



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária



**CATAA**  
CENTRO DE APOIO  
TECNOLÓGICO **AGRO ALIMENTAR**

# Qualidade do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP e efeito da época do ano na qualidade microbiológica

Ana Sofia Paulino Rodrigues

## **Orientadores**

Doutora Cristina Baptista Santos Pintado

Mestre Ana Isabel Teixeira Riscado

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob orientação da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Mestre Ana Isabel Teixeira Riscado, do Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar, Castelo Branco.

março de 2023



## Composição do júri

Presidente do júri

João Pedro Várzea Rodrigues, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Vogais

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professor adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Doutor, Luís Pedro Mota Pinto de Andrade

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco



## **Dedicatória**

À minha família

Ao meu filho

À vida!



## Agradecimentos

No culminar desta etapa quero expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e tornaram possível a realização deste trabalho. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se uma referência especial:

Em primeiro lugar à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Cristina Baptista Santos Pintado, por me ter aceitado como sua estagiária e me ter guiado durante este último ano. Pelo empenho demonstrando desde o primeiro dia, bem como pela transmissão de conhecimentos, pelo grande rigor científico, pela exigência, pela cedência de documentação bibliográfica, pela leitura crítica, orientação e correção do texto escrito. O seu rigor, visão crítica e conhecimento científico foram fundamentais para concretização deste trabalho.

À Eng<sup>a</sup> Ana Riscado, pelo apoio científico na realização das análises efetuadas, pela cedência de documentação bibliográfica e leitura crítica do texto escrito. Não esquecendo a Dra. Cristina Miguel Pintado pelo empenho demonstrando desde início, bem como pela transmissão de conhecimentos.

Ao Prof. Doutor António Moitinho Rodrigues pelo incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Catarina Gavinhos, pela ajuda no tratamento e discussão de dados.

À Dra. Inês Brandão pela sua transmissão de conhecimentos, rigor científico e orientação.

À Eng<sup>a</sup> Ana Silveira e ao Eng.<sup>o</sup> Mário Cristóvão por me ter acompanhado no Laboratório de Microbiologia, e recolha de amostras, por todos os conhecimentos transmitidos, companheirismo e o apoio que me deram.

De seguida ao Centro Apoio Tecnológico Agro-Alimentar e ao seu Diretor Técnico Científico, Doutor Christophe Espírito Santo, por me ter permitido realizar o estágio.

À Helena, Ana Martins, Cátia Batista, Vanessa, Filomena, pelo apoio e incentivo ao longo do trabalho.

Ao meu colega de curso Mário Ramos, pela amizade, companheirismos.

Ao meu David pela compreensão e apoio nesta reta final.

Aos meus pais e irmã que nunca me deixam desistir de nada, e por serem o meu maior exemplo. E ao meu Filho. Este trabalho é para vocês.

A todos, **Muito Obrigado.**





O Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro (CENTRO 04-3928- FEDER-000014) é um projeto cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## Resumo

Este trabalho, integrado no Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro, teve como objetivos analisar a qualidade microbiológica do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP e verificar se a época de produção do leite e do queijo influenciam a respetiva qualidade microbiológica. Foram analisadas 31 amostras de leite cru e 20 amostras de Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP.

A avaliação da qualidade microbiológica de leite cru incluiu a quantificação (UFC/mL) de mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva, leveduras e bolores. Para a caracterização microbiológica do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, foi feita a quantificação (UFC/g) de bactérias lácticas, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, bactérias coliformes, *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores, e foi feita a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados do leite cru demonstram que o leite tem qualidade insatisfatória. No verão verificaram-se valores médios das contagens de *Pseudomonas* spp. de 4,6 Log UFC/mL, estatisticamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos leites analisados nas restantes épocas. À semelhança do que se observou para *Pseudomonas* spp., os leites analisados no verão apresentaram valores médios das contagens de psicrotróficos (4,8 Log UFC/mL), inferiores aos leites analisados na primavera e no outono, tendo-se verificado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o verão < primavera e inverno < primavera. Relativamente à contagem de bolores e leveduras, obtiveram-se contagens médias de bolores (inverno < outono < primavera < verão) inferiores às contagens de leveduras (outono < inverno < primavera < verão), verificando-se apenas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na contagem de leveduras para verão < outono (3,5 - 5,7 Log UFC/mL) e primavera < outono (3,8 - 5,7 Log UFC/mL).

Todos os queijos analisados apresentaram ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra, o que significa que, relativamente a estes dois parâmetros microbiológicos, são considerados seguros para consumo.

As contagens médias dos diferentes grupos microbianos no queijo, à exceção dos bolores e dos estafilococos coagulase positiva, são superiores no inverno do que nas restantes estações do ano. Para as bactérias lácticas obtiveram-se contagens superiores no inverno > outono > verão > primavera, não se tendo verificado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes épocas. Em relação às bactérias coliformes, embora se tenham obtido contagens médias superiores no inverno > primavera > verão > outono, não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre épocas. Relativamente à média das contagens de *Escherichia coli*, obtiveram-se contagens superiores no inverno, nas diferentes épocas, no entanto sem significância estatística.

À semelhança do leite, obtiveram-se contagens de leveduras superiores às contagens de bolores. Para os bolores obtiveram-se contagens superiores na primavera (1,5 Log UFC/g), não se tendo verificado diferenças significativas entre as diferentes épocas. Já em relação à quantificação de leveduras, verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o inverno > primavera (4,3 - 3,4 Log UFC/g) respetivamente. Para as médias das contagens de psicrotróficos e *Enterobacteriaceae*, também não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), tendo-se obtido contagens superiores no inverno (7,4 e 4,8 Log UFC/g), respetivamente. Tanto no leite como no queijo o grupo predominante são os microrganismos psicrotróficos.

## Palavras-chave

Qualidade microbiológica; Leite cru; Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP; Efeito da época de produção.



## Abstract

This work, part of the Program for the Enhancement of the Chain of Cheese in the Central Region, aimed to analyze the microbiological quality of *Queijo Amarelo da Beira Baixa* PDO and to verify whether the season of the year of milk and cheese influences the respective microbiological quality. Thirty one samples of raw milk and 20 samples of *Queijo Amarelo da Beira Baixa* DOP were analyzed.

The evaluation of the microbiological quality of raw milk included the quantification (CFU/mL) of mesophiles, psychrotrophs, *Pseudomonas* spp., coliform bacteria,  $\beta$ -glucuronidase positive *Escherichia coli*, yeasts and molds. For the microbiological characterization of the *Queijo Amarelo da Beira Baixa* DOP, the quantification (CFU/g) of lactic acid bacteria, psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, coliform bacteria,  $\beta$ -glucuronidase positive *Escherichia coli*, coagulase positive staphylococci, yeasts and molds was carried out. The detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* was also done.

The results of raw milk demonstrate that the milk has unsatisfactory quality. In the summer, mean values of *Pseudomonas* spp. of 4.6 Log CFU/mL were observed, statistically lower ( $p < 0.05$ ) than the milk analyzed in the remaining seasons. Similar to what was observed for *Pseudomonas* spp., the milk analyzed in summer showed mean values of psychrotrophic counts (4.8 Log CFU/mL) lower than the milk analyzed in spring and autumn, with significant differences being verified ( $p < 0.05$ ) between summer < spring and winter < spring. With regard to mold and yeast counts, mean mold counts (winter < autumn < spring < summer) were lower than yeast counts (autumn < winter < spring < summer), with only significant differences ( $p < 0, 05$ ) in yeast counts for summer < autumn (3.5 – 5.7 Log CFU/mL) and spring < autumn (3.8 – 5.7 Log CFU/mL).

All analyzed cheeses showed absence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in 25 g of sample, which means that, regarding these two microbiological parameters, they are considered safe for consumption.

The average counts of different microbial groups in cheese, with the exception of molds and coagulase positive staphylococci, are higher in winter than in other seasons. For lactic acid bacteria, higher counts were obtained in winter > autumn > summer > spring, with no significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different seasons. Regarding coliform bacteria, although higher mean counts were obtained in winter > spring > summer > autumn, there were no significant differences ( $p < 0.05$ ) between seasons. Regarding the mean counts of *Escherichia coli*, higher counts were obtained in winter, at different seasons, however without statistical significance.

As with milk, yeast counts were higher than mold counts. For molds, higher counts were obtained in the spring (1.5 Log CFU/g), with no significant differences being verified between the different seasons. Regarding the quantification of yeasts, there were significant differences ( $p < 0.05$ ) between winter > spring (4.3 - 3.4 Log CFU/g) respectively. For the mean counts of psychrotrophs and *Enterobacteriaceae*, there were also no significant differences ( $p < 0.05$ ), with higher counts being obtained in winter (7.4 and 4.8 Log CFU/g), respectively. In both milk and cheese samples, the predominant group is psychrotrophic microorganisms.

## Keywords

Microbiological quality; Raw milk; *Queijo Amarelo da Beira Baixa* PDO; Effect of season of the year.



