negativa verificou-se a presença nos queijos PA1, PA2, PC1, PC2, PG1 e IV1 com contagens entre os 4,59 e os 7,42 log ufc/g. A menor contagem foi no queijo PA2 e a maior no queijo PA1. A presença de estafilococos coagulase positiva só se detetou no queijo IV1, e a contagem foi de 6,68 log ufc/g.

Na contagem de estafilococos coagulase positiva no queijo IV1 é superior ao valor máximo estipulado no regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de novembro (<4 log ufc/g). Outros trabalhos revelam valores inferiores a 4 log ufc/g (Amaral, 1996; Roseiro, 2003). O nível deste microrganismo no queijo IV1 é bastante elevado e podem-se considerar indicadores de possível presença de enterotoxina em quantidade suficiente para provocar intoxicação, devendo o lote ser testado relativamente à presença desta (HPA, 2009; Reg. (CE) Nº1441 de 2007). Estes produtores devem ser monitorizados relativamente à qualidade das matérias primas que utilizam e à higiene do processo de forma a detetar a possível origem desta contaminação.

As Enterobactérias detetaram-se em concentrações com um máximo de 8,27 log ufc/g e mínimo de praticamente metade deste valor e da ordem de 4 log ufc/g. Apenas numa das amostras PA1 não foi detetada a presença de Enterobactérias em quantidade quantificável. O queijo com maior contagem foi IA3. Isto pode ser devido a diferenças de higiene nos processos de fabrico, entre os vários produtores. No entanto, contagens elevadas de Enterobactérias são normalmente encontradas nos queijos curados fabricados com leite cru de ovelha.

O interesse na contagem de enterobactérias em queijos reside não só no facto de podermos estar perante microrganismos capazes de provocar doença, pois esta família inclui estirpes patogénicas como *E. coli* e *Salmonella spp.*, mas também por serem agentes de defeitos no queijo. A presença desta bactéria nos alimentos está normalmente associada à falta de higiene na produção e qualidade da matéria-prima. Alguns autores alegam que este grupo pode estar implicado em alterações benéficas sobretudo no princípio do processo de maturação, como já referido.

Tabela 25 - Valores médios, desvio padrão e resultados da variância do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes em log ufc/g

|     | Contagem Total Mesófilos | Enterobactérias           | <i>E. coli</i>            | Estafilococos coag.positiva | Estafilococos coag.negativa | <i>Lactobacillus spp.</i> | <i>Lactococcus spp.</i>   | <i>Leuconostoc spp.</i>   | <i>Streptococcus spp.</i> | Fungos                    | Clostrídios              |
|-----|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| PA1 | 8,40(0,06) <sup>b</sup>  | 0,00(0,00) <sup>i</sup>   | 0,00(0,00) <sup>h</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 7,42(0,03) <sup>a</sup>     | 7,92(0,16) <sup>de</sup>  | 7,90(0,19) <sup>bcd</sup> | 7,20(0,28) <sup>abc</sup> | 7,25(0,15) <sup>ab</sup>  | 2,01(0,39) <sup>i</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| PA2 | 8,62(0,52) <sup>b</sup>  | 5,09(0,07) <sup>gh</sup>  | 1,72(0,13) <sup>f</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 4,59(0,02) <sup>e</sup>     | 8,46(0,12) <sup>bcd</sup> | 8,17(0,04) <sup>abc</sup> | 6,83(0,10) <sup>bc</sup>  | 6,41(0,07) <sup>bcd</sup> | 3,09(0,07) <sup>h</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| PC1 | 8,78(0,13) <sup>ab</sup> | 5,96(0,09) <sup>de</sup>  | 3,92(0,29) <sup>b</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 4,60(0,00) <sup>e</sup>     | 8,21(0,37) <sup>cde</sup> | 8,69(0,12) <sup>abc</sup> | 7,97(0,10) <sup>a</sup>   | 6,96(0,17) <sup>bcd</sup> | 5,73(0,07) <sup>ab</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| PC2 | 8,39(0,61) <sup>b</sup>  | 7,49(0,15) <sup>b</sup>   | 3,18(0,05) <sup>cd</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 4,95(0,07) <sup>d</sup>     | 8,42(0,33) <sup>bcd</sup> | 8,45(0,19) <sup>abc</sup> | 7,73(0,26) <sup>ab</sup>  | 7,13(0,19) <sup>bcd</sup> | 5,86(0,08) <sup>ab</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| PG1 | 9,04(0,20) <sup>ab</sup> | 6,54(0,05) <sup>c</sup>   | 3,21(0,16) <sup>cd</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 6,54(0,03) <sup>b</sup>     | 8,43(0,39) <sup>bcd</sup> | 9,05(0,20) <sup>a</sup>   | 6,86(0,01) <sup>bc</sup>  | 6,36(0,28) <sup>bcd</sup> | 4,03(0,27) <sup>fg</sup>  | 1,18(0,35) <sup>a</sup>  |
| PG2 | 8,78(0,02) <sup>ab</sup> | 7,23(0,07) <sup>b</sup>   | 3,07(0,14) <sup>d</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,83(0,09) <sup>bc</sup>  | 8,95(0,00) <sup>a</sup>   | 7,72(0,17) <sup>ab</sup>  | 6,66(0,40) <sup>bcd</sup> | 3,85(0,09) <sup>f</sup>   | 0,97(0,19) <sup>a</sup>  |
| IA3 | 8,56(0,20) <sup>b</sup>  | 8,27(0,23) <sup>a</sup>   | 5,14(0,04) <sup>a</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 7,93(0,13) <sup>de</sup>  | 7,85(0,13) <sup>cd</sup>  | 0,00(0,00) <sup>e</sup>   | 6,32(0,23) <sup>cd</sup>  | 5,58(0,03) <sup>bc</sup>  | 0,72(0,10) <sup>ab</sup> |
| IA4 | 8,48(0,01) <sup>b</sup>  | 6,54(0,19) <sup>c</sup>   | 3,02(0,06) <sup>d</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,17(0,13) <sup>cde</sup> | 8,73(0,11) <sup>abc</sup> | 6,71(0,21) <sup>bcd</sup> | 6,77(0,06) <sup>bcd</sup> | 5,73(0,12) <sup>ab</sup>  | 1,05(0,48) <sup>a</sup>  |
| IC3 | 9,72(0,04) <sup>a</sup>  | 5,06(0,09) <sup>gh</sup>  | 2,40(0,00) <sup>ef</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,87(0,01) <sup>abc</sup> | 8,67(0,18) <sup>abc</sup> | 0,00(0,00) <sup>e</sup>   | 7,16(0,13) <sup>bc</sup>  | 5,39(0,13) <sup>bc</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| IC4 | 8,11(0,06) <sup>b</sup>  | 5,34(0,00) <sup>fg</sup>  | 2,00(0,00) <sup>fg</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,19(0,16) <sup>cde</sup> | 8,27(0,13) <sup>abc</sup> | 5,67(0,24) <sup>d</sup>   | 7,13(0,25) <sup>bcd</sup> | 6,22(0,02) <sup>a</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| IG3 | 8,61(0,21) <sup>b</sup>  | 6,22(0,15) <sup>cde</sup> | 2,76(0,18) <sup>de</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 9,76(0,00) <sup>a</sup>   | 8,44(0,16) <sup>abc</sup> | 8,20(0,17) <sup>a</sup>   | 6,40(0,14) <sup>bcd</sup> | 4,53(0,32) <sup>def</sup> | 0,66(0,10) <sup>ab</sup> |
| IG4 | 8,62(0,23) <sup>b</sup>  | 6,44(0,11) <sup>cd</sup>  | 2,11(0,14) <sup>fg</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 9,23(0,07) <sup>ab</sup>  | 8,68(0,35) <sup>abc</sup> | 7,78(0,61) <sup>ab</sup>  | 6,24(0,26) <sup>d</sup>   | 4,67(0,12) <sup>de</sup>  | 1,00(0,20) <sup>a</sup>  |
| IB1 | 8,35(0,06) <sup>b</sup>  | 4,65(0,19) <sup>h</sup>   | 4,10(0,04) <sup>b</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,66(0,07) <sup>bcd</sup> | 7,12(0,58) <sup>d</sup>   | 6,60(0,15) <sup>cd</sup>  | 6,61(0,08) <sup>bcd</sup> | 4,24(0,01) <sup>efg</sup> | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| IB2 | 8,63(0,06) <sup>b</sup>  | 5,85(0,13) <sup>ef</sup>  | 2,30(0,18) <sup>efg</sup> | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 8,83(0,08) <sup>bc</sup>  | 8,75(0,01) <sup>ab</sup>  | 8,12(0,13) <sup>a</sup>   | 6,39(0,58) <sup>bcd</sup> | 4,21(0,02) <sup>efg</sup> | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| IV1 | 8,22(0,05) <sup>b</sup>  | 5,83(0,06) <sup>ef</sup>  | 4,14(0,10) <sup>b</sup>   | 6,68(0,04) <sup>a</sup>     | 6,08(0,04) <sup>c</sup>     | 7,83(0,04) <sup>de</sup>  | 8,28(0,02) <sup>abc</sup> | 0,00(0,00) <sup>e</sup>   | 7,16(0,04) <sup>bc</sup>  | 4,99(0,06) <sup>cd</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |
| IV2 | 8,17(0,05) <sup>b</sup>  | 6,04(0,11) <sup>cde</sup> | 3,66(0,08) <sup>bc</sup>  | 0,00(0,00) <sup>b</sup>     | 0,00(0,00) <sup>f</sup>     | 7,53(0,03) <sup>e</sup>   | 8,62(0,09) <sup>abc</sup> | 0,00(0,00) <sup>e</sup>   | 8,13(0,02) <sup>a</sup>   | 3,88(0,08) <sup>f</sup>   | 0,00(0,00) <sup>b</sup>  |

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas P<0,05, n=3 (teste Scheffé)

A bactéria *E. coli* são bactérias fecais que indicam contaminação de origem fecal, as contagens apresentaram-se entre os 1,72 e os 5,14 log ufc/g. Como nas Enterobactérias na amostra PA1 não se detetou *E. coli* quantificável nas condições do estudo, a amostra IA3 foi aquela em que se verificou maior contagem. Há diferenças significativas entre os produtores tal como também acontecia para Enterobactérias. Os resultados obtidos estão dentro do referido noutros estudos sobre microbiologia de queijo Serpa (Canada, 2001; Roseiro, 2003).

Na contagem de fungos é de salientar em primeiro lugar a ausência de bolores em todas as amostras, tendo-se apenas quantificado leveduras. O mesmo se verificou em Roseiro (2003).

No que diz respeito a leveduras verificou-se que estas aparecem em maior número nas amostras da queijaria IC4 e em menor número na amostra PA1, numa concentração de 6,22 log ufc/g e 2,01 log ufc/g, respetivamente. Os valores obtidos nestas amostras são ligeiramente superiores aos obtidos noutros estudos para queijo Serpa (Canada, 2001 e Roseiro, 2003), no entanto estudos feitos noutros queijos tradicionais portugueses referem valores desta ordem para leveduras (Reis, 2011).

Quanto a contagem de Clostrídios verificamos a presença nos queijos PG1, PG2, IA3, IA4, IG3 e IG4. Nestes queijos a contagem varia entre os 0,66 log ufc/g e os 1,18 log ufc/g. A menor contagem foi no queijo IC4 e a maior no queijo PC2. Nos restantes queijos não foram contabilizados Clostrídios nas condições usadas. Não existe diferenças significativas entre as amostras de queijos com valores quantificáveis.

Nos Lactobacilos podemos observar que os valores das contagens variam entre os 7,53 log ufc/g e os 9,76 log ufc/g. A amostra com maior número de bactérias lácticas deste grupo é a amostra do queijo IG3 e a de menor valor é a amostra do queijo IV2. Existem diferenças significativas entre as contagens deste grupo nas diferentes amostras de queijo.

As bactérias Lácticas em geral são seguras segundo a FAO (*Food and Agriculture Administration*). O seu principal efeito benéfico é a produção de ácido láctico que provoca a diminuição do pH, inibindo o crescimento de outros microrganismos como por exemplo algumas Enterobactérias que são muito sensíveis a esta diminuição do pH.

As contagens de *Lactococcus* estiveram entre 7,12 log ufc/g e os 9,05 log ufc/g. O maior valor corresponde a amostra do queijo PG1 e a de menor valor a amostra do queijo IB1. Existe diferenças significativas entre as amostras de queijo no que respeita a este grupo.

No caso do grupo *Leuconostoc* a contagem varia entre os 5,67 log ufc/g e os 8,20 log ufc/g nas amostras em que estão presentes. As amostras de queijo IA3, IC3, IV1 e IV2, apresentam ausência de *Leuconostoc* na concentração de amostra estudada. O maior valor corresponde a amostra de queijo IG3. Existem diferenças significativas entre as amostras de queijo para esta contagem.

O grupo das lácticas do género *Streptococcus* apresentou valores entre os 6,24 log ufc/g e os 8,13 log ufc/g. O a menor valor corresponde ao queijo IG4 e o de maior valor ao queijo IV2. Também com diferenças significativas nas contagens entre as amostras de queijo.