# Índice geral

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. LEITE CRU .....	3
2.2. QUEIJOS TRADICIONAIS PORTUGUESES .....	4
2.3. FATORES TECNOLÓGICOS MAIS DETERMINANTES E SUA INFLUÊNCIA NO FABRICO E NAS CARACTERÍSTICAS DOS QUEIJOS.....	7
2.3.1. <i>Matéria - prima</i> .....	7
2.3.2. <i>Coagulação</i> .....	11
2.3.3. <i>Dessoramento</i> .....	11
2.3.4. <i>Moldagem e prensagem</i> .....	12
2.3.5. <i>Salga</i> .....	12
2.3.6. <i>Cura / Maturação</i> .....	12
2.4. MICROBIOLOGIA DOS QUEIJOS TRADICIONAIS .....	14
2.4.1. <i>Microbiota do leite cru</i> .....	14
2.4.2. <i>Microbiota dos queijos feitos com leite cru</i> .....	17
2.4.3. <i>Potencial dos microrganismos na produção de queijo</i> .....	20
2.4.3.1. Microrganismos de interesse tecnológico .....	20
Bactérias lácticas.....	20
Fungos filamentosos .....	21
2.4.3.2. Microrganismos que afetam a qualidade .....	22
Bactérias coliformes.....	22
<i>Escherichia coli</i> .....	23
<i>Pseudomonas</i> spp. e outros microrganismos psicotróficos .....	24
Leveduras .....	24
<i>Enterobacteriaceae</i> .....	25
2.4.3.3. Microrganismos que afetam a segurança alimentar .....	25
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
<i>Salmonella</i> spp.....	25
<i>Staphylococcus</i> produtores de coagulase.....	26
2.5. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS APLICÁVEIS PELA LEGISLAÇÃO NACIONAL.....	26
<b>3. QUEIJOS DA BEIRA BAIXA DOP</b> .....	<b>30</b>
3.1. ÁREA GEOGRÁFICA DE PRODUÇÃO .....	30
3.1.1. <i>Clima</i> .....	31
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP.....	32
<i>Tecnologia de fabrico</i> .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1. AMOSTRAGEM .....	36
4.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E DE QUEIJO .....	37
4.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
5.1. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU E EFEITO DA ÉPOCA DE PRODUÇÃO. ....	39
5.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP E EFEITO DA ÉPOCA DE PRODUÇÃO .....	42
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>





## Índice de figuras

FIGURA 1 - QUEIJOS PORTUGUESES COM DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA E SUA CLASSIFICAÇÃO.....	6
FIGURA 2 - CADEIA DE QUALIDADE DO QUEIJO TRADICIONAL.....	7
FIGURA 3 - ESQUEMA REPRESENTANDO O CONJUNTO DOS ELEMENTOS INTERVENIENTES NA MATURAÇÃO DO QUEIJO.....	13
FIGURA 4 – OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO MICROBIOMA AO LONGO DO TEMPO NUM QUEIJO FABRICADO COM LEITE CRU; L-LEITE; C-COALHADA..	18
FIGURA 5 - ÁREAS GEOGRÁFICAS DEFINIDAS PARA PRODUÇÃO DOS QUEIJOS DA BEIRA BAIXA DOP. ....	31
FIGURA 6- PRECIPITAÇÃO EM CASTELO BRANCO.....	31
FIGURA 7 - TEMPERATURA DO AR EM CASTELO BRANCO.....	32
FIGURA 8 – SELOS QUE DEVEM CONSTAR NOS RÓTULOS DOS QUEIJOS DA BEIRA BAIXA DOP. ....	34
FIGURA 9 - FASES DE PRODUÇÃO DO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP. ....	35
FIGURA 10 – CONTAGENS MICROBIANAS NO LEITE (31 AMOSTRAS), EM QUE CADA ESTAÇÃO SÃO EXPRESSAS COMO VALORES MÉDIOS ± DESVIO-PADRÃO PARA CADA MICROORGANISMO, LETRAS DIFERENTES DENTRO DE CADA GRUPO MICROBIANO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES (P<0,05) DE ACORDO COM OS TESTES NÃO PARAMÉTRICOS, NOMEADAMENTE O TESTE DE KRUSKAL-WALLIS. ....	39
FIGURA 11- CONTAGENS MICROBIANAS NO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP (20 AMOSTRAS), EM QUE CADA ESTAÇÃO SÃO EXPRESSAS COMO VALORES MÉDIOS ± DESVIO-PADRÃO PARA CADA MICROORGANISMO, LETRAS DIFERENTES DENTRO DE CADA GRUPO MICROBIANO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES (P<0,05) DE ACORDO COM OS TESTES NÃO PARAMÉTRICOS, NOMEADAMENTE O TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....	43



## Índice de tabelas

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO GERAL DO LEITE DE ESPÉCIES SELECIONADAS DE MAMÍFEROS (%).....	3
TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS QUANTO À CONSISTÊNCIA. ....	5
TABELA 3- CLASSIFICAÇÃO DOS QUEIJOS QUANTO À MATÉRIA GORDA.....	5
TABELA 4- EXEMPLO DO EFEITO TEMPERATURA SOBRE UM LEITE COM UMA CONTAGEM INICIAL DE $2,3 \times 10^3$ UFC/ML...9	
TABELA 5- FONTES DE CONTAMINAÇÃO E TIPOS DE MICRORGANISMOS QUE PODEM SER ENCONTRADOS.....	15
TABELA 6- CONTAGENS DE DIFERENTES MICRORGANISMOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU.....	16
TABELA 7- CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS DO LEITE NÃO TRATADO TERMICAMENTE E USADO PARA PRODUÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS. ....	27
TABELA 8 - CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS A VERIFICAR EM QUEIJOS FABRICADOS COM LEITE CRU (CRITÉRIOS DE SEGURANÇA) (REG. (CE) N.º 2073/2005). ....	28
TABELA 9 - CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS A VERIFICAR EM QUEIJOS FABRICADOS COM LEITE CRU (CRITÉRIOS DE HIGIENE DOS PROCESSOS) (REG. (CE) N.º 2073/2005). ....	28
TABELA 10 - “VALORES-GUIA INSA” - MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE E DE ALTERAÇÃO EM ALIMENTOS PRONTOS PARA CONSUMO. ....	29
TABELA 11- PRINCIPAIS CARATERÍSTICAS DO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP.....	33
TABELA 12 - TEMPERATURA, HUMIDADE E PERÍODO MÍNIMO DE CURA DO QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP. ....	34
TABELA 13 – CARATERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU RECOLHIDAS PARA ANÁLISE.....	36
TABELA 14 – CARATERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE QUEIJO CURADO RECOLHIDAS PARA ANÁLISE.....	37
TABELA 15 – PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E METODOLOGIAS USADAS NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU. ..	37
TABELA 16 – PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E METODOLOGIAS USADAS NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE QUEIJO. ....	38
TABELA 17 - INFLUÊNCIA SAZONAL NAS CONTAGENS MICROBIANAS (LOG UFC/ML) NAS AMOSTRAS DE LEITE ANALISADAS.....	40
TABELA 18 - VALORES MÉDIOS E DESVIOS-PADRÃO DAS CONTAGENS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA, E RESULTADOS DAS PESQUISAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. E DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NOS QUEIJOS AMARELOS DA BEIRA BAIXA DOP. ....	42
TABELA 19 - INFLUÊNCIA SAZONAL NAS CONTAGENS MICROBIANAS (LOG UFC/G) NAS AMOSTRAS DE QUEIJO AMARELO DA BEIRA BAIXA DOP ANALISADAS. ....	44



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

APQDCB	Associação dos Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco
$a_w$	Atividade da água
BP+RPF	Baird-Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen Agar
CATAA	Centro Apoio Tecnológico Agro-Alimentar
CE	Comissão Europeia
DGADR	Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DG18	Dichloran Glycerol Chloramphenicol Agar
DOP	Denominação de Origem Protegida
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
ETG	Especialidade Tradicional Garantida
IGP	Indicação Geográfica Protegida
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO	International Standardization Organization
MRS	Man, Rogosa and Sharpe Agar
PCA	Plate Count Agar
PPA	Penicillin and Pimaricin Agar
TBX	Tryptone Bile Agar
TSC	Tryptose Sulfito Cycloserine Aga
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colónia
VRBG	Violet Red Bile Glucose
VRBL	Violet Red Bile Lactose Agar



# 1. Introdução

Para promover a aplicação de altos padrões de qualidade e apoiar a proteção jurídica com dados técnicos, alguns países europeus criaram denominações de origem protegida (Freitas e Malcata, 2000). A autenticidade de produtos lácteos típicos tornou-se um tópico relevante para produtores, investigadores e consumidores. Por esta razão, a comunidade europeia criou em 1992 três sistemas de produção denominados DOP (Denominação de Origem Protegida), IGP (Indicação Geográfica Protegida) e TSG (Especialidade tradicional garantida) (Bonetta *et al.*, 2008).

O fabrico de queijo ovino em Portugal é uma atividade antiga e com alguma tradição no que respeita ao tipo de fabrico utilizado e características específicas do produto final – textura e sabor. Ao longo do tempo, a tradição foi mantida o que conferiu, no plano comercial, uma reconhecida qualidade dos produtos queijeiros, sendo que muitos destes beneficiam da proteção de legislação europeia, Denominação de Origem Protegida (Nunes, 2018).

O uso de denominação de origem protegida obriga a que o queijo seja produzido de acordo com determinadas regras, designadamente, condições de produção de leite, higiene da ordenha e conservação do leite e fabrico do produto (DRAP-Centro, 2023). A garantia de autenticidade e origem do produto, estão interligadas às características intrínsecas e inequívocas do produto. A componente microbiana é fundamental para a determinação da qualidade dos queijos, sendo a dinâmica das interações entre os diferentes grupos de microrganismos naturalmente presentes um fator determinante na qualidade final do queijo produzido.

A qualidade dos queijos é influenciada não só pela qualidade do leite como de outros fatores. Segundo Martins (2003), os fatores mais determinantes na queijaria tradicional são: o leite cru como elo fundamental da ligação do produto às regiões e do reflexo das mesmas tipicidades, e os processos de transformação – tecnologia, criando condições específicas para que se definam as características de produto. Os queijos portugueses mais apreciados são produzidos a partir de leite cru de ovelha e/ou cabra. Tendo treze destes queijos a Denominação de Origem Protegida: Queijo Amarelo da Beira Baixa, Queijo de Castelo Branco, Queijo Picante da Beira Baixa, Queijo de Azeitão, Queijo de Cabra Transmontano, Queijo de Évora, Queijo de Nisa, Queijo do Pico, Queijo do Rabaçal, Queijo de São Jorge, Queijo de Serpa, Queijo Serra da Estrela e Queijo do Terrincho.

O Queijo Amarelo da Beira Baixa - DOP é um queijo curado, de pasta semidura ou semimole, ligeiramente amarelado, com alguns olhos irregulares, obtido por esgotamento lento da coalhada após coagulação do leite cru de ovelha, *estreme*, ou mistura de leite de ovelha e cabra, pela ação do coalho animal (DRAP-Centro, 2023).

A área geográfica de produção fica circunscrita a todas as freguesias dos concelhos de Castelo Branco, Fundão, Belmonte, Penamacor, Idanha-a-Nova, Vila Velha de Rodão, Proença-a-Nova, Vila de Rei, Sertã, Oleiros, Mação e às freguesias de Aldeia de São Francisco, União das Freguesias de Barco e Coutada, Boidobra, União das freguesias de Casegas e Orondo, União das freguesias de Covilhã e Canhoso, Dominguiso, Ferro, Orjais, Peraboa, União das freguesias de Peso e Vales do Rio, São Jorge da Beira, Sobral de São Miguel, União de freguesias de Teixoso e Sarzedo, Tortosendo, União das freguesias de Vale Formoso e Aldeia do Souto do concelho da Covilhã (Caderno de Especificações - Queijo da Beira Baixa DOP, 2016).

Para além da matéria-prima e das condições de produção e transformação, vários estudos indicam que a época de produção pode influenciar a qualidade microbiológica e físico-química dos leites e dos queijos.

Freitas e Malcata (2000) compilaram vários estudos ao nível dos aspetos microbiológicos e bioquímicos dos queijos produzidos com leite cru de ovelha e/ou cabra com estatuto DOP. No entanto, estudos relativos às características microbiológicas do Queijo Amarelo da Beira Baixa são praticamente inexistentes (Freitas e Malcata, 2000).

Tendo em conta o que foi anteriormente referido, pretendemos com este trabalho dar um contributo para a caracterização do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, tendo sido estabelecidos os seguintes objetivos:

- ✓ Analisar a qualidade microbiológica dos Queijos Amarelos da Beira Baixa DOP;
- ✓ Verificar se a época de produção do leite e do queijo influenciam a respetiva qualidade microbiológica.



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Leite cru

O leite define-se como um fluido biológico de elevado valor nutricional para as espécies mamíferas, podendo ainda ser caracterizado como um líquido branco, opaco, duas vezes mais viscoso que a água, de sabor ligeiramente açucarado, de odor pouco acentuado, com fraca tensão superficial e que forma espuma facilmente quando agitado (Alves *et al.*, 2009). Pode ser obtido de uma variedade de fontes animais, tais como vacas, cabras, ovelhas e búfalos, bem como humanos, para consumo humano (Quigley *et al.*, 2013). Qualquer que seja a sua origem, o leite é composto pelos mesmos constituintes maioritários, variando apenas a percentagem de cada um deles, como se pode verificar na Tabela 1, para o caso do leite de vaca, cabra e ovelha. A água é o componente principal e a lactose e a caseína são os seus componentes característicos. Além destes contém lípidos, minerais e vitaminas (Batista, 2017).

**Tabela 1** - Composição geral do leite de espécies selecionadas de mamíferos (%).

Parâmetros	Tipo de leite		
	Vaca (%)	Cabra (%)	Ovelha (%)
Gordura	3,6	3,8	7,9
Sólidos não gordurosos	9,0	8,9	12,0
Lactose	4,7	4,1	4,9
Proteína	3,2	3,4	6,2
Caseína	2,6	2,4	6,2
Albumina, globulina	0,6	0,6	1,0
Cinzas	0,7	0,6	0,9
Viscosidade (cP)	2,0	2,12	2,86-3,93
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,023 -1,039	1,029 -1,039	1,034 -1,038
Índice crioscópico (°C)	0,530 - 0,570	0,540 - 0,573	0,570
Acidez (% em ácido láctico)	15 -18	14 - 23	22 - 25
pH	6,65 - 6,71	6,50 - 6,80	6,51 - 6,85

Fonte: Adaptado de Park *et al.* (2007).

Por se tratar de um alimento rico em princípios nutritivos com elevada quantidade de água, a sua conservação sem intervenção tecnológica é praticamente impossível, sendo portanto uma substância altamente perecível e um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários grupos de microrganismos que nele encontram condições ótimas de multiplicação (Lourenço, 2015). O processo de higienização e controlo microbiológico dos contaminantes presentes no leite em toda a cadeia de produção e distribuição, bem como dos seus derivados, é um fator fundamental para a obtenção de produtos com qualidade (Reis *et al.*, 2013).

Aproximadamente um terço da produção mundial de leite é utilizado no fabrico de queijo, na maioria a partir do leite da vaca, ovelha ou cabra. No entanto, também existem queijos produzidos a partir do leite da búfala, como é o caso do Mozzarella (Ganchinho, 2020).

O leite cru encontra-se definido como: "leite produzido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C, nem submetido a um tratamento de efeito equivalente" de acordo com o Regulamento (CE) nº 1662/2006 de 18 de novembro, que altera o Regulamento (CE) n.º 853/2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

Para que o leite cru seja considerado de boa qualidade, deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de microrganismos patogénicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas (Reis *et al.*, 2013).

A carga microbiana inicial do leite pode ser definida como a concentração de microrganismos presentes no leite imediatamente após a sua ordenha, estando este já armazenado no tanque de refrigeração. A qualidade do leite cru refrigerado está diretamente relacionada com as condições higio-sanitárias na sua obtenção, armazenamento e transporte, sendo dependente do grau de contaminação inicial e do binómio temperatura/tempo de refrigeração em que o leite permanece desde a ordenha até o seu processamento (Reis *et al.*, 2013).

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 (Serol, 2017). Segundo Morais (2018) o leite cru pode ser utilizado no fabrico de queijos curados desde que sejam respeitados os períodos de cura e utilizadas as boas práticas de fabrico, que incluem a exigência de só utilizar leite de alta qualidade e a rigorosa higiene no local de produção dos queijos.

## 2.2. Queijos Tradicionais Portugueses

De acordo com o *Codex Alimentarius*, queijo é um produto fresco ou curado, semiduro, duro ou extra duro que pode ser revestido e no qual a relação proteínas do soro/caseína, não pode exceder a do leite. Tem de ser obtido por coagulação total ou parcial da proteína do leite, do leite desnatado, parcialmente desnatado, nata, nata do lactossoro ou leitelho, ou qualquer combinação destes. Essa coagulação é feita graças à ação do coalho ou de outros agentes apropriados e por dessoramento parcial do lactossoro, respeitando o princípio de que o fabrico do queijo resulta numa concentração da proteína do leite, em particular na fração da caseína e que, em consequência, o teor proteico do queijo será significativamente maior de que o teor de proteína da mistura dos ingredientes dos quais o queijo foi feito. Pode também ser obtido pelo emprego de técnicas de fabrico que provoquem a coagulação do leite e/ou das matérias-primas dele derivadas de forma a obter um produto final que tenha as características físicas, químicas e organoléticas semelhantes ao do produto definido anteriormente (CA, 2011).

As características do queijo resultam de um conjunto de ações físicas, químicas e bioquímicas, exercidas sobre o leite e os seus componentes, por via de diversos fatores de transformação e agentes químicos e biológicos, nativos do leite, adquiridos ao longo do ciclo de transformação, ou ainda adicionados ao longo do processo de fabrico. As características do queijo refletem-se na sua qualidade sendo que, alguns, o aspeto é a sua característica mais importante (Martins e Vasconcelos, 2003). Segundo a Portaria nº 73/90 de 1 de fevereiro, o queijo pode ser classificado:

### ▪ Quanto à cura

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

- **Quanto à composição**

- Queijo sem adição de géneros alimentícios diferentes do queijo;
- Queijo com adição de géneros alimentícios diferentes do queijo.

- **Quanto à consistência**

A classificação é feita em função da percentagem de humidade para cada tipo de queijo, suposto este isento de matéria gorda, conforme o indicado na Tabela 2.