Tal como no leite pode constatar-se que as bactérias lácticas dominam a flora do queijo Serpa em termos numéricos.

### 3.4.3. Caracterização microbiológica qualitativa de queijo Serpa mediante técnicas de biologia molecular

As colónias foram isoladas em meios de cultura diferentes seletivos para cada microrganismo, cultivadas em cultura pura num meio líquido também adequado a cada microrganismo para posterior extração do ADN. Uma vez extraído o ADN foi, utilizada a técnica PCR adequada para a amplificação da região 16S no caso das bactérias e 26S no caso das leveduras, do ADN ribossomal. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados.

Em cada queijo podemos encontrar distintos microrganismos dependendo dos meios de cultura utilizados. Há determinados géneros cuja presença é comum em todos os queijos.

No Apêndices II, está a tabela do número de bactérias e leveduras isoladas.

Na Tabela 26 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura VRBG. Este meio de cultura é específico para as Enterobactérias, a família *Enterobacteriaceae*, que constitui um grande e homogéneo grupo de bactérias gram-negativas.

Foram identificadas quatro espécies diferentes de bactérias, a espécie predominante nas amostras de queijo Serpa foi *Hafnia alvei*. Também se identificou *Hafnia paralvei* mas unicamente no queijo PA2. *Hafnia alvai* e a *Hafnia paralvei*, só se podem diferenciar por técnicas moleculares, Outra das enterobactérias identificadas foi *Escherichia coli* (*E.coli*) e foi encontrada nas amostras IC3, IB1, IV1 e IV2, isto indica uma maior contaminação nestes queijos. Por último também de identificou *Klebsiella oxytoca* apenas no queijo IV2.

As espécies como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. Agglomerans*, *Hafnia alvei* e *Klebsiella oxytoca* foram identificadas em amostras de leite de ovelha (Gaya, *et al.*, 1987) que deve constituir uma das principais fontes destes microrganismos no queijo. O predomínio de *Hafnia alvei* nos queijos com 30 dias de maturação foi assinalado por outros autores como já referido. Na maior parte das amostras estudadas *H. alvei* representa 100% das enterobactérias presentes aos 30 dias.

No meio de cultura TBX, seletivo para *Escherichia coli*, verificou-se a presença desta bactéria em quase todas as amostras de queijo Serpa em estudo. A estirpe de *E. coli* identificada nas amostras do queijo não é patogénica.



Esta bactéria faz parte da flora anaeróbia facultativa do intestino do Homem e dos animais. Devido à sua presença a este nível, *E. coli* é um microrganismo indicador utilizado na avaliação da higiene e segurança de águas e alimentos, cuja presença indica condições de higiene da matéria prima e a possibilidade de existirem outros microrganismos patogénicos de origem fecal. A presença de *E. coli* nestes queijos pode indicar precisamente estas condições, no entanto, as concentrações em que foi detetada não ultrapassam os valores estipulados por HPA (2009).

Na Tabela 27 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura SB. Este meio de cultura é específico para o género *Enterococcus*, mostrando a sua eficácia para os membros deste género. Os *Enterococcus* são microrganismos ubíquos, habitam normalmente no intestino dos humanos e animais. As espécies mais frequentes no intestino humano são *E. faecalis* e *E. faecium*. Algumas estirpes de *Enterococcus* são aplicadas aos processos de fermentação de alimentos com o propósito de melhorar a qualidade sensorial e até mesmo como probióticos.

Neste meio de cultura identificamos quatro espécies de *Enterococcus*, a espécie predominante foi *Enterococcus faecalis*, cuja presença se verificou em todas as amostras de queijos menos no queijo IV1. *E. faecium* detectaram-se nos queijos PA1, PG1, IC3 e IG4, *E. hirae* nas amostras IA3, IC4, IG3, IG4 e IV2, por últimos *Enterococcus durans* apareceram unicamente na amostra de queijo PG1.

Outros autores (Ordiales, *et al.*, 2013) identificou espécies como *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Noutros trabalhos as espécies mais abundantes foram *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, também foram encontrados *Enterococcus faecium* e *Enterococcus gallinarum* mas em menores percentagens (Pouillet, *et al.*, 1991).

Na Tabela 28 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura BP. Este meio de cultura é específico para o género Estafilococos (*Staphylococcus spp.*), são cocos gram-positivos e catalase positiva. São um género de bactérias anaeróbias facultativas, estão presentes na mucosa e na pele dos humanos e de outros mamíferos e aves, incluindo 35 espécies e 17 subespécies, muitas das quais se encontram nos humanos.

Foram identificadas sete espécies diferentes em todos os queijos. As espécies predominantes foi *Staphylococcus epidermidis* e a *Staphylococcus warneri*.

A espécie *Staphylococcus epidermidis*, aparece no queijo PA1 e PC2. É uma espécie bacteriana do género *Staphylococcus*, gram-positivas, coagulase negativa e anaeróbia facultativa. É um microrganismo que faz parte da flora natural da pele, no entanto, pode ser agente de mastites e estar presente em leite de ovelhas com este tipo de infeção (Canada, 2001).

*Staphylococcus warneri* foi identificado nas amostras PA2 e PG1 e é coagulase positiva, portanto potencial patogénico.



*S. capitis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. cohnii* apenas foram identificados numa amostra entre as várias em estudo. Todos são coagulase negativa e facultativos.

*Staphylococcus aureus* apenas foi identificado na amostra IV1. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria muito resistente ao meio ambiente e amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada no ar, água, resíduos, equipamentos e superfícies, nas indústrias de alimentos, mas o seu principal reservatório são os animais e humanos, podem transmitir-se aos alimentos a partir da pele, cabelo, fossas nasais e garganta. Também podem estar presentes numa grande diversidade de alimentos, principalmente de origem animal (leite, carne, ovos e produtos derivados) e alimentos crus (frutas, verduras, queijos, etc.), a partir dos quais podem ser transmitidos ao homem.

Outros autores também identificaram a presença de *Staphylococcus aureus* em queijos similares (Ordiales, *et al.*, 2013; Little, *et al.*, 2008).

A amostra PA1 é aquela em que se verifica uma maior diversidade microbiana no que respeita a este género bacteriano, com três espécies diferentes deste género.

Na Tabela 29 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura M17. Este meio de cultura é supostamente seletivo para o género *Lactococcus* (*Lactococcus spp.*), no entanto verificou-se que não foi eficaz para limitar o crescimento de outras bactérias lácticas. Os *Lactococcus* são um género que pertence às bactérias lácticas. São cocos gram-positivos, esféricos a ovóides. Aparecem individualmente, em pares ou em cadeia. Produzem colónias pequenas translúcidas ou esbranquiçadas, imóveis, anaeróbias facultativas, catalase negativa e com metabolismo pequenas translúcidas ou esbranquiçadas, imóveis, anaeróbias facultativas, catalase negativa e com metabolismo homofermentativo. Os *Lactococcus* separam-se claramente dos patogénicos *Streptococcus*. A espécie *Lactococcus lactis* é muito comum nos produtos lácteos. O *Lactococcus lactis* só apareceu no queijo PC1. Este resultado é expectável já que este microrganismo atua principalmente nas primeiras fases da fermentação dos queijos, estando normalmente ausente ou em concentrações muito baixas na fase dos queijos em análise, ou seja, 30 dias de maturação.

Neste meio de cultura também se identificou a presença de *Lactobacillus casei* (PA1, PC1), *Lactobacillus brevis* (IA4), *Lactobacillus plantarum* (PC1), *Leuconostoc mesenteroides* (PA2, PC1, PG1, PG2 e IG4), *Enterococcus faecalis* (PA2, IA3, IA4, IC3, IB1 e IV1), *Enterococcus hirae* (IC4, IB1 e IV2) e *Enterococcus faecium* (IV2). Estes resultados comprovam a ineficiência do meio M17 na seleção do género *Lactococcus*.

Na Tabela 30 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura MRS, este meio de cultura é específico para o género *Lactobacillus*. Efetivamente, neste meio foram identificadas oito espécies de *Lactobacillus*, no entanto, também se identificaram três de *Enterococcus* e uma de *Leuconostoc*.



As espécies predominantes de *Lactobacillus* foram os *Lactobacillus paracasei*, estão presentes nas amostras de queijo PA1, PA2, PC1, PC2, PG1, PG2, IA3, IC3 e IG3 e *Lactobacillus casei*, estão presentes nas amostras PA1, PA2, PC1, PC2, PG2, IA3, IC3, IC4, IG3, IG4 e IV1.

As restantes espécies de *Lactobacillus* identificados foram *L. plantarum* (PG1, PG2, IA3, IG4 e IB1), *L. pentosus* (IG4), *L. curvatus* (PG2, IA4 e IV1), *L. crustorum* (IA3 e IV1), *L. coryniform* (PG2) e *L. brevis* (PC1, IB1, IB2 e IV1).

Também foram identificados *Enterococcus faecalis* na amostra PA1, IA4 E IB1, *Enterococcus hirae* na amostra IV2. Por último, no meio MRS também foi identificado o *Leuconostoc mesenteroides*, nas amostras de queijo PA2, PC1, PC2, PG1.

Outros autores demonstraram a presença de *Leuconostoc carnosum*, *Lactobacillus sakai*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus helveticus* (Ordiales, et al., 2013) em queijos de ovelha com leite cru. Em outros trabalhos destacou-se a presença de *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*. As espécies mais abundantes foram os *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus brevis* (Pouillet, et al., 1991).

De qualquer forma os resultados obtidos demonstram a diversidade microbiana associada a queijo Serpa, no que respeita a bactérias lácticas.

Na Tabela 31 podemos observar a identificação dos isolamentos no meio de cultura RBCA, este meio de cultura é específico para fungos. Apenas foram quantificadas leveduras e foram identificadas, entre estas, 14 espécies.

A diversidade das leveduras pode ser devido à sua presença em ambientes lácteos e a sua aparição como contaminantes naturais em leite cru, ar, água, salmouras e diversas superfícies. Também há uma grande diversidade de leveduras isoladas no queijo, mas poucas espécies dominantes.

As espécies predominantes mediante a sequenciação 26S foram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e espécies do género *Candida*.

As Leveduras *Debaryomyces hansenii* estão presentes nas amostras PA1, PA2, IA3, IA4, IG4, IB1 e IB2 e a *Kluyveromyces marxianus* está presente nas amostras PA1, PC1, PC2, PG1, PG2 IC3, IG3, IG4 e IB1.

Quanto às outras leveduras presentes temos: *Cryptococcus ozeirnsis* (PA1), *Cryptococcus wieringae* (PA1), *Pichia fermentans* (PA2, PG1 e PG2), *Candida pararugosa* (PA2), *Candida parapsilosis* (PG2), *Candida zeylanoides* (IC3, IC4, IG4, IV1 e IV2), *Candida cabralensis* (IB1 e IB2), *Pichia kudriavzevii* (PA2), *Magnusiomyces capitatus* (PA2), *Cyberlindnera jadinii* (PC1), *Yarrowia lipolytica* (IC3, IC4 e IB1) e *moniliella suaveolens* (IB1 e IV1).

Tabela 31 – Identificação dos isolamentos no meio de cultura RBCA.

| Identificação                                      | % de isolamentos em RBCA |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | PA1                      | PA2 | PC1 | PC2 | PG1 | PG2 | IA3 | IA4 | IC3 | IC4 | IG3 | IG4 | IB1 | IB2 | IV1 | IV2 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> - KU316787.1 (100%)   | 38                       | 9,1 |     |     |     |     | 100 | 100 |     |     |     | 13  | 56  | 67  |     |     |
| <i>Cryptococcus oeirensis</i> - HM6227100.1 (100%) | 38                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> - GQ121694.1 (100%) | 13                       |     | 90  | 100 | 40  | 71  |     |     | 81  |     | 100 | 75  | 11  |     |     |     |
| <i>Cryptococcus wieringae</i> - DQ377665.1 (100%)  | 13                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Pichia fermentans</i> - KC442273.1 (100%)       |                          | 27  |     |     | 60  | 14  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Candida pararugosa</i> - HE660073.1 (100%)      |                          | 27  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Candida parapsilosis</i> - HU316730.1 (100%)    |                          |     |     |     |     | 14  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 40  |
| <i>Candida zeylanoides</i> - JX441613.1 (100%)     |                          |     |     |     |     |     |     |     | 13  | 86  |     | 13  |     |     | 67  | 60  |
| <i>Candida cabralensis</i> - KT767184.1 (100%)     |                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 11  | 33  |     |     |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> - LC093944.1 (100%)     |                          | 27  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Magnusiomyces capitatus</i> - KT005311.1 (100%) |                          | 9,1 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Cyberlindnera jadinii</i> - KC844835.1 (100%)   |                          |     | 10  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> - FR856618.1 (100%)     |                          |     |     |     |     |     |     |     | 6,3 | 14  |     |     | 11  |     |     |     |
| <i>Moniliella suaveolens</i> - LC004102.1 (100%)   |                          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 11  |     | 33  |     |

Outros autores encontraram espécies de Leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus wieringae* e espécies do género *Candida* (Álvarez, et al., 2007; Gardini, et al., 2006).