**Tabela 2-** Classificação dos queijos quanto à consistência.

<b>Classificação</b>	<b>Humidade no queijo suposto isento de matéria gorda</b>
Extraduro	Máximo - 51%
Pasta dura	De 49 % a 56 %
Pasta semidura	De 54 % a 63 %
Pasta semimole	De 61 % a 69 %
Pasta mole	Superior a 67 %

**Fonte:** Adaptado de Portaria nº 73/90 de 1 de fevereiro.

- **Quanto à matéria gorda**

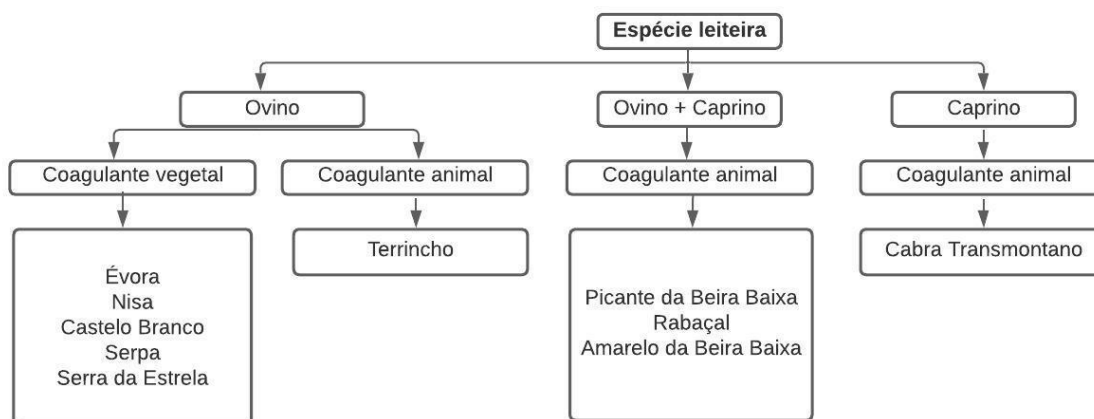
A classificação é feita em função da percentagem de matéria gorda no extrato seco, conforme o indicado na Tabela 3.

**Tabela 3-** Classificação dos queijos quanto à matéria gorda.

<b>Classificação</b>	<b>Matéria gorda no extrato seco</b>
Muito gordo ou extragordo	Superior a 60 %
Gordo	De 45 % a 60 %
Meio gordo	De 25 % a 45 %
Pouco gordo	De 10 % a 25 %
Magro	Máximo - 10 %

**Fonte:** Adaptado de Portaria nº 73/90 de 1 de fevereiro.

Em Portugal são fabricados e comercializados uma vasta gama de queijos tradicionais de elevada riqueza e especificidade (Baptista, 2018), consequência direta de um território nacional fértil em boas pastagens, facto que implicou desde cedo a sua inclusão nas Denominações de Origem Protegida (Baptista, 2018; Garcia, 2014). Só em Portugal continental, há 11 queijos com DOP como pode observar-se na Figura 1, onde também se mostra a classificação com base na espécie leiteira, tipo de coagulante e consistência da pasta.



**Figura 1** - Queijos Portugueses com Denominação de Origem Protegida e sua classificação.  
**Fonte:** Adaptado de Reis e Malcata (2011).

A Denominação de Origem Protegida consiste num mecanismo de proteção das indicações geográficas e denominações de origem de produtos agrícolas e de géneros alimentícios da União Europeia e dos países do Espaço Económico Europeu que resulta da aplicabilidade direta dos Estados Membros da União do Regulamento (Regulamento (CE) n.º 510/2006, de 20 de março de 2006). Este Regulamento define «Denominação de origem»: o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excecionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício:

- Originário dessa região, desse local determinado ou desse país;
- Cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos, e
- Cuja produção, transformação e laboração ocorrem na área geográfica delimitada.

Os queijos portugueses DOP encontram-se devidamente regulamentados, o que contribui para a confiança dos consumidores (Pinho *et al.*, 1999). Segundo o Regulamento (CE) n.º 510/2006 do conselho de 20 de março de 2006 relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, o uso da designação DOP obriga a que os queijos sejam produzidos de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações, o qual inclui, designadamente, as condições, de fabrico do produto.

Os queijos tradicionais Portugueses são queijos curados, cujo fabrico segue geralmente, protocolos artesanais (Freitas *et al.*, 2000). Para o fabrico destes queijos tradicionais utiliza-se leite de cabra, e/ou de ovelha e, nas ilhas, leite de vaca. O leite utilizado é cru, e os agentes coagulantes são de origem animal (quimosina) ou vegetal (flor de cardo *Cynara cardunculus* L) (Pinho *et al.*, 1999).

O leite cru, matéria-prima comum a todos os queijos tradicionais portugueses com denominação de origem protegida é porventura, o fator de maior relevância para este tipo de produtos, quer como fator de qualidade, quer como principal fonte de problemas para o produto (Martins e Vasconcelos, 2003). O leite cru é considerado como o representante da grande maioria dos fatores da tipicidade do queijo (Martins e Vasconcelos, 2003). Todos os queijos produzidos de modo artesanal possuem um elevado valor intrínseco, decorrente das suas características sensoriais únicas, influenciadas pela tecnologia de fabrico e pelas raças animais, vegetação e clima das regiões onde são produzidos (Freitas *et al.*, 2000; Reis e Malcata, 2011; Canada, 1998).

## 2.3. Fatores tecnológicos mais determinantes e sua influência no fabrico e nas características dos queijos.

A qualidade do queijo varia com as características da matéria-prima e o modo como se processam as diferentes operações tecnológicas, o que representa uma enorme gama de possibilidades que determinam grande parte da diversidade de queijos existentes (Martins, 1999). A queijaria tradicional mantém como suporte, quer propositadamente quer por limitações estruturais, diversos fatores de variabilidade. Aspetos tecnológicos tão específicos como a utilização de leite cru, bem como o agente coagulante, a temperatura de trabalho, o tipo de salga ou o grau de dessoramento, são fatores que influenciam as características e a qualidade do produto final.

A qualidade do queijo pode então ser entendida, genericamente, como a expressão dos pressupostos inerentes à matéria-prima e dos parâmetros que definem a tecnologia de fabrico (Figura 2).

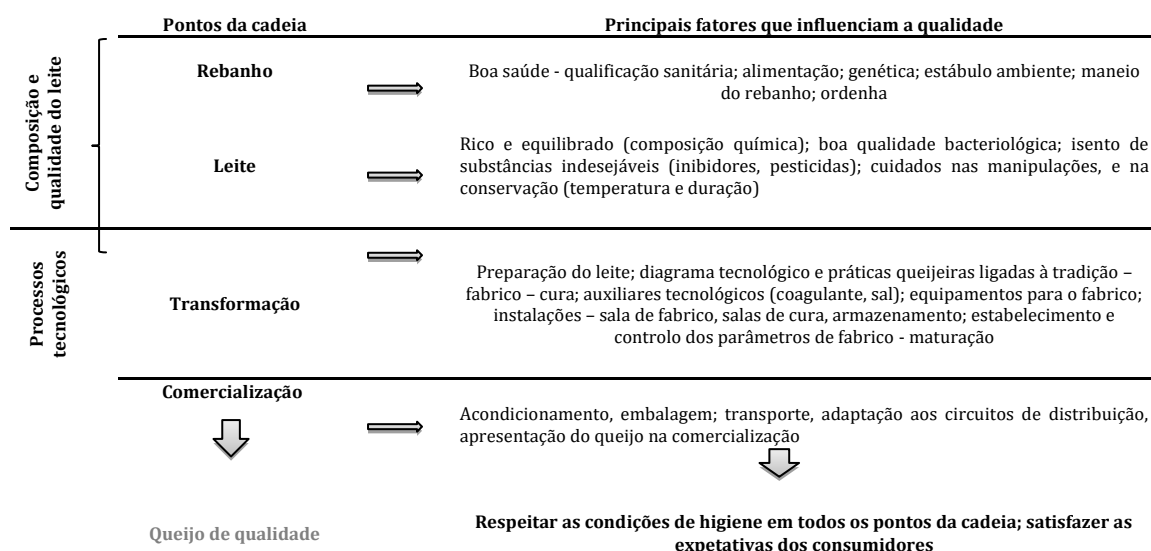


Figura 2 - Cadeia de qualidade do queijo tradicional.

Fonte: Adaptado de Martins (1999).

### 2.3.1. Matéria - prima

O leite, matéria-prima principal para o fabrico de queijo, irá condicionar fortemente todo o processo tecnológico, nomeadamente no que diz respeito ao rendimento e à qualidade do produto final obtido, devido não só à sua composição quantitativa e qualitativa, no que se refere à riqueza em componentes úteis para o fabrico do queijo, mas também devido à sua qualidade microbiológica (Baião, 2007; Serol, 2017). Segundo Martins e Vasconcelos (2003) para que o leite seja considerado de boa qualidade deve:

- Ser rico em componentes úteis para o fabrico, fatores do rendimento, como a gordura e, principalmente, proteína (caseína). Para que se possa retirar todo o partido dessa composição, o leite deve possuir um bom equilíbrio mineral relativamente à proteína (cálcio, fósforo), não podendo esquecer-se que para a coagulação enzimática é fundamental a presença de cálcio disponível para a agregação de toda a caseína;
- Deve estar isento de microrganismos patogénicos e de substâncias indesejáveis, como inibidores ou outros contaminantes de origem química, os quais podem afetar a atividade microbiana necessária à evolução e características do produto e, a curto ou longo, ter implicações na saúde do consumidor;

- Deve conter uma flora microbiana limitada, predominantemente útil. Aspeto decisivo para a qualidade do queijo, tornando-se o fator que mais contribui para o aparecimento de defeitos no produto final, quer por efeito direto, quer indiretamente afetando toda a evolução da transformação tecnológica.

De forma resumida podemos então afirmar que as características do leite com maior impacto tecnológico estão relacionadas com a sua composição e com a sua qualidade microbiológica.