### 3.5. Identificação de diferenças significativas entre queijos com diferente avaliação sensorial

Na Tabela 32 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades químicas das amostras do Queijo Serpa com diferente avaliação sensorial.

Tabela 32 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes às análises químicas das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

|           | pH                      | aw                       | Humidade                 | MQIMG                     | Acidez                   | Cloretos                |
|-----------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>MB</b> | 5,37(0,14) <sup>a</sup> | 0,982(0,01) <sup>a</sup> | 47,36(1,45) <sup>a</sup> | 63,46(2,03) <sup>a</sup>  | 10,03(2,52) <sup>a</sup> | 2,49(0,15) <sup>a</sup> |
| <b>B</b>  | 5,00(0,10) <sup>c</sup> | 0,976(0,02) <sup>a</sup> | 47,08(3,36) <sup>a</sup> | 63,04(1,93) <sup>ab</sup> | 9,08(1,29) <sup>a</sup>  | 2,24(0,31) <sup>b</sup> |
| <b>M</b>  | 5,18(0,22) <sup>b</sup> | 0,937(0,05) <sup>b</sup> | 44,92(5,22) <sup>a</sup> | 60,59(4,24) <sup>b</sup>  | 10,37(2,66) <sup>a</sup> | 3,10(0,78) <sup>a</sup> |

|           | Gordura                  | MGRS%                    | Azoto Total             | Proteína                 | Azoto Solúvel           | Coefficiente Maturação   |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>MB</b> | 25,46(2,62) <sup>a</sup> | 48,10(4,13) <sup>a</sup> | 4,30(1,06) <sup>a</sup> | 27,42(6,78) <sup>a</sup> | 0,93(0,26) <sup>a</sup> | 22,43(7,99) <sup>a</sup> |
| <b>B</b>  | 25,33(4,36) <sup>a</sup> | 47,61(5,56) <sup>a</sup> | 3,19(0,18) <sup>b</sup> | 20,34(1,18) <sup>b</sup> | 0,80(0,20) <sup>a</sup> | 25,21(6,60) <sup>a</sup> |
| <b>M</b>  | 24,40(7,73) <sup>a</sup> | 47,24(2,57) <sup>a</sup> | 3,47(0,56) <sup>b</sup> | 22,95(2,30) <sup>b</sup> | 0,95(0,33) <sup>a</sup> | 26,98(6,87) <sup>a</sup> |

Da análise da tabela podemos detetar diferenças significativas entre os queijos muito bons e os maus, nos parâmetros pH,  $a_w$ , e Humidade isenta de matéria gorda, azoto total e proteína. Quanto ao pH, os queijos MB destacaram-se pelo pH mais alto (5,37) do que o dos queijos B (5,00) e M (5,18). Os queijos B também se diferenciam, mas pelo facto do pH ser menor ainda que nos queijos M. O Azoto total dos queijos MB (4,3) assim como a proteína dos mesmos queijos (27,42), são nitidamente superiores aos dos queijos B e M.

No parâmetro  $a_w$  não há diferença significativa entre queijos MB e B que se destacaram com valores superiores de  $a_w$ , respetivamente de 0,98 e 0,976, relativamente aos M com 0,937). No parâmetro HQIMG (humidade isenta de matéria gorda) houve diferenças significativas entre os queijos. Os queijos MB (63,46) e B (63,04) tiveram valores superiores aos queijos M (60,59), não obstante as diferenças significativas mesmo entre os MB e B. Nos queijos MB e B o valor médio deste parâmetro encontra-se dentro do estabelecido para o queijo Serpa no Reg. 39/87 (61 a 69%),

Quanto à humidade não houve diferenças significativas entre as várias classificações, no entanto há diferença nas médias, os queijos MB (47,36) e B (47,08) humidade mais elevada do que os queijos M (44,92).

Quanto à acidez não se detetam diferenças significativas entre as diferentes classificações. A acidez dos queijos foi nos MB (10,03), no B (9,08) e nos M (10,37). Curiosamente os queijos que apresentam maior acidez são os que têm pH mais alto, o que pode dever-se ao facto de os ácidos presentes serem diferentes.

Nos cloretos não houve diferenças significativas, no entanto os queijos MB (2,49) e B (2,24) apresentam concentrações inferiores a 3, ao contrário dos M. O mesmo se verificou relativamente à gordura e ao parâmetro MGRS%, embora neste caso os queijos melhor classificados (MB e B) apresentem teores mais elevados.

Quanto ao coeficiente de Maturação não houve diferenças significativas, contudo, as amostras de queijo MB tiveram o coeficiente de maturação mais baixo do que as outras amostras de queijo B (25,21) e M (29,98). Estas médias tal como os valores obtidos para cada queijo são muito inferiores ao estabelecido nas regras de produção de queijo Serpa que é de 45%. Curiosamente o queijo classificado como muito bom apresenta um coeficiente de maturação inferior aos outros de classificação mais baixa.

Na Tabela 33 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades físicas das amostras do Queijo Serpa com diferente avaliação sensorial, nomeadamente a dureza, coesividade e adesividade.

Tabela 33 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes a dureza, adesividade e coesividade (análises físicas) das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

|           | Dureza (N)                | Adesividade(-N.mm)        | Coesividade             |
|-----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>MB</b> | 6,66(2,76) <sup>b</sup>   | 23,23(13,16) <sup>a</sup> | 0,64(0,15) <sup>a</sup> |
| <b>B</b>  | 6,32(4,94) <sup>b</sup>   | 26,38(41,08) <sup>a</sup> | 0,56(0,10) <sup>a</sup> |
| <b>M</b>  | 38,86(33,50) <sup>a</sup> | 46,01(44,09) <sup>a</sup> | 0,36(0,04) <sup>b</sup> |

Quanto à Dureza, verificaram-se diferenças significativas entre os queijos MB e B relativamente aos M. A dureza dos primeiros de 6,66 e 6,32, respetivamente, foi muito inferior à dos segundos (38,86). O mesmo se verificou com a coesividade relativamente às diferenças significativas, mas em que os queijos MB e B manifestaram maior coesividade. A adesividade dos queijos MB (23,23) e B (26,38) foi mais baixa do que nos queijos M (46,01), apesar de ausência de diferenças significativas.

Na Tabela 34 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades físicas das amostras do Queijo Serpa com diferente avaliação sensorial, nomeadamente a cor da crosta e cor da pasta.



Tabela 34 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes a Cor da Crosta e da Pasta (análises físicas), das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

|    | CROSTA                   |                             |                          | PASTA                    |                          |                          |
|----|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|    | Cor Crosta L*            | Cor Crosta a*               | Cor Crosta b*            | Cor Pasta L*             | Cor Pasta a*             | Cor Pasta b*             |
| MB | 62,44(5,50) <sup>b</sup> | -4,76(1,17) <sup>c</sup>    | 21,72(2,45) <sup>a</sup> | 84,46(2,47) <sup>a</sup> | -5,22(0,63) <sup>a</sup> | 15,85(1,47) <sup>b</sup> |
| B  | 63,66(3,17) <sup>b</sup> | -3,57(0,31,24) <sup>b</sup> | 18,56(2,95) <sup>b</sup> | 84,76(2,17) <sup>a</sup> | -5,13(0,48) <sup>a</sup> | 15,36(2,15) <sup>b</sup> |
| M  | 65,92(3,51) <sup>a</sup> | -1,97(1,53) <sup>a</sup>    | 22,48(2,90) <sup>a</sup> | 84,91(5,41) <sup>a</sup> | -5,91(0,89) <sup>b</sup> | 17,55(2,35) <sup>a</sup> |

Quanto à cor da crosta dos queijos obtiveram-se valores de luminosidade entre 62,44 e os 65,92, com maior luminosidade para os queijos M e menor luminosidade para os queijos MB e B, com diferenças significativas.

Quanto ao parâmetro a\* os resultados obtidos variam entre -4,76 e os -1,97, o que indica que a cor dos queijos se encontra próximo do centro do eixo verde/vermelho que varia entre os -60 e os +60, com ligeira tendência para o verde. Os queijos mais esverdeados são os queijos MB. As diferenças são significativas entre as três classificações, embora muito mais evidente entre queijos M e MB.

Em relação ao parâmetro b\*, azul/amarelo (-60/+60), varia entre os 18,56 e os 22,48, este parâmetro põe em evidencia a cor amarela dos queijos. Os queijos M são os queijos mais amarelados, os queijos menos amarelados são os queijos B. Neste parâmetro são os queijos com classificação B que se diferenciam significativamente.

Quanto à cor da pasta dos queijos obtiveram-se valores de luminosidade entre 84,46 e os 84,91 sem diferenças significativas entre as várias classificações. Estes valores evidenciam uma maior luminosidade para os queijos M e menor luminosidade para os queijos MB, tal como verificado para a luminosidade da crosta.

Quanto aos parâmetros a\* e b\* verificam-se diferenças significativas entre os queijos MB e B, relativamente aos M. No parâmetro a\* os resultados obtidos variam entre -5,13 e os -5,91, o que indica que a cor da pasta dos queijos se encontra próximo do centro do eixo verde/vermelho, com ligeira tendência para o verde. Os queijos mais esverdeados por dentro são os queijos M.

Em relação ao parâmetro b\*, azul/amarelo, varia entre os 15,36 e os 17,55, este parâmetro põe em evidencia a cor amarela dos queijos. Os queijos M são os queijos mais amarelados, os queijos menos amarelados são os queijos MB e B.

Na Tabela 35 podemos observar os valores médios, desvio padrão e análises de variância referentes a propriedades microbiológicas das amostras do Queijo Serpa com diferente avaliação sensorial.

Tabela 35 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância referentes às quantificações dos diferentes grupos microbianos (log ufc/g), das amostras de Queijo com diferente avaliação sensorial - MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

|           | Contagem Total de Mesófilos | Enterobactérias         | <i>E. coli</i>          | Estafilococos coag. positiva | Estafilococos coag. negativa | Clostrídios             |
|-----------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>MB</b> | 8,67(0,34) <sup>a</sup>     | 5,35(2,49) <sup>a</sup> | 2,32(1,18) <sup>b</sup> | 0,00(0,00) <sup>a</sup>      | 3,09(3,35) <sup>a</sup>      | 0,64(0,59) <sup>a</sup> |
| <b>B</b>  | 8,60(0,29) <sup>a</sup>     | 6,59(0,87) <sup>a</sup> | 3,23(1,02) <sup>a</sup> | 0,00(0,00) <sup>a</sup>      | 1,19(2,14) <sup>a</sup>      | 0,40(0,43) <sup>a</sup> |
| <b>M</b>  | 8,38(0,50) <sup>a</sup>     | 5,48(0,56) <sup>a</sup> | 3,47(0,87) <sup>a</sup> | 1,34(2,77) <sup>a</sup>      | 1,30(2,59) <sup>a</sup>      | 0,00(0,00) <sup>b</sup> |

|           | <i>Lactobacillus spp.</i> | <i>Lactococcus spp.</i> | <i>Leuconostoc spp.</i> | <i>Streptococcus spp.</i> | Fungos                  |
|-----------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>MB</b> | 8,37(0,37) <sup>a</sup>   | 8,43(0,47) <sup>a</sup> | 7,04(0,38) <sup>a</sup> | 6,69(0,39) <sup>a</sup>   | 3,73(1,29) <sup>b</sup> |
| <b>B</b>  | 8,56(0,62) <sup>a</sup>   | 8,47(0,36) <sup>a</sup> | 6,62(3,07) <sup>a</sup> | 6,58(0,43) <sup>b</sup>   | 5,27(0,65) <sup>a</sup> |
| <b>M</b>  | 8,14(0,51) <sup>a</sup>   | 8,20(0,61) <sup>a</sup> | 2,65(3,13) <sup>b</sup> | 7,23(0,49) <sup>a</sup>   | 5,13(0,87) <sup>a</sup> |

Na quantificação de microrganismos não se verificaram diferenças significativas na média das contagens para a maior parte dos parâmetros. Foi o caso da contagem total de microrganismos mesófilos, Enterobactérias, Estafilococos coagulase positiva e negativa, contagem de lactobacilos em MRS e contagem de Lactococos em M17.

É de salientar, no entanto que, não obstante estas não se verificarem, há valores médios diferentes que podem ser importantes. É o caso da média mais elevada na contagem total das amostras MB o que indicia a presença de mais microrganismos e maior variabilidade entre estes, já que todos são quantificáveis neste meio de cultura (PCA).

Continuando, no caso da contagem de Enterobactérias a média é inferior nas amostras MB e esta está associada a uma menor proporção de *E. coli* relativamente ao total de Enterobactérias. Este grupo bacteriano para além das questões de segurança, é mais associado a defeitos do queijo que a qualidades. A ausência de estafilococos coagulase positiva em todas as amostras MB e B. A presença de estafilococos coagulase negativa em maior proporção nos queijos MB, que alguns autores associam a propriedades benéficas dos queijos. E finalmente maiores quantidades de Bactérias lácticas como média do conjunto de amostras MB e B, que são o “motor” da fermentação dos queijos.

Nas restantes contagens observaram-se diferenças significativas entre os valores médios das amostras classificadas com MB e B relativamente às M ou, pelo menos, entre as MB e as M. É o caso das contagens de *E. coli* e de leveduras que são, em média, mais baixas nas amostras MB. Se esta avaliação é esperada no caso das contagens de *E. coli*, dado os efeitos normalmente negativos da sua presença nos queijos em todos os aspetos, não é tão óbvio no caso das leveduras, já que alguns autores as associam a aspetos positivos nos queijos. Poderá estar relacionado com o tipo de leveduras presentes nos queijos com pior classificação.

Entre os parâmetros com diferenças significativas estão também as médias relativas a contagens de *Leuconostoc* e Clostrídios, com médias mais elevadas e a presença em quantidades quantificáveis, respetivamente, nas amostras melhor classificadas (MB e B). A presença de ambos os géneros nos queijos já tem sido associada a propriedades benéficas do mesmo.

Nas médias da contagem de *Streptococcus* não se verificam diferenças significativas entre os queijos MB e M, apesar de serem ligeiramente superiores nos queijos pior classificados e mais baixas e próximas nos queijos MB e B. Esta situação pode dever-se ao fato das espécies presentes serem diferentes.

### 3.6. Estudo comparativo da microbiologia qualitativa de queijo Serpa com diferente avaliação sensorial

Com base nas identificações microbianas obtidas para cada amostra de queijo fizemos uma análise comparativa entre microrganismos identificados nas diferentes amostras com diferente classificação sensorial (MB, B e M), através do cálculo da sua presença percentual em cada uma das classificações. Na Figura 12 estão representados os resultados obtidos para o caso das identificações dos isolados em VRBG para os queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). As linhas a vermelho representam a proporção de cada microrganismo nos queijos M, as verdes nos queijos MB e as azuis nos queijos B.

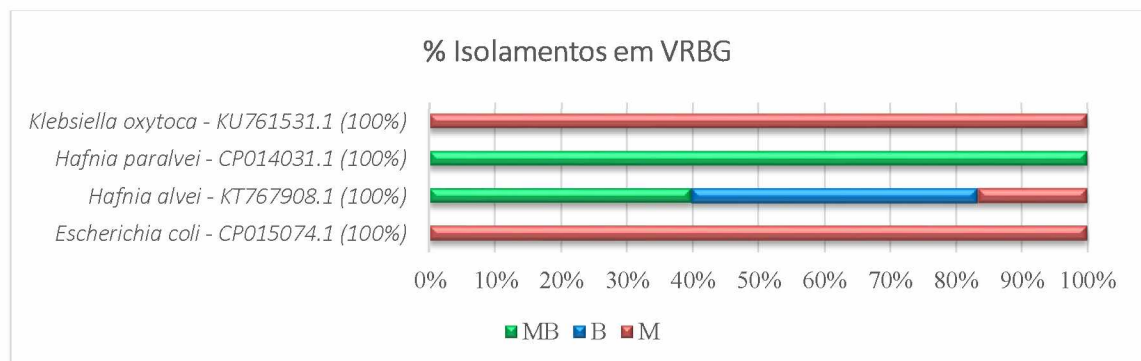


Figura 12 - % de Isolamentos em VRBG associados a queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

Como já referido foram identificadas quatro espécies de Enterobactérias neste meio de cultura. Esta avaliação indica a associação de *Hafnia paralvei* apenas a queijos MB, enquanto *Hafnia alvei* aparece em todos os tipos de queijo, mas especialmente nos muito bons (39,85%) e bons (43,48%). Aos queijos maus foram associadas *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Estas só se identificam mesmo neste tipo de queijos.

Na Figura 13 está representada a percentagem de isolamentos em BP de queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). Nos isolados obtidos a partir deste meio de cultura foram identificadas sete espécies do género *Staphylococcus*.

De entre as espécies identificadas *S. warneri*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis* foram identificados só nos queijos muito bons. *S. epidermidis* foi identificado nos queijos muito bons (14,29%) e bons (85,71%). *Staphylococcus aureus* só foi identificado nos queijos maus.

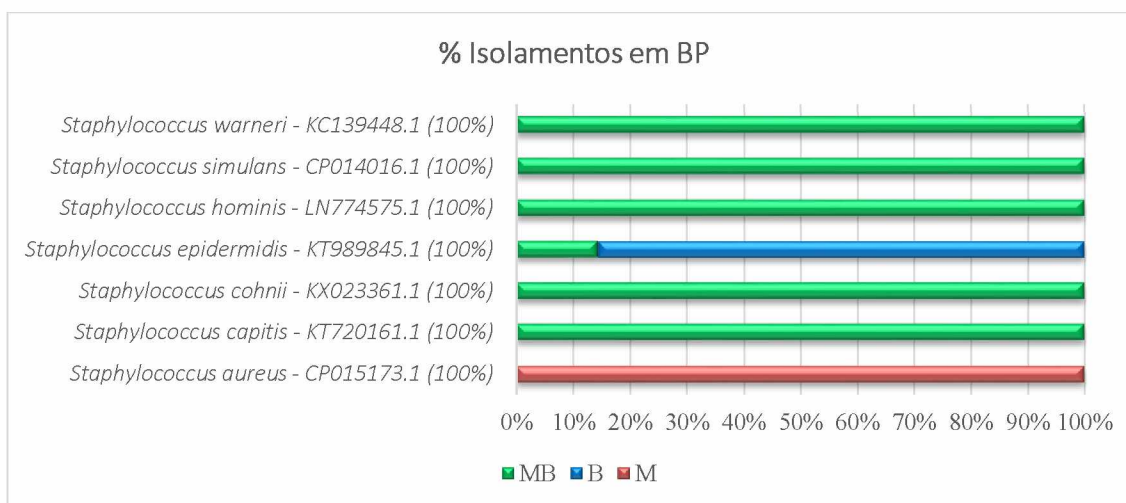


Figura 13 - % de Isolamentos em BP classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

Na Figura 14 está representada a percentagem de isolamentos de Bactérias Lácticas em queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). Foram isolados quatro géneros de bactérias Lácticas, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, incluindo cada uma, várias espécies.

Assim, *Lactobacillus coryniform* e *Enterococcus durans* só foram isolados a partir de queijos classificados como muito bom e *Lactobacillus pentosus* nos queijos bons.

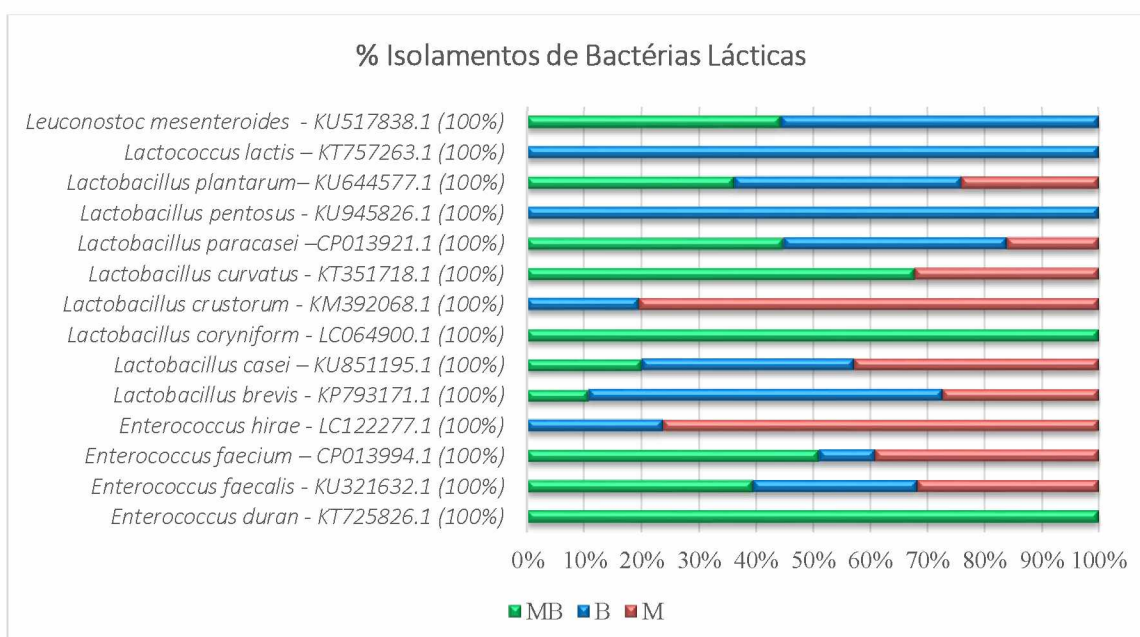


Figura 14 - % de Isolamentos de Bactérias Lácticas em queijos classificados como MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

O *Leuconostoc mesenteroides*, identificou-se a partir de queijos muito bons e bons. As restantes espécies aparecem em proporções mais ou menos equilibradas em todos os tipos de queijo, apenas *Lactobacillus crustorum* e *Enterococcus hirae* parecem estar mais associados a queijos com classificação de Maus.

Na Figura 15 está representado a percentagem de isolamentos de Leveduras em queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus). Foram isoladas 14 espécies de Leveduras.

No que respeita às leveduras, não obstante a mais baixa concentração em que foram quantificadas nos queijos muito bons, como já foi referido, podemos associar a presença de seis espécies diferentes apenas em queijos muito bons. Estas foram *Pichia kudriavzevii*, *Pichia fermentans*, *Magnusiomyces capitatus*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus oeingae* e *Candida pararugosa*. Ainda *Cyberlindnera jadinii* que só foi isolada a partir de queijos bons.

As Leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Moniliella suaveolens* só foram isoladas a partir de queijo classificado como maus.

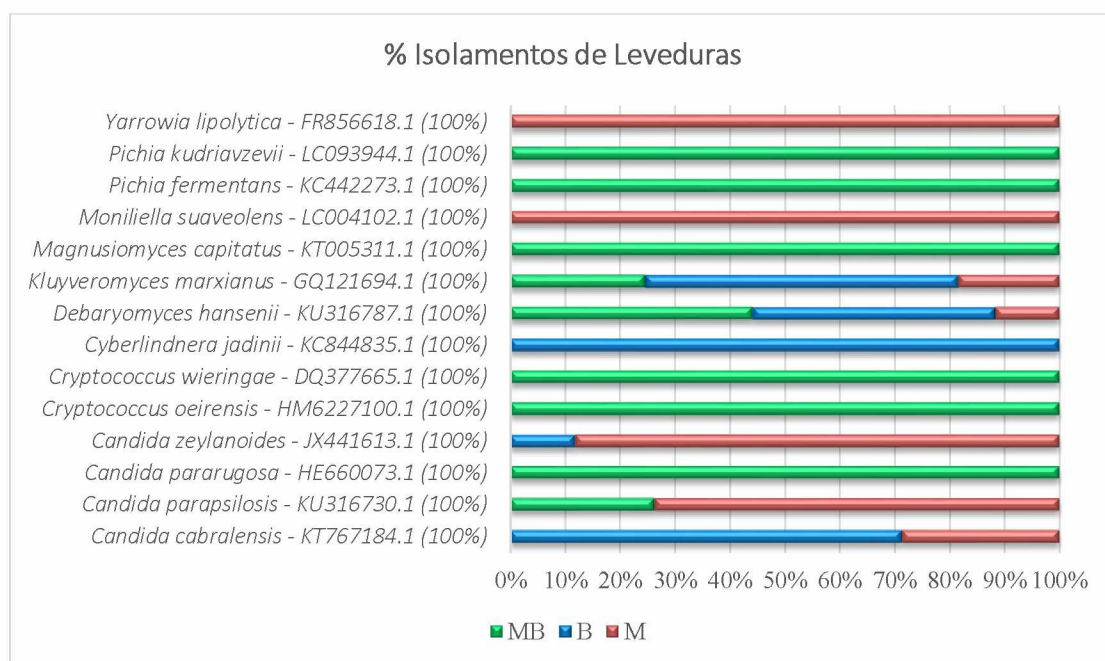


Figura 15 - % de Isolamentos de Leveduras em queijos classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

As espécies de Leveduras que apareceram nos três tipos de queijo foram *Kluyveromyces marxianus* (MB-24,62%, B-57,03% e M-18,35%) e *Debaryomyces hansenii* (MB-42,05%, B-52,01% e M-11,11%), podendo presumir-se que são as mais associadas à flora normal deste tipo de queijo, nesta fase de maturação.

As restantes espécies, todas do género *Candida*, aparecem associadas a queijos maus e a queijos bons ou muito bons. *C. zeylanoides*, no entanto, parece estar mais associada a queijos maus já que 88,13% dos isolados obtiveram-se a partir destes queijos. O mesmo se verifica com *C. parapsilosis* com 73,66% dos isolados obtidos a partir de queijo pior classificado.