Existem inúmeros fatores que independentes ou conjugados poderão influenciar positiva ou negativamente a composição e a qualidade do leite (Gomes *et al.*, 2016). De seguida, iremos abordar os diferentes fatores que podem influenciar a qualidade do leite, dando destaque aos que consideramos ser os mais importantes e que têm uma relação mais próxima com os aspetos quantitativos e qualitativos da produção.

Os fatores de variação da composição do leite, em geral estão relacionados com o animal (genética do animal, a alimentação, o indivíduo, a parição, a idade, o tipo de ordenha, o estado de lactação e o estado de saúde do animal) e com as condições de manejo da produção animal, até aos relacionados com a conservação e com a manipulação do leite (Barros, 2012; Rebelo, 1994).

Segundo Barros (2012), a genética é o fator mais determinante na variação da composição do leite. Influencia principalmente a quantidade produzida e a percentagem de gordura. Segundo Bencini e Pulina (1997), a raça Awassi pode produzir até 1000 L de leite em uma lactação, enquanto a raça Dorset produz apenas 100-150 L de leite por lactação. Por outro lado, a percentagem de gordura é inversamente proporcional. Segundo Bencini e Pulina (1997), existe uma correlação negativa entre a produção de leite e a sua composição do leite. Animais que produzem maior quantidade de leite, geralmente o leite produzido tem menor teor de gordura e proteína. Comparando, raças altamente produtoras de leite (ex. Assaf) com uma raça não especializada na produção do leite (ex. raça Merina, autóctone Portuguesa), o leite da raça merino é mais rico em conteúdos sólidos, principalmente gordura e proteína (Barros, 2012).

Apesar de a gordura ser o componente mais variável geneticamente também a proteína sofre algumas alterações. A gordura bruta apresenta maior variabilidade entre raças do que a proteína bruta e outros componentes do leite (Barros, 2012).

O teor em gordura para além de ser influenciado pela genética é também influenciado por fatores nutricionais e ambientais. Segundo Dewhurst *et al.* (2003) o teor em gordura nos leites varia mediante o tipo de nutrição animal.

A composição e a quantidade de gordura está dependente da alimentação dos animais, a qual está relacionada com a época do ano (alimentação mais rica em pasto ou rações (Barros, 2012).

A época de produção pode influenciar os níveis de produção e a composição química do leite. Estudos realizados por diversos autores como (Fagan *et al.*, 2010; Ozcan *et al.*, 2015) comprovam que o teor em gordura e proteína no Inverno é menor comparados com os valores obtidos na primavera e no verão. Fagan *et al.* (2010), verificou menor produção de leite no verão. Concluiu também que a menor percentagem de gordura do leite, no outono e inverno pode ter sido influenciado pela maior produtividade de leite e pela qualidade da dieta nestas estações.

Os resultados sugerem que a qualidade do leite ovino é fortemente afetado pelos efeitos combinados de mudanças sazonais no clima e disponibilidade de erva e variações no estado metabólico das ovelhas com o avanço da lactação. De acordo com o estudo realizado por Novotná *et al.* (2009), a maioria dos componentes do leite (sólidos totais, gordura, proteína, caseína e lactose), demonstraram diferenças significativas entre diferentes estágios de lactação. De acordo com o mesmo estudo, o teor destes aumentou no final da lactação como resultado da diminuição da produção de leite.

A saúde e o bem-estar animal é outro dos fatores que influenciam a qualidade do leite. De acordo com Barros (2012) quando o animal está doente ou sofreu algum tipo de stress, a síntese de proteína, gordura e lactose, ao nível da glândula mamária, é perturbada e ocorrem modificações na composição do leite. É fundamental que o estado sanitário do úbere esteja em condições, de forma a prevenir infeções. O leite de glândulas infetadas tem uma concentração significativamente menor de lactose, que é acompanhada por concentrações significativamente mais altas de soro de leite e albumina. O acúmulo de proteínas de soro de leite provavelmente resulta de uma quebra das caseínas e outras proteínas do leite, que regulam a secreção do leite, o que explica a menor concentração de lactose (Leitner *et al.*, 2004). Elevada contagem de células somáticas pode ser indicativo da presença de mastites, resultando em mudanças na composição de leite com uma redução na gordura, caseína, e sólidos totais e um aumento no azoto total, azoto não proteico e proteínas do soro do leite (Gomes, 2012). Por outro lado, o leite proveniente de animais com mastites apresenta alterações microbiológicas que podem interferir negativamente nos processos tecnológicos.

Para além do estado de saúde da glândula mamária, a higiene animal, o ambiente e os procedimentos utilizados na limpeza e desinfeção dos equipamentos de ordenha (a higiene mantida no processo da sua obtenção, ao estado das instalações de ordenha, à qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, aos utensílios não perfeitamente higienizados), armazenamento e transporte do leite são essenciais para controlar o nível de contaminação microbiana do leite cru (Furtado, 2016; Ramos, 2009; Leiria *et al.*, 2018; Sevi *et al.*, 2004).

O conteúdo microbiano do leite cru diz muito acerca da sua qualidade, conforme já tínhamos referido anteriormente, o grau de contaminação está intimamente relacionado com o binómio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até ao seu processamento ou transformação (Ramos, 2009). O tempo e a maneira como o leite está armazenado é fundamental para a não proliferação da população bacteriana, que em pouco tempo pode levar à deterioração do leite (Dias, 2016).

A temperatura é o fator fundamental de todo o crescimento bacteriano. Este fato pode ser comprovado através da análise da Tabela 4 que relaciona a contagem microbiana ao fim de 24 horas de ordenha de várias amostras de um mesmo leite com a mesma contagem microbiana inicial de  $2,3 \times 10^3$  UFC/mL, conservadas durante 24 horas, a diferentes temperaturas assim como o tempo de conservação de cada amostra de leite.

**Tabela 4-** Exemplo do efeito temperatura sobre um leite com uma contagem inicial de  $2,3 \times 10^3$  UFC/mL.

Temp. de Conservação do Leite (°C)	UFC/ml 24 Horas após a ordenha	Tempo de conservação do leite (h)
4	$2,5 \times 10^3$	<75
10	$1,2 \times 10^4$	30
16	$1,8 \times 10^5$	19
20	$4,5 \times 10^6$	11
30	$1,4 \times 10^9$	5

Fonte: Dias (2016).

Através da análise da tabela 4 podemos concluir que quanto menor for a temperatura de conservação a que o leite é mantido, menor é a carga microbiana e maior é o seu tempo de conservação.

Dias (2016), ao comparar duas amostras de um leite com carga microbiana baixa ( $1,0 \times 10^3$  UFC/mL) a duas temperaturas diferentes (4°C e 15°C), verificou que ao fim de 24h os leites possuíam cargas microbianas distintas. A amostra mantida a 15°C já não se encontrava apta para consumo, no

entanto a 4°C ainda estava em boas condições, mantendo uma contagem semelhante à contagem inicial. Ao fim de 72 horas a diferença entre as contagens iniciais e finais das duas amostras do leite foram ainda mais significativas, sendo de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL para as amostras mantidas a 4°C e 15°C, respetivamente. Considerou ainda duas amostras de outro leite com carga inicial elevada  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL, mantidas também a duas temperaturas de conservação diferentes, verificando que a amostra mantida a 15°C em cerca de 5 horas atingiu valores de carga microbiana que indicava alteração do leite, enquanto que o leite mantido a temperatura de 4°C só atinge esses valores ao fim de 24 horas.

Podemos então concluir que contagens iniciais baixas aliadas a baixas temperaturas de conservação são fundamentais para a manutenção de leites com baixos valores de contagens microbianas. No entanto é importante referir que uma contagem baixa terá sempre um maior tempo de conservação independentemente da temperatura a que for mantido, comparativamente com um leite que tenha elevada carga microbiana.

De acordo com o Regulamento n.º 853/2004, o leite deve ser mantido num local limpo concebido e equipado de modo a evitar qualquer tipo de contaminação. O leite deve ser arrefecido imediatamente não excedendo os 8°C, para o caso de a recolha ser feita diariamente, e os 6°C caso a recolha não seja feita diariamente. A cadeia de frio deve ser mantida durante o transporte e à chegada ao estabelecimento de destino, a temperatura do leite não deve ser superior a 10°C. Considera ainda que os operadores das empresas devem assegurar que, logo após a sua admissão num estabelecimento de transformação, o leite seja rapidamente arrefecido a uma temperatura não superior a 6°C e mantido a essa temperatura até ser transformado, a não ser que a transformação tenha início imediatamente após a ordenha ou nas 4 horas seguintes à admissão no estabelecimento de transformação, ou se a autoridade competente autorize uma temperatura mais elevada por razões de ordem tecnológica ligadas ao fabrico de determinados produtos lácteos.

A temperatura de recolha e duração de armazenamento do leite são igualmente importantes, para que os microrganismos não se multipliquem. A refrigeração prolongada ou em condições deficientes podem tornar-se uma fonte potencial de problemas para o fabrico do queijo, pois é suscetível de alterar completamente o equilíbrio da flora microbiana do leite, favorecendo o desenvolvimento dos psicrotóxicos, agentes de graves problemas na evolução e na qualidade do queijo (Martins e Vasconcelos, 2003).

Os reflexos mais frequentes das deficiências da matéria-prima são, em geral, detetados a nível da evolução do produto, normalmente durante o processo de cura, ou no final da mesma, mas podem ser identificados logo durante o fabrico. Os reflexos da deficiente qualidade do leite, nos seus múltiplos aspetos, a nível da qualidade do queijo são inúmeros, podendo referir-se aos riscos para a saúde pública, pela presença de microrganismos patogénicos, e as dificuldades em cumprir os requisitos para o produto, mesmo os mais simples, como os teores em matéria gorda e em humidade ou o coeficiente de maturação, as dificuldades na maturação do queijo, com o difícil controlo da cura e o aumento da necessidade de intervenção da mão-de-obra, a instabilidade do produto na conservação e na comercialização, e os inúmeros defeitos do queijo, defeitos exteriores (colorações estranhas, crosta rugosa, deformações), de pasta e textura (olhos, centros duros, pasta líquida, pasta não ligada, textura não homogénea), de sabor e de aroma (insípido, amargo, azedo, acre, pútrido) (Martins, 2001).

Compreende-se assim que, nos queijos fabricados a partir de leite cru, a qualidade da matéria-prima seja considerada o fator mais importante, exercendo influência, direta ou indiretamente, em todas as fases de fabrico, desde o fabrico à conservação e comercialização.

De seguida iremos abordar os diferentes fatores que podem influenciar a qualidade do queijo, na dependência das principais etapas tecnológicas que determinam as suas respetivas características.



### 2.3.2. Coagulação

Nesta etapa procede-se à coagulação da caseína do leite, obtendo-se um gel sólido vulgarmente designado por coalhada (Figueiredo *et al.*, 2001). A coagulação é o fenómeno fundamental do fabrico de queijo (Martins e Vasconcelos, 2003; Lauzin *et al.*, 2019). Os coagulantes normalmente utilizados são complexos enzimáticos de origem animal, o comum "coalho" ou de origem vegetal, o conhecido "cardo", muito ligado ao queijo de leite de ovelha, considerado um dos fatores responsáveis pela tipicidade de alguns queijos tradicionais (Martins e Vasconcelos, 2003). O tipo de leite e o tipo de coagulante são fatores determinantes no processo de coagulação. É ao nível dos teores de caseína e cálcio e das características específicas das caseínas que podemos encontrar a grande diferença entre queijos de ovelha e de cabra. O teor em caseínas e de cálcio bem como as características das caseínas são responsáveis pela eficácia da transformação, mas também pelas características da coalhada e do futuro queijo. Estes influenciam não só as propriedades do queijo, mas também o comportamento do leite durante a coagulação e as características do gel, que condicionam o tipo de trabalho que a coalhada pode sofrer (Martins e Vasconcelos, 2003). Outro fator importante é o tipo de coagulante. A sua ação não se resume à fase enzimática da coagulação, mas exerce-se até ao final da mesma e, posteriormente, a nível da maturação do queijo, por intermédio da fração residual que permanece no produto. O tipo de coagulante é caracterizado pela relação C/P (atividade específica de coagulação/atividade proteolítica não específica) (Martins e Vasconcelos, 2003).

A etapa de coagulação do leite no fabrico de queijo termina com o corte da coalhada, onde o tempo do corte afeta o rendimento final e a qualidade do queijo (Lyndgaard *et al.*, 2012). O tipo e tempo de corte conduz a diferentes tipos de queijo, já que quanto maior a duração e quanto mais pequenos forem os fragmentos da coalhada maior o dessoramento e menor a humidade do queijo resultante (Ferreira, 2017). Segundo Lyndgaard *et al.* (2012) cortar com firmeza muito baixa (cortar muito cedo) resulta na perda de rendimento e cortar com firmeza muito alta (corte tardio) resulta em queijo com alta humidade e propriedades indesejáveis. A etapa do corte da coalhada tendo como objetivo romper o gel formado, aumentando a área de libertação do soro e, portanto, acelerar a sinérese (saída do soro). Esta etapa consiste assim, em extrair o soro que está no interior da coalhada, através do seu corte, com o mínimo de perdas de proteína e gordura (Ferreira, 2017; Ponciano, 2010). O tempo de corte depende do tipo de queijo que está a ser processado. O corte deve ser iniciado com uma firmeza de coalhada consistente, otimizada para o tipo de queijo (Arango e Castillo, 2018). Para realizar este corte é utilizado um equipamento específico, as liras, as quais deverão estar devidamente higienizadas e isentas de qualquer tipo de ferrugem ou outra característica que contamine a coalhada (Ferreira, 2017).

### 2.3.3. Dessoramento

O dessoramento pressupõe a aceleração, embora controlada, da expulsão da água e substâncias dissolvidas, do soro para que se obtenha um produto moldável, mas que mantenha a forma que se pretende e que apresente condições mínimas de conservação, permitindo a evolução controlada durante a maturação (Martins e Vasconcelos, 2003). A quantidade de soro libertado e a facilidade dessa libertação dependem das características do gel e variam consoante o tipo de queijo que se pretende obter (Bandeira, 2010). A expulsão do soro (sinérese) é influenciada por vários fatores como pH, temperatura, tamanho do grão de coalhada, presença de iões cálcio, composição do leite (teor em gordura e proteína) e firmeza da coalhada (Paula *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2009). A sinérese é promovida pelos seguintes fatores: menor espessura do corte, pH baixo, presença de iões cálcio, aumento da temperatura, agitação da coalhada, maior teor de proteínas e menor teor de gordura. De acordo com Paula *et al.* (2009), o queijeiro pode facilmente controlar o conteúdo de humidade da massa do queijo e também o grau e a extensão da maturação e da estabilidade do queijo através do controlo da sinérese. Quanto maior a humidade do queijo, mais rápida será a sua maturação, porém,

menor será a sua estabilidade. A taxa e a extensão da sinérese são importantes na determinação da composição, rendimento e atributos da qualidade do queijo, exercendo influência sobre o teor de água, a acidificação, a proteólise e a estrutura do queijo final (Geng *et al.*, 2011).

Para o dessoramento, usam-se diversos processos, sobretudo meios mecânicos e agentes físicos, que facilitam a saída do soro, como o corte, divisão controlada do gel de modo a aumentar a superfície de expulsão do soro, a temperatura, a agitação da coalhada e a prensagem (Martins e Vasconcelos, 2003).

#### **2.3.4. Moldagem e prensagem**

Segue-se a moldagem, em que a massa é colocada em cinchos ou formas, que dão a forma e o tamanho final do queijo (Martins e Vasconcelos, 2003; Ponciano, 2010). A moldagem pode ser feita de várias formas, sendo que a coalhada pode ser transferida diretamente para os moldes ou sujeita a uma prensagem antes do queijo ser moldado (Figueiredo *et al.*, 2001). Esta etapa tem como objetivo expulsar o resto do soro, para melhorar a textura e dar a forma ao queijo. A velocidade de prensagem deve ser gradual e aplicada a cada tipo de queijo, de forma a não provocar a presença de bolsas de humidade (Figueiredo *et al.*, 2001).

#### **2.3.5. Salga**

A salga é uma etapa importante no processo de fabrico de queijos, pois determina as propriedades físico-químicas do produto final (Sezer *et al.*, 2019). Destina-se a evitar que o queijo se deteriore (através do seu efeito osmótico removendo a humidade) e atuando como conservante (Sezer *et al.*, 2019). Além disso, tem também uma grande influência nas transformações que decorrem na formação do queijo. A formação da crosta, inibição de crescimento de microrganismos, maturação, textura, concentração de água, aroma e sabor são influenciados pela presença ou ausência de sal (Dias *et al.*, 2008; Santapaola *et al.*, 2013). É um importante fator que contribui para a segurança alimentar e para a supressão de bactérias indesejadas, que danificam as qualidades organolépticas do queijo (Dias *et al.*, 2008). No entanto, a salga exagerada prejudica a fermentação láctica, fazendo com que a maturação dos queijos nunca seja perfeita, com caseína por desdobrar, originando queijos quebradiços e pouco plásticos (Dias *et al.*, 2008).

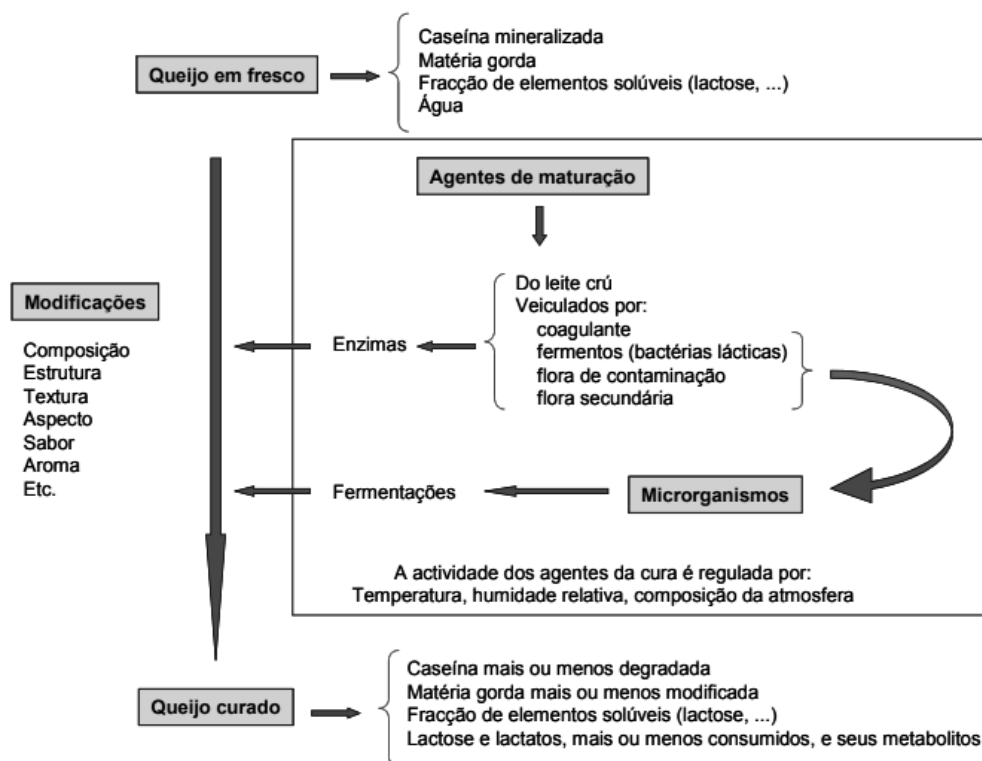
A salga tem uma vasta influência na etapa final do fabrico da maturação, uma vez que, se não for bem conduzida, pode afetar seriamente a atividade microbiológica e enzimática de um queijo e ser a causa de diversos defeitos em queijos.