É de salientar, a partir destes resultados, a importância das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Debaryomyces hansenii* como leveduras da flora normal do queijo, como já constatado, mas a possível importância para obtenção de bons queijos da presença de leveduras como *Pichia kudriavzevii*, *Pichia fermentans*, *Magnusiomyces capitatus*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus oirengae*, *Candida pararugosa* e *Cyberlindnera jadinii* pois, estas leveduras apareceram apenas nos queijos considerados bons e muito bons. Podem ser estirpes secundárias no processo, mas com algum efeito benéfico no produto final. Este efeito pode não resultar da ação individual, mas sim do conjunto de todas as espécies presentes. Estes resultados careçam de confirmação a partir do estudo de cada uma destas leveduras individualmente e em consórcios diversos, estabelecidos a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

## Conclusão

A primeira abordagem analítica nas dezasseis amostras de queijo foi sempre a da análise sensorial com base na ficha de certificação de queijo Serpa. Com base nos resultados obtidos os queijos foram classificados em maus (M) com pontuação inferior a 14 pontos, mínimo exigido para a certificação de queijo Serpa com sabor e aroma sempre com 4 pontos, bons (B) com pontuação entre 14 e 15,4 e muito bons (MB), desde que pontuação superior a 15,5. Desta forma a amostra ficou composta por 5 unidades classificadas como MB (PA1, PA2, PG1, PG2 e IA4) todas DOP, seis classificadas como B (PC1, PC2, IA3, IG3, IG4, IB2) em que cinco são DOP, e cinco classificadas como M (IC3, IC4, queijos DOP e IB1, IV1, IV2 não DOP) todas com sabor e aroma inferior a 4.

A avaliação sensorial das amostras com base nos atributos do produto, permitiu identificar os atributos mais associados aos queijos M, que foram o cheiro amoniacal, sabor picante ou amargo com afastamento do característico, textura granulosa pouco amanteigada e, finalmente flavour não característico. Esta avaliação pode facilitar, em estudos posteriores, a relação entre determinados microrganismos e estes atributos negativos.

A caracterização físico química dos queijos foi, na maior parte dos casos coincidente com a obtida em trabalhos anteriores em queijo Serpa ou de ovelha. A análise estatística revela, no entanto, diferenças significativas entre os resultados obtidos nas várias amostras. Algumas amostras não cumprem os valores estabelecidos no Reg. 39/87, que estabelece as características a que deve cumprir o queijo Serpa. É o caso da Humidade, do HQIMG (humidade isenta de matéria gorda) e o Coeficiente de Maturação. Neste caso todas as amostras apresentam valor muito inferior ao estabelecido de 45%. Estes resultados coincidem com os obtidos noutros trabalhos, embora, nem todos os queijos da amostra estivessem “terminados”, como diz o roupeiro e daí o coeficiente de maturação baixo.

Da análise de variância efetuada com os valores obtidos para os queijos com diferentes classificações sensoriais (MB, B, M), observa-se que os MB se destacam dos M, com diferenças significativas nas médias dos valores obtidos, relativamente ao pH que é mais elevado (5,37) assim como o azoto total (4,3), a proteína (27,42), o  $a_w$  (0,97 - 0,98), e a Humidade isenta de matéria gorda (63,46). As amostras MB são as que apresentam o coeficiente de maturação mais baixo.

Quanto à Dureza, os queijos MB foram aparentemente os menos duros, mais coesos e com menor adesividade. Na cor os queijos melhor classificados parecem apresentar menor luminosidade, assim como uma cor da crosta amarelo discreto a tender para esverdeado e uma cor da pasta menos amarela e menos esverdeada que os M.

As caracterizações físico-químicas das dezoito amostras de leite de ovelha cru revelam resultados comparáveis com outros autores nos parâmetros pH, acidez, gordura e proteína.

Na análise microbiológica é de salientar que os microrganismos patogênicos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*, não foram detetados em 25 g em nenhuma das amostras em estudo. No entanto, *E.coli* foi detetada em quantidades baixas em todas as amostras mas nenhuma foi identificada como enterohemorrágica. Além disso, *S. aureus* não foi quantificado em nenhum dos queijos DOP, apenas numa amostra proveniente de queijaria não certificada e em cinco das amostras de leite.

Na análise microbiológica do leite predominaram as bactérias lácticas com níveis inferiores a 6 log ufc/mL, seguidas das leveduras, enterobactérias e estafilococos coagulase negativa. A identificação dos isolados obtidos a partir destas contagens ainda não foi efetuada, estes resultados apontam o leite como fonte de muitos microrganismos do queijo.

Quanto à análise microbiológica quantitativa do queijo não se detetam diferenças significativas entre os resultados obtidos nas várias amostras, na maioria parte do parâmetro. A flora dominante é essencialmente constituída por bactérias lácticas, seguidas em menor proporção pelas enterobactérias e leveduras. As contagens nos meios de cultura PCA, MRS e M17 foram superiores a 8 log ufc/g em todas as amostras, o que comprova o domínio da flora láctica.

A identificação das bactérias isoladas revelou que os grupos predominantes pertencem às espécies de bactérias lácticas *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides*. No grupo das Enterobactérias predominou a espécie *Hafnia alvei*, presente em todos os queijos estudados. Foram identificadas quatro espécies de *Enterococcus*, isolados a partir do meio SB predominando *E. faecalis*.

No grupo dos Estafilococos isolados em meio *Baird Parker* foram identificadas sete espécies diferentes em todos os queijos. As espécies predominantes foram a *S. epidermidis* e a *S. warneri*.

No que respeita às leveduras as contagens foram inferiores a 6 log ufc/g em todos os produtores. As espécies maioritárias de leveduras, porque presentes em todas as amostras foram *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces marxianus*, mas também foram identificadas espécies do género *Candida*, entre outros.

Na análise de variância para as médias das contagens microbianas nos queijos MB, B e M obtiveram-se valores que parecem indicar uma associação entre amostras MB e valores mais baixos de Enterobactérias e uma menor proporção de *E.coli*, de leveduras, assim como ausência de *S. coagulase positiva*. Por outro lado, parecem associados a estas amostras valores superiores de contagens de bactérias lácticas, Estafilococos coagulase negativa e Clostrídios.

No estudo comparativo entre espécies presentes e classificação sensorial em M, B e MB parecem confirmar-se como espécies associadas ao processo, porque sempre presentes, *H. alvei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. brevis*, *E. faecium* e *E. faecalis*. Estas bactérias são provavelmente das mais importantes no processo de produção atuando como microrganismos impulsionadores ou até “starters” do processo.



Na mesma avaliação algumas espécies só parecem isolar-se a partir de queijos classificados como M, são *K. oxytoca*, *E.coli*, *S. aureus*, *Y. lipolytica* e *M. suavedans*.

Por outro lado, só aparecem em queijos melhores classificados (MB), as leveduras *Pichia kudriavzevii*, *Pichia fermentans*, *Magnusiomyces capitatus*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus oeirengae*, *Candida pararugosa* e *Cyberlindnera jadinii*, as bactérias lácticas *L. coryniform* e *E. durans* e outras bactérias como *H. paraalvei*, e os estafilococos *S. warneri*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S.capitis*. Todos estes microrganismos, não fazendo parte da flora principal do queijo, podem ter algum papel secundário importante que tenha contribuído para a avaliação sensorial positiva destes queijos.

Esta avaliação constitui apenas o estudo prévio para a identificação de microrganismos autóctones importantes no fabrico do queijo, que possam vir a ser utilizados quer como “*Starters*” principais, quer como adjuvantes de fermentação com benefícios para o processo de produção ou qualidade do queijo.

Estudos futuros devem debruçar-se sobre as características dos isolados, quer no que diz respeito às suas propriedades tecnológicas, quer antimicrobianas, quer probióticas. Desenho de inóculos com base nos resultados sobre a sua aplicação em laboratório e à escala piloto ou industrial.

## Bibliografia

- Albuquerque, T.C. 2010. *Perfil microbiano láctico do queijo de coalho artesanal de cacholeira*. s.l. : PE, Brasil - Recife, 2010.
- Alvarenga, N. 2000. *Estudos em Textura de Queijo Serpa*. Lisboa : Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, Instituto Superior de Economia e Gestão, Instituto Superior Técnico, 2000.
- Alvarenga, N., Canada, J. e Sousa, I. 2011. *Effect of freezing on the rheological and chemical properties of raw ewe's milk semi-soft cheese*. s.l. : Journal of Dairy Research, 78: 80-87., 2011.
- Alvarenga, N., et al. 2008. *Changes in chemical, physical and rheological properties of "Serpa" Cheese during the ripening*. s.l. : Journal of Dairy Research, 75: 233-239, 2008.
- Alvarenga, N.B.M.G. 2008. *Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha*. . s.l. : Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial – Instituto Superior de Agronomia, 2008.
- Álvarez, M.P, Flórez, A.B e López-Díaz, T. 2007. *Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese*. s.l. : International dairy journal, 17(8), 961-967., 2007.
- Amaral, O.M.R.P. 1996. *Caracterização de queijo Serpa proveniente de três genótipos ovinos*. Lisboa. : Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Alimentar., 1996.
- Andrade, R., et al. 2017. *Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation*. s.l. : Food Research International, v. 91, p. 72-79, 1. ISSN 0963-9969., 2017.
- AOAC. 1990a. *Official Methods of Analysis*. Arlington, Virginia. : Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth edición. Vol. one, 1990a.
- . 1990b. *Official Methods of Analysis*. Arlington, Virginia. : Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth edición. Vol. one, Arlington, Virginia., 1990b.
- Axelsson, L.T. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. s.l. : Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 1-72., 2004.
- Barata, Filipe Themudo. 2003. *A produção de queijo e o acesso aos pastos no Portugal da idade média*. . s.l. : Actas dos 6º encontros internacionais "Techniques et environnement" de Liessies «Le lait et les produits dérivés aux époques Médiévale et Médiévale et Moderne. Ed CD-Rom, 2003.
- Benito, M.J., et al. 2008. *Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages*. s.l. : Mead Science, 80(3), 656-661, 2008.
- Beresford, T.P., et al. 2001. *Recent advances in cheese microbiology*. s.l. : International Dairy Journal, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001. ISSN 0958-6946, 2001.
- Bettencourt, C.M.V e Pinheiro, C.M.S.C. 2008. *Queijo Serpa - Um Património a Preservar*. Serpa : Rota do Guadiana - Associação de Desenvolvimento Integrado; Confraria do Queijo Serpa, 2008.

- Bruno, L.M. e Carvalho, J.D.G. 2009. *Microbiota Láctica de Queijos Artesanais*. Fortaleza, CE : Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.
- Canada, J.S. 2001. *Caracterización sensorial y físico química del Queijo Serpa*. . Cáceres. Espanha. Cáceres. Espanha : Facultad de Extremadura - Facultad de veterinária, 2001.
- Cardoso, V, et al. 2015. *The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese*. s.l. : Food Research International, v. 69, p. 331-340, 3// 2015. ISSN 0963-9969., 2015.
- Coelho, I.S. 2003. *Queijos Portugueses com tradição*. Lisboa : Coleção rústica, nº1, edição unica. Estação Agronómica Nacional, 2003.
- Coton, M., et al. 2012. *Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses*. s.l. : Food Microbiology, v. 29, n. 1, p. 88-98, 2// 2012. ISSN 0740-0020., 2012.
- Cruz, F. e Menasche, R. 2014. *O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional*. s.l. : Revista Visa em debate - Sociedade, ciencia e tecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil, 2014.
- Dec. Reg. nº 39/87. *Decreto Regulamentar n.º 39/87 de 29 de Junho, definindo a Região Demarcada do Queijo Serpa*.
- Delamare, A.P., et al. 2012. *Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Characteristics of Serrano, an Artisanal Brazilian Cheese*. s.l. : Food and Nutrition Sciences, 1068-1075, 2012.
- DGADR b. 2014. *Evolução dos produtos tradicionais qualificados (Produção, Valor da Produção, Índices de Quantidades, Preços e Valores) 2002 a 2009*. s.l. : Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Ministério da Agricultura e do Mar, 2014.
- DGADR-a. 2014. *Evolução dos produtos Tradicionais com nomes protegidos (Produção, Valor da Produção, Índices de Quantidades, Preços e Valores) 1997 a 2001*. s.l. : 2ª Versão – Agosto de 2014. Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Ministério da Agricultura e do Mar, 2014.
- Dias, J.J.M. 1998. *Estudo de alguns parâmetros microbiológicos e tecnológicos do Queijo Serpa*. Lisboa : Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 1998.
- Embaló, D.P.C. 2014. *Estudo da Microbiota Láctica em leites fermentados artesanalmente consumidos no sul de Angola*. Lisboa : Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.
- FDA. 2016. *Microbiological Sampling Assignment. Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 Days*. . s.l. : Office of Compliance Center for Food Safety and Applied Nutrition.U.S Food and Drug Administration. USA, 2016.
- . 2012. *The Dangers of Raw Milk: Unpasteurized Milk Can Pose a Serious Health Risk*. *FoodFacts*. . USA : U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition Food Information., 2012.
- Ferreira, W.C.F, Sousa, J.C.F e Lima, N. 2010. *Microbiologia*. s.l. : Lidel – edições tecnicas, lda,, 2010.
- Fox , P., et al. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. USA : Aspen Publishers, 2000.