Existem vários métodos de salga, tais como a aplicação direta na massa, aplicação direta no queijo, colocação do queijo em salmoura ou uma mistura dos dois últimos métodos (AESBUC, 2003; Sá e Barbosa, 1990; Paula *et al.*, 2009).

#### **2.3.6. Cura / Maturação**

A maturação é a “fase de cura” do queijo, em que as características finais do queijo se desenvolvem, pela transformação da coalhada prensada. Nesta fase, é demonstrado como as condições aplicadas nas etapas anteriores são importantes, já que influenciam o modo como os agentes de transformação (microrganismos, enzimas) atuam sobre o substrato (lactose, caseína coagulada, matéria gorda) dependendo das condições de ambiente aplicadas (temperatura, humidade relativa, a velocidade de circulação de ar, para além de outras que, pontualmente, se podem tornar importantes, como a composição do ar presente nas chamadas câmaras de cura (Ferreira, 2017; Martins e

Vasconcelos, 2003). Na figura 3 estão representados o conjunto dos elementos intervenientes na maturação do queijo.



**Figura 3** - Esquema representando o conjunto dos elementos intervenientes na maturação do queijo. **Fonte:** Martins e Vasconcelos (2003).

Embora a qualidade dos queijos acabados seja determinada pelas etapas de processamento anteriores, é durante a maturação que as características de textura e sabor se desenvolvem, sendo dependentes do tipo de microrganismos presentes (Reis e Malcata, 2011).

Esta é uma etapa lenta, onde se desenvolve uma intensa atividade microbiana, alterações bioquímicas, físicas e químicas tais como a fermentação da lactose, a hidrólise das proteínas e gorduras e a síntese de compostos aromáticos. Estes fenómenos complexos afetam todos os compostos solúveis e insolúveis da matriz, resultantes da ação das enzimas do agente coagulante, das enzimas dos microrganismos, e, com menor importância, das enzimas nativas do leite (Ganchinho, 2020). A microbiota do queijo é, portanto, um dos fatores mais importantes na maturação do queijo e na formação do seu sabor. O desenvolvimento do sabor do queijo é um processo bioquímico dinâmico e complexo, no qual as condições ambientais, incluindo tempo de maturação e temperatura, afetam a composição microbiana e a atividade metabólica (Duru *et al.*, 2018). As principais alterações bioquímicas envolvem a proteólise, a glicólise e a lipólise. No entanto, podem ocorrer outras reações como o catabolismo de compostos produzidos nas reações principais, que incluem a desaminação, a descarboxilação e a desfosforilação de aminoácidos ou, ainda, reações de esterificação (Fox *et al.*, 2000; Moreira, 2011). A produção de produtos primários e secundários é responsável pelo sabor e textura característicos do queijo (Kheadr *et al.*, 2003).

A degradação da proteína (proteólise) modifica, principalmente, a textura e o sabor. Por outro lado, a hidrólise das gorduras (lipólise) liberta ácidos gordos livres, intensificando o aroma. Já a

fermentação da lactose (glicólise), modifica o pH (acidez) influenciando o sabor, mas também a flora microbiana (Ganchinho, 2020).

Segundo Martins e Vasconcelos (2003), os problemas mais comuns da maturação no caso dos queijos tradicionais derivam da falta de controlo e de adequação das condições de maturação e das características muitas vezes deficientes do queijo em fresco, acrescentando ainda, a contaminação, por vezes intensa, das câmaras de cura e o deficiente tratamento do queijo em cura devido a exigirem muita mão-de-obra durante a condução da maturação, com cuidados necessários que, por via dos crescentes volumes de laboração, se tornam quase inviáveis ou incompatíveis em termos de custos.

A descrição anterior, embora muito resumida mostra como o processo de maturação está dependente da microbiota, da qualidade do leite, das etapas de processamento e das condições de armazenamento. De modo geral, podemos então concluir que as tecnologias de fabrico dos queijos tradicionais assentam em equilíbrios muito frágeis entre atributos da matéria-prima e as condições de fabrico, que além de atribuírem variadíssimos fatores de variedade e de tipicidade dos queijos, também conferem ao produto escassas possibilidades de defesa face à presença de agentes prejudiciais ao produto final.

A diversidade de práticas tradicionais em cada uma das muitas etapas de produção de leite à maturação do queijo, muitas das quais são específicas para um determinado tipo de queijo, resulta em uma ampla variedade de microbiota e ambientes que afetam as atividades dos microrganismos (Montel *et al.*, 2014).

## 2.4. Microbiologia dos queijos tradicionais

### 2.4.1. Microbiota do leite cru

O leite é uma fonte rica em nutrientes, por isso constitui um meio favorável à multiplicação de microrganismos patogénicos e de deterioração. Estes estão na origem de alterações organoléticas e físico-químicas, que poderão ter implicações na qualidade e segurança dos produtos lácteos obtidos a partir dele.

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 microbiota existente (Bettencourt *et al.*, 2008; Montel *et al.*, 2014).

Quando ainda presente no úbere de uma fêmea saudável, o leite encontra-se esterilizado, sendo a ordenha e manipulações consequentes que levam à presença de microrganismos, provenientes do contacto com o animal e equipamento de ordenha. Estes microrganismos podem facilitar a fermentação láctica (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*), causar deterioração (*Pseudomonas*, *Clostridium* e *Bacillus*), promover a saúde (lactobacilos e bifidobactérias) ou causar doenças (*Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter*) (Quigley *et al.*, 2013).

A higiene no momento da ordenha, o controlo das mastites, 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, sendo a aplicação de boas práticas de higiene um ponto-chave para garantir a sua qualidade e segurança (Martins, 2001; Quigley *et al.*, 2013). Na Tabela 5 podem ser consultadas diversas fontes microbianas diretas e indiretas e os tipos de microrganismos que podem ser encontrados.

Tabela 5- Fontes de contaminação e tipos de microrganismos que podem ser encontrados.

	Fontes	Microrganismos	Referências
Diretas	Canal do teto	<i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> ( <i>Clostridiaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Proteobacteria</i> );	Gil <i>et al.</i> (2006)
	Superfície do teto	Estafilococos coagulase negativos e bactérias coliformes, <i>Enterobacteriaceae</i> , bactérias deteriorantes (esporos de ácido butírico, Bactérias Lácticas ( <i>Lactococcus lactis</i> , e bactérias Gram-negativas não fermentadoras, <i>Pseudomonas</i> ).	Desmaures (1995) Marchad <i>et al.</i> (2012) Baroiller e Schmidt, (1990) Reboux <i>et al.</i> (2006);
Indiretas	Equipamentos, e utensílios de ordenha	BAL, <i>Staphylococcus sp.</i> e bactérias coliformes ( <i>Micrococcus sp.</i> ), bactérias Gram-negativas ( <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Hafnia alvei</i> ) e leveduras.	Desmaures, (1995) Gelsomino <i>et al.</i> (2002) Kagkli <i>et al.</i> (2007) Laithier <i>et al.</i> (2005) Michel <i>et al.</i> (2001)
	Alimento (Pastagem, silagem, feno e ração)	BAL, Bactérias Gram-negativas ( <i>Enterobacteriaceae</i> , estafilococos, bactérias coliformes, leveduras e fungos ( <i>Eurotium sp.</i> , mesófilos e termófilos <i>Actinomycetaceae</i> ), e Gram-positivos ( <i>Curtobacterium sp.</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Paenibacillus sp.</i> ) e bastonetes Gram-negativos ( <i>Pantoea</i> e <i>Pseudomonas sp.</i> )	Vacheyrou <i>et al.</i> (2011)
	Bebedouros	Leveduras, <i>Pseudomonas</i> , bactérias coliformes	Baroiller e Schmidt (1990) Desmaures (1995) Gelsomino <i>et al.</i> (2002)
	Sala de ordenha, estábulo	<i>Microbacteriaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> e bolores ( <i>Eurotium sp.</i> e <i>Aspergillus sp.</i> , BAL e bactérias Gram-negativas	Vacheyrou <i>et al.</i> (2011)
	Fezes	BAL ( <i>Aerococcus viridans</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus mucosae</i> , <i>Laactobacillus brevis</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> ) <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , leveduras ( <i>Candida lambica</i> e <i>Saccharomyces exiguous</i> )	Rasmussen <i>et al.</i> (1991) Baroiller e Schmidt (1990) Desmaures (1995) Gelsomino <i>et al.</i> (2002) Kagkli <i>et al.</i> (2007) Beerens <i>et al.</i> (2000)

Fonte: Adaptado de Montel *et al.* (2014).