- Gallardo, G., et al. 2014. *Application of ISSR-PCR for rapid strain typing of Debaryomyces hansenii isolated from dry-cured Iberian ham*. s.l. : Food microbiology, 42, 205-211, 2014.
- Gardini, F, et al. 2006. *Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese*. Food microbiology, 23(7), 641-648. 2006.
- Gaya, P, Medina, M e Nuntez, M. 1987. *Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes' milk*. s.l. : Journal of applied bacteriology, 62(4), 321-326., 1987.
- Gomes, M.J.P. 2013. *Gênero Staphylococcus spp.* s.l. : UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- GPO. 2017. *Cheeses and Related Cheese Products. Code of Federal Regulations - CFR*. s.l. : Food and Drugs. Chapter I — Food and Drug Administration. Part 133. e-CFR data is current as of March 13, 2017. E, 2017.
- GPP. 2013. *Ficha de Internacionalização – Leite e Lactícínios*. . s.l. : Globalagrinar. Gabinete de Planeamento e políticas. Ministério da Agricultura e do Mar., 2013.
- Guerreiro, O., et al. 2013. *Molecular screening of ovine mastitis in different breeds*. s.l. : Journal Dairy Science, 96 :752–760., 2013.
- HPA. 2009. *Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods*. . s.l. : London: Health Protection Agency., 2009.
- ICMSF. 2006. *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities Volume 6 de Microorganisms in foods*. s.l. : International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Editora Springer Science & Business Media., 2006.
- IFT. 1981. *Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. Sensory Evaluation Division*. s.l. : Institute of Food Technologists, Food Technology, 35, 50-59., 1981.
- ISO 6658:2005. *Sensory analysis – Methodology – General Guidance*. s.l. : 2ª Ed.
- ISO 11290-2:1998. *Listeria monocytogenes*.
- ISO 15214:1998. *Regras gerais para a contagem de bactérias lácticas*.
- ISO 16649-2:2001. *Contagem de Escherichia coli*.
- ISO 3972. 1991. *Analyse Sensorielle. Méthodologie. Méthode d'éveil à la sensibilité gustative. 2ª Edition*. . Genève. : International Organization for Standardization. , 1991.
- ISO 5492. 1992. *Sensory Analysis - Vocabulary. International Organization for Standardization*. Geneve, Switzerland : s.n., 1992.
- ISO 6579:2002. *Pesquisa da Salmonella*.
- ISO 6888-1:1999. *Contagem de Staphylococcus*.
- Kongo, J.M. 2013. *Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments*. s.l. : INTECH - World's largest Science, Technology & Medicine Open Access boob publisher., 2013.
- Kuchroo, C.N. e Fox, P.F. 1982. *Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extration procedures*. s.l. : Milchwissenschaft 37, 331-335, 1982.
- Lacasse, D. 1995. *Introdução à Microbiologia Alimentar*. Lisboa : Les Éditions Saint-Martin, 1995.

- Ladenbach, L.H. e Marshal,, R. T. . 2009. *Microbiological Spoilage of Dairy Products*. s.l. : In W. H. Sperber & M. P. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety*. Glenview, USA: Springer Science and Business Media., 2009.
- Lawless, H.T. e Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practice*. New York, EUA : 2ª ed., Springer Science+Business Media, LLC, 596p., 2010.
- Little, C.L, et al. 2008. *Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK*. . s.l. : *Food Microbiology*, 25, 304-312., 2008.
- MADRP. 2007. *Leite e Lacticínios*. s.l. : Gabinete de Planeamentos e políticas, 2007.
- Minolta. 1991. *Chroma Meter CR-300/CR-310/CR-321/CR-331/CR-331C - Instruction Manual* . Japan : Minolta Co. Lda, 1991.
- Montel, M, et al. 2014. *Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits*. s.l. : *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154. doi:10.1016, 2014.
- Moreira, C.P.M. 2011. *Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Queijos*. Lisboa : Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa., 2011.
- Neto, I. 1959. *Análise de géneros alimentícios*. s.l. : Edição Lisboa, 1959.
- NP ISO 8586-2 . 2001. *Análise Sensorial. Guia Geral para a Selecção, Treino e Controlo dos Provadores. Parte. 2: Peritos*. Lisboa : Instituto Português da Qualidade, Lisboa, 2001.
- NP 2105. 1983. *Queijos. Determinação do Teor de Matéria Gorda. Técnica de Van Gulik*. Lisboa : Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro Alimentar, 1983.
- NP 3277:1987. *Contagem de bolores e leveduras*.
- NP 3544. 1987. *Queijos e queijos fundidos. Determinação do resíduo seco e do resíduo seco isento de matéria gorda*. . Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro-Alimentar : Ed.2 Lisboa, 1987.
- NP 4137:1991. *Contagem de Enterobacteriaceae*.
- NP 4258 . 1993. *Análise sensorial. Directivas gerais para a concepção dos locais apropriados para análise*. Lisboa : 1ª Edição. C 1140 /CT 114. IQA., 1993.
- NP 4263. 1994. *Análise sensorial. Vocabulário*. . Lisboa : CT 114. IQA. , 1994.
- NP 4405:2002. *Contagem de microrganismos a 30°C*.
- NP ISO 8586 – 1 . 2001. *Análise Sensorial. Guia geral para a selecção, treino e controlo dos provadores. Parte 1: Provadores qualificados*. Caparica. : CT 114. IPQ. , 2001.
- NP ISO 8586 – 2 . 2001. *Análise Sensorial. Guia geral para a selecção, treino e monitorização de provadores. Parte 2: Peritos*. . . Caparica. : CT 114. IPQ, 2001.
- Ordiales, E, et al. 2013. *Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter*. s.l. : *Food control*, 33(2), 448-454., 2013.
- Padilla, B, et al. 2014. *Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses*. . s.l. : *International Dairy Journal*, v. 35, n. 2, p. 122-129, 4. ISSN 0958-6946, 2014.
- Pereira, D.S., et al. 2000. *Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese*. s.l. : v.60, n.1, p 55. ISSN, 2000.

- Poullet, B, et al. 1991. *Microbial study os Casar de Cáseres cheese throughout ripening*. s.l. : Journal of Dairy Research, 58, 231-238, 1991.
- prNP 4394, . 2000. *Análise Sensorial. Metodologia. Guia geral*. 2000.
- Rebello, A. 1994. *Queijaria Racional*. Lisboa : Instituto de Estruturas Agrárias e Desenvolvimento Rural, 1994.
- Reg. (CE) nº 1662/2006. 2006. *Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal*. s.l. : Jornal Oficial da União Europeia, 2006.
- Reg. (CE) nº 2074/2005. *Medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Reg. (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu*. s.l. : Jornal oficial do Paarlamento Europeu.
- Reg. (CE) nº 852/2004. *Higiene dos géneros alimentícios*. s.l. : Parlamento Europeu e do Consumo. 29 de Abril de 2004.
- Reg. (CE) nº 853/2004. *e regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal*. s.l. : Jornal oficial da União Europeia. 29 de Abril de 2004.
- Reg. nº 2073/2005 (CE). *Critérios Microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*. s.l. : Jornal Oficial da União Europeia.
- Reg. nº 2081/92. *Regulamento (CEE) Nº2081/92 de 14 de Julho do Conselho Relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos Agrícolas e dos géneros alimentícios*. JO nº L208 de 24.7.1992. p.1.,
- Reis, P.J.M. e Malcata, F.X. 2011. *Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks*. s.l. : Small Ruminant Research, 101: 122-133., 2011.
- Rocha, S. 2005. *Empleo de técnicas moleculares para la caracterización de hongos que afectan la palma de aceite (No. A-)*. s.l. : Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma (Colombia)., 2005.
- Rola, J.G., et al. 2016. *Occurrence of Staphylococcus aureus on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland*. 2016.
- Roseiro, L.B., Wilbey, R.A. e Barbosa, M. 2003. *Serpa cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with Cynara cardunculus*. L.B. Roseiro, R.A Wilbey and M. Barbosa : Le Lait, 83: 469-481., 2003.
- Sánchez, E. 1999. *Evolution de la flora microbiana durante la maduración de quesos de oveja artesanos en diferentes condiciones de elaboración*. s.l.: Córdoba: Tese de Douturamento apresentada no Departamento de Bromatologia e Tecnologia dos Alimentos da faculdade Veterinária da universidade de Cordoba., 1999.
- Silva, L.J.M. 2011. *Isolamento e Caracterização Bioquímica das bactérias do Ácido Láctico do Queijo de São Jorge*. Angra do Heroísmo, Açores : Universidade dos Açores - Departamento de Ciências Agrárias, 2011.
- Soares, J., et al. 2011. *Biodiversity and characterization of Staphylococcus species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal*. s.l. : International Journal of Food Microbiology, v. 146, n. 2, p. 123-129. ISSN 0168-1605., 2011.

- Soares, J., et al. 2009. *Characterization of Staphylococcus strains collected throughout the production chain of a Ewe's milk cheese dairy plant*. s.l. : New Biotechnology, v. 25, Supplement, p. S103, 9. ISSN 1871-6784, 2009.
- Tabla, R, et al. 2016. *Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity*. s.l. : Small Ruminant Research, v. 145, p. 123-129, 12// 2016. ISSN 0921-4488., 2016.
- Teuber, M. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. s.l. : Volume 2 of the series The Lactic Acid Bacteria pp 173-234, 1995.
- Veiga, S.N.T. 2012. *Qualidade Microbiológica e Físico-Química de queijos comercializados em Portugal*. Lisboa : Faculdade de Medicina Veterinária, 2012.
- Verraes, C., et al. 2015. *A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk*. s.l. : International Dairy Journal, v. 50, p. 32-44, 11// 2015. ISSN 0958-6946., 2015.
- Vieira, R.P. 1994. *Regras de Produção do Queijo Serpa*. s.l. : IMAIAA, 1994.
- West, , H.G. 2008. *Food fears and raw-milk cheese*. s.l. : Appetite, Volume 51, 2008, pp 25-29, 2008.
- Wouters, J.T.M, et al. 2001. *Microbes from raw milk for fermented dairy products*. s.l. : International dairy journal 12, Netherlands, 2001.
- Yoon, Y, Lee, S e Choi, K.H. 2016. *Microbial benefits and risks of raw milk cheese*. s.l. : Food Control, v. 63, p. 201-215, May 2016. ISSN 0956-7135., 2016.

# Apêndices



Apêndices I – Gráficos da caracterização sensorial do queijo Serpa com base na ficha de descrição do produto



Figura 16 - Valores médios e desvio padrão resultados da análise sensorial do Queijo Serpa de vários produtores e duas épocas diferentes, referentes a análise sensorial segundo o boletim de certificação

## Apêndices II – Tabelas dos isolamentos das bactérias e leveduras

Tabela 36 – Identificação e numero de isolamentos em VRBG.

| Identificação                                 | Numero de isolamentos em VRBG |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | PA1                           | PA2 | PC1 | PC2 | PG1 | PG2 | IA3 | IA4 | IC3 | IC4 | IG3 | IG4 | IB1 | IB2 | IV1 | IV2 |
| <i>Hafnia alvei</i> - KT767908.1 (100%)       |                               | 3   | 3   | 3   | 4   |     | 5   | 3   | 2   | 3   | 4   | 3   |     | 4   | 1   |     |
| <i>Hafnia paralvei</i> - CP014031.1 (100%)    |                               | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Escherichia coli</i> - CP015074.1 (100%)   |                               |     |     |     |     |     |     |     | 1   |     |     |     | 3   |     | 3   | 2   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> - KU761531.1 (100%) |                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1   |
| <b>Total</b>                                  |                               | 4   | 3   | 3   | 4   |     | 5   | 3   | 3   | 3   | 4   | 3   | 3   | 4   | 4   | 3   |

Tabela 37 - Identificação e numero de isolamentos em SB.

| Identificação                                    | Numero de isolamentos em SB |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | PA1                         | PA2 | PC1 | PC2 | PG1 | PG2 | IA3 | IA4 | IC3 | IC4 | IG3 | IG4 | IB1 | IB2 | IV1 | IV2 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> - KU967147.1 (100%) | 3                           | 5   | 3   | 3   | 4   | 3   | 3   | 4   | 4   | 2   | 2   | 1   | 3   | 3   |     | 1   |
| <i>Enterococcus faecium</i> - CP014449.1 (100%)  | 1                           |     |     |     | 2   |     |     |     | 1   |     | 0   | 1   |     |     |     |     |
| <i>Enterococcus hirae</i> - LC122277.1 (100%)    |                             |     |     |     |     |     | 1   |     |     | 1   | 1   | 1   |     |     |     | 2   |
| <i>Enterococcus duran</i> - KT725826.1 (100%)    |                             |     |     |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <b>Total</b>                                     | 4                           | 5   | 3   | 3   | 7   | 3   | 4   | 4   | 5   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   |     | 3   |

Tabela 38 - Identificação e numero de isolamentos em BP.

| Identificação   | Numero de isolamentos em BP |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | PA1                         | PA2 | PC1 | PC2 | PG1 | PG2 | IA3 | IA4 | IC3 | IC4 | IG3 | IG4 | IB1 | IB2 | IV1 | IV2 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> - KT989845.1 (100%) | 2                           |     |     | 3   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus capitis</i> - KT720161.1 (100%)     | 1                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus hominis</i> - LN774575.1 (100%)     | 1                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus warneri</i> - KC139448.1 (100%)     |                             | 4   |     |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus simulans</i> - CP014016.1 (100%)    |                             | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> - KX023361.1 (100%)      |                             |     |     |     | 3   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> - CP015173.1 (100%)      |                             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2   |
| <b>Total</b>  | 4                           | 5   |     | 3   | 4   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2   |

Tabela 39 - Identificação e numero de isolamentos em M17.

| Identificação  | Numero de isolamentos em M17 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | PA1                          | PA2 | PC1 | PC2 | PG1 | PG2 | IA3 | IA4 | IC3 | IC4 | IG3 | IG4 | IB1 | IB2 | IV1 | IV2 |
| <i>Lactobacillus casei</i> - KR055511.1 (99%)        | 2                            |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Lactobacillus brevis</i> - KT757228.1 (100%)      |                              |     |     |     |     |     |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> - LC125266.1 (100%)   |                              |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Lactococcus lactis</i> - KT757263.1 (100%)        |                              |     | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - KT952377.1 (100%) |                              | 1   | 4   |     | 3   | 1   |     |     |     |     | 1   |     |     |     |     |     |
| <i>Enterococcus faecalis</i> - KU737539.1 (100%)     |                              | 1   |     |     |     |     | 1   | 1   | 1   |     |     |     | 1   |     | 1   |     |
| <i>Enterococcus hirae</i> - LC122277.1 (100%)        |                              |     |     |     |     |     |     |     |     | 1   |     |     | 1   |     |     | 2   |
| <i>Enterococcus faecium</i> - KT988060.1 (100%)      |                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2   |
| <b>Total</b>   | 2                            | 2   | 7   |     | 3   | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   | 0   | 1   | 2   | 0   | 1   | 4   |

Tabela 40 - Identificação e número de isolamentos em MRS.

| Identificação  | % de isolamentos em MRS |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|  | PA1                     | PA2      | PC1      | PC2      | PG1      | PG2      | IA3      | IA4      | IC3      | IC4      | IG3      | IG4      | IB1      | IB2      | IV1      | IV2      |
| <i>Enterococcus faecalis</i> - KU321632.1 (100%)     | 1                       |          |          |          |          |          |          | 1        |          |          |          |          | 1        |          |          |          |
| <i>Enterococcus hirae</i> - LC122277.1 (99%)         |                         |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        |
| <i>Enterococcus faecium</i> - CP013994.1 (100%)      | 3                       |          |          |          |          |          |          | 1        |          |          |          |          |          |          |          | 1        |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> - CP013921.1 (100%)   | 2                       | 4        | 1        | 3        | 2        | 1        | 2        |          | 3        |          | 1        |          |          |          |          |          |
| <i>Lactobacillus casei</i> - KU851195.1 (100%)       | 1                       | 1        | 1        | 1        |          | 1        | 1        |          | 3        | 2        | 2        | 2        |          |          | 2        |          |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> - KU644577.1 (100%)   |                         |          |          |          | 2        | 2        | 3        |          |          |          |          | 1        | 2        |          |          |          |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> - KU945826.1 (100%)    |                         |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        |          |          |          |          |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> - KT351718.1 (100%)    |                         |          |          |          |          | 1        |          | 2        |          |          |          |          |          |          | 1        |          |
| <i>Lactobacillus crustorum</i> - KM392068.1 (100%)   |                         |          |          |          |          |          | 1        |          |          |          |          |          |          |          | 2        |          |
| <i>Lactobacillus coryniform</i> - LC064900.1 (100%)  |                         |          |          |          |          | 1        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>Lactobacillus brevis</i> - KP793171.1 (100%)      |                         |          | 1        |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        | 5        | 1        |          |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - KU517838.1 (100%) |                         | 1        | 3        | 2        | 1        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <b>Total</b>   | <b>7</b>                | <b>6</b> | <b>6</b> | <b>6</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>4</b> | <b>6</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>2</b> |

Tabela 41 - Identificação e número de isolamentos em RBCA.

| Identificação                                       | % de isolamentos em RBCA |           |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
|---|--------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
|   | PA1                      | PA2       | PC1       | PC2       | PG1      | PG2      | IA3       | IA4       | IC3       | IC4      | IG3      | IG4       | IB1      | IB2      | IV1      | IV2      |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> - KU316787.1 (100%)    | 3                        | 1         |           |           |          |          | 10        | 17        |           |          |          | 1         | 5        | 2        |          |          |
| <i>Cryptococcus ozeirensis</i> - HM6227100.1 (100%) | 3                        |           |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> - GQ121694.1 (100%)  | 1                        |           | 9         | 11        | 2        | 5        |           |           | 13        |          | 7        | 6         | 1        |          |          |          |
| <i>Cryptococcus wieringae</i> - DQ377665.1 (100%)   | 1                        |           |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Pichia fermentans</i> - KC442273.1 (100%)        |                          | 3         |           |           | 3        | 1        |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Candida pararugosa</i> - HE660073.1 (100%)       |                          | 3         |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Candida parapsilosis</i> - KU316730.1 (100%)     |                          |           |           |           |          | 1        |           |           |           |          |          |           |          |          |          | 2        |
| <i>Candida zeylanoides</i> - JX441613.1 (100%)      |                          |           |           |           |          |          |           |           | 2         | 6        |          | 4         |          |          | 2        | 3        |
| <i>Candida cabralensis</i> - KT767184.1 (100%)      |                          |           |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           | 1        | 1        |          |          |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> - LC093944.1 (100%)      |                          | 3         |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Magnusiomyces capitatus</i> - KT005311.1 (100%)  |                          | 1         |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Cyberlindnera jadinii</i> - KC844835.1 (100%)    |                          |           | 1         |           |          |          |           |           |           |          |          |           |          |          |          |          |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> - FR856618.1 (100%)      |                          |           |           |           |          |          |           |           | 1         | 1        |          |           | 1        |          |          |          |
| <i>Moniliella suaveolens</i> - LC004102.1 (100%)    |                          |           |           |           |          |          |           |           |           |          |          |           | 1        |          | 1        |          |
| <b>Total</b>  | <b>8</b>                 | <b>11</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>5</b> | <b>7</b> | <b>10</b> | <b>17</b> | <b>16</b> | <b>7</b> | <b>7</b> | <b>11</b> | <b>9</b> | <b>3</b> | <b>3</b> | <b>5</b> |

## Apêndices III – Tabelas da % de isolamentos das bactérias e leveduras

Tabela 42 - % de Isolamentos em VRBG classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

| Identificação                                 | % de isolamentos em VRBG |       |        |
|---|--------------------------|-------|--------|
|   | MB                       | B     | M      |
| <i>Escherichia coli</i> - CP015074.1 (100%)   |                          |       | 100,00 |
| <i>Hafnia alvei</i> - KT767908.1 (100%)       | 39,85                    | 43,48 | 16,67  |
| <i>Hafnia paralvei</i> - CP014031.1 (100%)    | 100,00                   |       |        |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> - KU761531.1 (100%) |                          |       | 100,00 |

Tabela 43 - % de Isolamentos em SB classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

| Identificação                                    | % de isolamentos em SB |       |       |
|--|------------------------|-------|-------|
|  | MB                     | B     | M     |
| <i>Enterococcus duran</i> - KT725826.1 (100%)    | 100,00                 |       |       |
| <i>Enterococcus faecium</i> - CP014449.1 (100%)  | 58,71                  | 21,72 | 19,57 |
| <i>Enterococcus hirae</i> - LC122277.1 (100%)    |                        | 37,92 | 62,08 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> - KU967147.1 (100%) | 34,90                  | 34,55 | 30,55 |

Tabela 44 - % de Isolamentos em BP classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

| Identificação   | % de isolamentos em BP |       |        |
|---|------------------------|-------|--------|
|   | MB                     | B     | M      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> - CP015173.1 (100%)      |                        |       | 100,00 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> - KT720161.1 (100%)     | 100,00                 |       |        |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> - KX023361.1 (100%)      | 100,00                 |       |        |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> - KT989845.1 (100%) | 14,29                  | 85,71 |        |
| <i>Staphylococcus hominis</i> - LN774575.1 (100%)     | 100,00                 |       |        |
| <i>Staphylococcus simulans</i> - CP014016.1 (100%)    | 100,00                 |       |        |
| <i>Staphylococcus warneri</i> - KC139448.1 (100%)     | 100,00                 |       |        |

Tabela 45 - % de Isolamentos de Bactérias Lácticas e classificadas em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

| Identificação  | % de isolamentos de Bactérias Lácticas |        |       |
|--|--|--------|-------|
|  | MB                                     | B      | M     |
| <i>Enterococcus duran</i> - KT725826.1 (100%)        | 100,00                                 |        |       |
| <i>Enterococcus faecalis</i> - KU321632.1 (100%)     | 39,49                                  | 28,69  | 31,81 |
| <i>Enterococcus faecium</i> - CP013994.1 (100%)      | 50,97                                  | 9,80   | 39,24 |
| <i>Enterococcus hirae</i> - LC122277.1 (100%)        |  | 23,81  | 76,19 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> - KP793171.1 (100%)      | 10,79                                  | 61,81  | 27,40 |
| <i>Lactobacillus casei</i> - KU851195.1 (100%)       | 20,08                                  | 37,09  | 42,83 |
| <i>Lactobacillus coryniform</i> - LC064900.1 (100%)  | 100,00                                 |        |       |
| <i>Lactobacillus crustorum</i> - KM392068.1 (100%)   |  | 19,58  | 80,42 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> - KT351718.1 (100%)    | 67,72                                  |        | 32,28 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> - CP013921.1 (100%)   | 44,77                                  | 39,13  | 16,10 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> - KU945826.1 (100%)    |  | 100,00 |       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> - KU644577.1 (100%)   | 36,25                                  | 39,62  | 24,13 |
| <i>Lactococcus lactis</i> - KT757263.1 (100%)        |  | 100,00 |       |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> - KU517838.1 (100%) | 44,32                                  | 55,68  |       |

Tabela 46 - % de Isolamentos em RBCA classificados em MB (muito bons), B (bons) e M (maus).

| Identificação                                      | % de isolamentos em RBCA |       |       |
|--|--------------------------|-------|-------|
|  | MB                       | B     | M     |
| <i>Candida cabralensis</i> - KT767184.1 (100%)     |                          | 71,47 | 28,53 |
| <i>Candida parapsilosis</i> - KU316730.1 (100%)    | 26,34                    |       | 73,66 |
| <i>Candida pararugosa</i> - HE660073.1 (100%)      | 100                      |       |       |
| <i>Candida zeylanoides</i> - JX441613.1 (100%)     |                          | 11,87 | 88,13 |
| <i>Cryptococcus oeilensis</i> - HM6227100.1 (100%) | 100                      |       |       |
| <i>Cryptococcus wieringae</i> - DQ377665.1 (100%)  | 100                      |       |       |
| <i>Cyberlindnera jadinii</i> - KC844835.1 (100%)   |                          | 100   |       |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> - KU316787.1 (100%)   | 42,05                    | 42,01 | 11,11 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> - GQ121694.1 (100%) | 24,62                    | 57,03 | 18,35 |
| <i>Magnusiomyces capitatus</i> - KT005311.1 (100%) | 100                      |       |       |
| <i>Moniliella suaveolens</i> - LC004102.1 (100%)   |                          |       | 100   |
| <i>Pichia fermentans</i> - KC442273.1 (100%)       | 100                      |       |       |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> - LC093944.1 (100%)     | 100                      |       |       |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> - FR856618.1 (100%)     |                          |       | 100   |

## Apêndices IV – Tabelas da análise sensorial

Tabela 47 - Valores médios, desvio padrão e resultados da análise de variância do Queijo Serpa, referentes a análise sensorial.

|     | Forma                     | Cor da Casta            | Cor da Pasta             | Olhos                      | Cheiro (Característico) | Cheiro (Amoniacal)      | Textura (Granulosa)          | Textura (Amanteigada)      |
|-----|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
| PA1 | 7,00(0,94) <sup>a</sup>   | 6,60(0,84) <sup>a</sup> | 5,50(1,27) <sup>ab</sup> | 4,30(1,83) <sup>abcd</sup> | 6,40(1,26) <sup>a</sup> | 4,20(2,10) <sup>a</sup> | 2,40(0,70) <sup>ef</sup>     | 5,50(1,65) <sup>abc</sup>  |
| PA2 | 6,90(0,57) <sup>a</sup>   | 5,80(0,92) <sup>a</sup> | 5,10(1,52) <sup>ab</sup> | 4,40(1,71) <sup>abcd</sup> | 6,10(1,37) <sup>a</sup> | 3,20(1,55) <sup>a</sup> | 2,90(1,20) <sup>cdef</sup>   | 5,10(1,79) <sup>abcd</sup> |
| PC1 | 6,11(1,27) <sup>a</sup>   | 5,22(1,30) <sup>a</sup> | 4,56(1,33) <sup>ab</sup> | 4,67(1,80) <sup>abcd</sup> | 5,33(1,73) <sup>a</sup> | 2,89(1,36) <sup>a</sup> | 3,33(2,00) <sup>bcdef</sup>  | 5,33(1,87) <sup>abcd</sup> |
| PC2 | 5,78(1,48) <sup>ab</sup>  | 6,56(0,88) <sup>a</sup> | 5,44(1,42) <sup>ab</sup> | 3,22(1,56) <sup>bcd</sup>  | 5,78(1,86) <sup>a</sup> | 2,89(1,69) <sup>a</sup> | 2,56(0,73) <sup>def</sup>    | 6,78(1,56) <sup>a</sup>    |
| PG1 | 6,67(1,32) <sup>a</sup>   | 6,11(1,27) <sup>a</sup> | 5,11(1,17) <sup>ab</sup> | 4,44(1,74) <sup>abcd</sup> | 6,33(1,32) <sup>a</sup> | 3,00(1,87) <sup>a</sup> | 2,22(0,67) <sup>ef</sup>     | 5,22(2,05) <sup>abcd</sup> |
| PG2 | 6,44(1,33) <sup>a</sup>   | 6,33(1,00) <sup>a</sup> | 5,56(1,24) <sup>ab</sup> | 4,33(1,66) <sup>abcd</sup> | 6,44(1,33) <sup>a</sup> | 3,11(1,90) <sup>a</sup> | 2,00(0,50) <sup>f</sup>      | 6,22(1,72) <sup>ab</sup>   |
| IA3 | 3,09(1,04) <sup>bc</sup>  | 3,73(1,56) <sup>a</sup> | 4,55(1,63) <sup>ab</sup> | 4,27(2,05) <sup>abcd</sup> | 5,55(1,51) <sup>a</sup> | 2,64(2,01) <sup>a</sup> | 2,55(1,63) <sup>def</sup>    | 6,45(1,81) <sup>a</sup>    |
| IA4 | 6,00(1,79) <sup>ab</sup>  | 5,18(1,72) <sup>a</sup> | 4,45(1,81) <sup>ab</sup> | 2,27(1,10) <sup>d</sup>    | 6,00(1,90) <sup>a</sup> | 2,18(0,75) <sup>a</sup> | 1,55(0,52) <sup>f</sup>      | 7,82(0,75) <sup>a</sup>    |
| IC3 | 4,90(1,97) <sup>abc</sup> | 6,10(2,23) <sup>a</sup> | 3,90(1,45) <sup>b</sup>  | 6,60(1,51) <sup>ab</sup>   | 4,30(1,57) <sup>a</sup> | 4,80(1,99) <sup>a</sup> | 5,50(2,72) <sup>abcde</sup>  | 2,80(1,99) <sup>bcd</sup>  |
| IC4 | 5,20(2,10) <sup>abc</sup> | 6,10(2,38) <sup>a</sup> | 4,10(1,45) <sup>ab</sup> | 6,20(1,55) <sup>abc</sup>  | 4,30(2,16) <sup>a</sup> | 5,80(2,20) <sup>a</sup> | 6,60(1,51) <sup>ab</sup>     | 2,30(1,06) <sup>bcd</sup>  |
| IG3 | 6,30(1,34) <sup>a</sup>   | 6,00(1,70) <sup>a</sup> | 3,70(1,49) <sup>b</sup>  | 6,90(0,88) <sup>a</sup>    | 5,80(1,87) <sup>a</sup> | 3,40(1,96) <sup>a</sup> | 3,40(1,78) <sup>bcdef</sup>  | 5,50(1,58) <sup>abc</sup>  |
| IG4 | 6,00(1,05) <sup>ab</sup>  | 6,30(1,57) <sup>a</sup> | 3,90(1,37) <sup>b</sup>  | 6,20(0,92) <sup>abc</sup>  | 5,90(1,66) <sup>a</sup> | 3,30(1,95) <sup>a</sup> | 3,90(1,73) <sup>abcdef</sup> | 5,30(1,49) <sup>abcd</sup> |
| IB1 | 7,22(0,97) <sup>a</sup>   | 6,00(1,32) <sup>a</sup> | 5,11(1,54) <sup>ab</sup> | 6,22(2,05) <sup>abc</sup>  | 4,56(1,94) <sup>a</sup> | 4,25(2,49) <sup>a</sup> | 7,00(1,22) <sup>a</sup>      | 1,78(0,67) <sup>d</sup>    |
| IB2 | 7,67(0,49) <sup>a</sup>   | 5,00(1,60) <sup>a</sup> | 4,33(1,72) <sup>ab</sup> | 5,67(0,89) <sup>abcd</sup> | 6,25(0,97) <sup>a</sup> | 2,50(1,17) <sup>a</sup> | 3,17(1,40) <sup>cdef</sup>   | 4,83(1,75) <sup>abcd</sup> |
| IV1 | 2,50(1,24) <sup>a</sup>   | 7,25(1,71) <sup>a</sup> | 7,33(1,30) <sup>a</sup>  | 4,17(1,75) <sup>abcd</sup> | 6,08(2,11) <sup>a</sup> | 4,17(2,12) <sup>a</sup> | 6,00(1,48) <sup>abc</sup>    | 2,42(1,56) <sup>bcd</sup>  |
| IV2 | 6,60(1,07) <sup>a</sup>   | 5,50(1,84) <sup>a</sup> | 6,70(1,06) <sup>ab</sup> | 3,00(1,56) <sup>cd</sup>   | 6,30(0,95) <sup>a</sup> | 3,30(1,83) <sup>a</sup> | 5,90(1,66) <sup>abcd</sup>   | 2,60(0,97) <sup>bcd</sup>  |

|     | Sabor (Doce)            | Sabor (Salgado)         | Sabor (Acido)           | Sabor (Picante)         | Sabor (Amargo)          | Flavour (caract.)         | Flavour (Manteiga)      | Persistência            | Gosto Residual          |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PA1 | 2,60(1,51) <sup>a</sup> | 5,40(1,65) <sup>a</sup> | 4,70(1,83) <sup>a</sup> | 3,70(1,70) <sup>a</sup> | 3,80(2,04) <sup>a</sup> | 6,10(1,29) <sup>abc</sup> | 5,20(1,23) <sup>a</sup> | 6,40(0,97) <sup>a</sup> | 4,10(2,08) <sup>a</sup> |
| PA2 | 3,10(1,73) <sup>a</sup> | 4,90(1,79) <sup>a</sup> | 4,10(1,60) <sup>a</sup> | 3,50(1,72) <sup>a</sup> | 3,30(2,26) <sup>a</sup> | 6,00(1,63) <sup>abc</sup> | 4,60(2,01) <sup>a</sup> | 6,10(1,60) <sup>a</sup> | 4,60(2,27) <sup>a</sup> |
| PC1 | 2,11(0,93) <sup>a</sup> | 4,89(1,54) <sup>a</sup> | 4,44(2,24) <sup>a</sup> | 3,11(1,69) <sup>a</sup> | 3,22(1,48) <sup>a</sup> | 5,78(1,56) <sup>abc</sup> | 4,33(1,94) <sup>a</sup> | 5,67(1,00) <sup>a</sup> | 4,11(1,69) <sup>a</sup> |
| PC2 | 2,56(1,88) <sup>a</sup> | 4,89(1,62) <sup>a</sup> | 5,22(2,59) <sup>a</sup> | 3,44(1,67) <sup>a</sup> | 3,33(1,87) <sup>a</sup> | 6,00(0,71) <sup>abc</sup> | 4,78(2,05) <sup>a</sup> | 6,56(1,51) <sup>a</sup> | 5,22(2,17) <sup>a</sup> |
| PG1 | 2,33(1,00) <sup>a</sup> | 5,56(1,33) <sup>a</sup> | 5,22(1,86) <sup>a</sup> | 3,44(1,74) <sup>a</sup> | 3,00(1,50) <sup>a</sup> | 7,00(0,87) <sup>ab</sup>  | 5,00(1,87) <sup>a</sup> | 6,33(0,87) <sup>a</sup> | 4,89(1,96) <sup>a</sup> |
| PG2 | 2,33(1,22) <sup>a</sup> | 5,44(1,51) <sup>a</sup> | 4,78(1,72) <sup>a</sup> | 4,00(2,18) <sup>a</sup> | 3,78(1,79) <sup>a</sup> | 7,33(0,50) <sup>a</sup>   | 5,67(1,80) <sup>a</sup> | 6,22(1,48) <sup>a</sup> | 4,56(1,94) <sup>a</sup> |
| IA3 | 3,55(2,11) <sup>a</sup> | 5,00(1,10) <sup>a</sup> | 5,00(1,79) <sup>a</sup> | 3,64(1,69) <sup>a</sup> | 3,91(2,30) <sup>a</sup> | 6,18(1,83) <sup>abc</sup> | 5,45(1,63) <sup>a</sup> | 5,82(1,17) <sup>a</sup> | 4,27(2,53) <sup>a</sup> |
| IA4 | 3,00(1,48) <sup>a</sup> | 5,64(1,50) <sup>a</sup> | 5,64(1,96) <sup>a</sup> | 3,91(1,97) <sup>a</sup> | 4,45(2,54) <sup>a</sup> | 6,64(1,80) <sup>abc</sup> | 6,00(1,67) <sup>a</sup> | 5,64(1,21) <sup>a</sup> | 4,27(2,37) <sup>a</sup> |
| IC3 | 1,80(0,79) <sup>a</sup> | 5,50(2,17) <sup>a</sup> | 6,90(1,29) <sup>a</sup> | 4,10(2,23) <sup>a</sup> | 5,30(2,50) <sup>a</sup> | 3,40(1,71) <sup>c</sup>   | 3,50(2,22) <sup>a</sup> | 5,50(2,12) <sup>a</sup> | 5,00(2,45) <sup>a</sup> |
| IC4 | 1,90(1,29) <sup>a</sup> | 5,60(2,17) <sup>a</sup> | 7,30(1,06) <sup>a</sup> | 4,90(2,56) <sup>a</sup> | 6,40(1,84) <sup>a</sup> | 3,30(1,77) <sup>c</sup>   | 3,10(2,13) <sup>a</sup> | 5,80(2,15) <sup>a</sup> | 4,70(2,31) <sup>a</sup> |
| IG3 | 1,90(0,74) <sup>a</sup> | 6,10(1,29) <sup>a</sup> | 6,40(1,35) <sup>a</sup> | 4,30(1,77) <sup>a</sup> | 3,80(1,75) <sup>a</sup> | 5,30(2,26) <sup>abc</sup> | 5,00(2,00) <sup>a</sup> | 6,40(0,84) <sup>a</sup> | 4,80(1,99) <sup>a</sup> |
| IG4 | 1,60(0,70) <sup>a</sup> | 5,80(0,92) <sup>a</sup> | 6,30(1,16) <sup>a</sup> | 3,80(1,55) <sup>a</sup> | 4,10(2,02) <sup>a</sup> | 5,10(2,02) <sup>abc</sup> | 5,30(2,11) <sup>a</sup> | 6,60(0,70) <sup>a</sup> | 5,10(2,13) <sup>a</sup> |
| IB1 | 2,56(1,74) <sup>a</sup> | 5,56(2,19) <sup>a</sup> | 5,67(1,41) <sup>a</sup> | 4,56(2,19) <sup>a</sup> | 5,00(1,87) <sup>a</sup> | 3,44(1,24) <sup>bc</sup>  | 2,67(1,12) <sup>a</sup> | 5,78(1,56) <sup>a</sup> | 4,56(1,59) <sup>a</sup> |
| IB2 | 2,75(1,48) <sup>a</sup> | 4,50(1,24) <sup>a</sup> | 3,75(1,29) <sup>a</sup> | 4,00(1,76) <sup>a</sup> | 3,33(1,92) <sup>a</sup> | 6,33(1,07) <sup>abc</sup> | 4,92(1,73) <sup>a</sup> | 6,17(1,27) <sup>a</sup> | 4,50(2,02) <sup>a</sup> |
| IV1 | 2,33(1,07) <sup>a</sup> | 6,00(1,91) <sup>a</sup> | 5,25(1,29) <sup>a</sup> | 5,92(1,56) <sup>a</sup> | 4,92(2,02) <sup>a</sup> | 4,92(1,56) <sup>abc</sup> | 3,00(2,65) <sup>a</sup> | 6,50(1,17) <sup>a</sup> | 5,25(2,26) <sup>a</sup> |
| IV2 | 2,40(1,35) <sup>a</sup> | 6,80(1,40) <sup>a</sup> | 4,40(1,65) <sup>a</sup> | 5,30(1,95) <sup>a</sup> | 3,80(2,04) <sup>a</sup> | 5,20(1,87) <sup>abc</sup> | 3,90(1,85) <sup>a</sup> | 5,70(1,34) <sup>a</sup> | 4,30(1,83) <sup>a</sup> |

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas  $P < 0,05$ ,  $n=10$  (teste *Scheffé*)