Para garantir a segurança e a qualidade do leite, é imprescindível o controlo de todas as etapas desde a sua obtenção até à sua transformação. Na pendência da fixação de normas no âmbito de legislação mais específica sobre a qualidade do leite, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1662/2006 da Comissão de 6 de novembro de 2006 que altera o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, são aplicáveis os critérios seguintes para o leite cru:

- Deve ser controlado um número representativo de amostras de leite cru em explorações de produção de leite por amostragem aleatória para verificar a sua conformidade;

- 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 < 5,70 Log UFC/mL (média geométrica constatada ao longo de um período de dois meses, com, pelo menos, duas colheitas mensais), sem referência à contagem de células somáticas, ao contrário do expresso para o leite de vaca.

Esta média geométrica tem em consideração possíveis variações, representando um indicador mais robusto e minimizando a interferência de valores (D'Amico e Donnelly, 2010). Na literatura consultada, para avaliação da qualidade microbiológica do leite cru, para além da contagem de mesófilos, são também utilizados outros parâmetros (indicadores de qualidade), como bactérias lácticas, microrganismos psicrotóxicos, *Pseudomonas spp.*, bactérias coliformes, *E. coli*, leveduras e bolores (Tabela 6). A qualidade microbiológica de leite cru fornece informações quer sobre as

condições sanitárias do produto, quer sobre a sua qualidade higiénica. Diversos autores, referem que contagens de bactérias coliformes superiores a 2 log UFC/mL são indicadoras de práticas de higiene inadequadas (D'Amico *et al.*, 2008; D'Amico e Donnelly, 2010; Sanjuan *et al.*, 2003). Sanjuan *et al.* (2003) concluiu que o valor médio das contagens de coliformes de 2,3 Log UFC/mL indicava contaminação moderada do leite durante a ordenha, propondo a melhoria das condições de higiene, especialmente limpeza dos úberes e controlo de mastites.

**Tabela 6-** Contagens de diferentes microrganismos em amostras de leite cru.

Parâmetros microbiológicos	Tipo de leite	Contagens Log UFC/ml	n	Referência bibliográfica
Média geométrica de mesófilos	Cabra	3,4	49	D'Amico <i>et al.</i> (2008)
		3,1	5	D'Amico e Donnelly (2010)
	Ovelha	3,4	22	D'Amico <i>et al.</i> (2008)
		3,3	4	D'Amico e Donnelly (2010)
Mesófilos	Cabra	5,4	67	D'Amico <i>et al.</i> (2008)
	Ovelha	4,2	5	D'Amico e Donnelly (2010)
Bactérias lácticas	Cabra	5,4-6,1	22	Picon <i>et al.</i> (2016)
Psicrotróficos	Cabra	4,1	61	Yamazi <i>et al.</i> (2013)
	Ovelha	2,7-4,7	240	Fotou <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas</i>	Cabra e ovelha	2,0-4,7	-	Montel <i>et al.</i> (2014)
	Ovelha	4,1	16	Sanjuan <i>et al.</i> (2003)
Bactérias coliformes	Cabra	3,3	5	D'Amico <i>et al.</i> (2008)
		2,3	49	D'Amico e Donnelly (2010)
	Ovelha	2,3	16	Sanjuan <i>et al.</i> (2003)
<i>Escherichia coli</i>	Cabra	1,7-2,8	61	Yamazi <i>et al.</i> (2013)
	Ovelha	0,45	16	Sanjuan <i>et al.</i> (2003)
Leveduras	Cabra	2,4	60	Foschino <i>et al.</i> (2002)
	Cabra e ovelha	1-4	-	Montel <i>et al.</i> (2014)
Bolores	Cabra	2,1	60	Foschino <i>et al.</i> (2002)

A flora dominante do leite convenientemente manipulado e armazenado é constituída essencialmente por microrganismos Gram-positivos, entre eles as bactérias lácticas, os micrococcos, os estafilococos e os estreptococos. Estão presentes também bactérias Gram-negativas, nomeadamente enterobactérias e coliformes, alguns psicrotróficos quer Gram-positivos (*Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) quer Gram-negativos (*Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp.) e, também um pequeno número de leveduras e bolores (Lafarge *et al.*, 2004). As bactérias lácticas, grupo que fermenta lactose em ácido láctico, constituem a população dominante no leite cru, sendo as mais comuns *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Quigley *et al.*, 2013; Kongo e Malcata, 2016). Outro grupo de microrganismos com uma presença marcada no leite cru são os psicrotróficos. As práticas de refrigeração do leite cru antes do fabrico do queijo, especialmente quando este não é processado diretamente no local de produção são propícias para a proliferação das bactérias psicrotróficas. Estas estão naturalmente presentes no leite, mas durante a refrigeração podem atingir níveis superiores a 10<sup>5</sup> 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 atividade 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). Fotou *et al.* (2011) ao quantificar microrganismos psicrotróficos, (2,7 e 4,7 Log UFC/mL), concluiu que é importante arrefecer rapidamente o leite cru e armazená-lo não mais do que o tempo

necessário, para garantir contagens que não influenciem a qualidade do leite e conseqüentemente a do queijo.

Segundo Bore e Langsrud (2005), as bactérias mais comuns de provocar problemas na indústria dos produtos lácteos são *Streptococcus agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, bactérias coliformes, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium pyogenes*. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 e *Campylobacter jejuni* são agentes patogênicos presentes no leite cru e produtos lácteos que causam uma maior preocupação.

Apesar da introdução de práticas de refrigeração, limpeza e desinfecção de equipamentos e tetos do animal, terem contribuído bastante para a melhoria da qualidade microbiológica do leite nos últimos anos, o leite exibe normalmente uma diversidade microbiana substancial. Mais de 100 gêneros e de 400 espécies foram identificadas entre a microbiota 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 que já eram conhecidas. Foram por exemplo identificadas bactérias Gram-positivas alcalófilas e halófilas. Uma única amostra de leite pode conter 36 espécies microbianas dominantes (Montel *et al.*, 2014). Além da diversidade microbiana, a diversidade entre estirpes também é substancial, podendo variar entre espécies e entre 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).

Muitos destes microrganismos têm um efeito benéfico como é o caso das bactérias lácticas e de algumas leveduras, 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 (bactérias e fungos) responsáveis por defeitos físicos e sabores estranhos do queijo. Um exemplo desta situação são os psicrotróficos que, ao produzirem lípases e proteases extracelulares, podem criar alterações no leite e conseqüentemente no queijo (Quigley *et al.*, 2013), a sua presença (cerca de  $10^6$  UFC/mL), diminui o rendimento e a qualidade da coalhada (Ladenbach *et al.*, 2009).

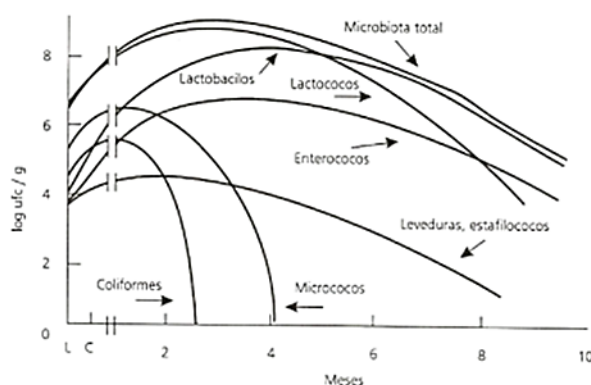
#### 2.4.2. Microbiota dos queijos feitos com leite cru

O queijo resulta da ação metabólica dos microrganismos já presentes ou adicionados ao leite, conforme já referimos anteriormente. Existem vários fatores que podem influenciar a qualidade e a diversidade microbiana. Durante a maturação reações bioquímicas (proteólise, lipólise e glicólise) associadas ao sabor e textura particulares de cada variedade de queijo, são realizadas por enzimas produzidas por microrganismos vivos ou libertadas na matriz do queijo após lise celular microbiana. A tipicidade do queijo advém da biodiversidade das espécies envolvidas em todo o processo de produção, logo a microbiota dos queijos típicos depende da microbiota dos leites que lhe dão origem. Esta biodiversidade permite a produção de queijos típicos com qualidades organolépticas superiores a queijos produzidos com leite pasteurizado (Kongo e Malcata, 2016; Gamboa *et al.*, 2018).

Quando um queijo é fabricado com leite cru, os microrganismos presentes neste passarão à coalhada. O tipo de leite usado é um dos fatores mais importantes na maturação do queijo devido à presença de diferentes microrganismos. Da grande diversidade dos microrganismos que existem no leite, alguns multiplicam-se rapidamente desde o início do processo de transformação, tais como os lactococos, enquanto outros apenas se expressam em etapas mais avançadas da maturação, nomeadamente, os lactobacilos e outros microrganismos secundários. Existem também microrganismos que têm o seu desenvolvimento inibido devido à presença de condições desfavoráveis,

e mesmo outros que acabam por desaparecer durante o período de maturação (Fernandes, 2017; Montel *et al.*, 2014).

Durante a cura os microrganismos dominantes, são bactérias ácido lácticas. Estas bactérias são as principais responsáveis pelo desenvolvimento dos aromas ao longo da cura e, enquanto estas crescem, outros grupos como as leveduras, enterobactérias e estafilococos diminuem drasticamente para valores residuais. No final da cura, estas bactérias lácticas predominam e controlam a proliferação de microrganismos indesejáveis (Batista, 2017). O que foi descrito encontra-se representado na Figura 4.



**Figura 4** - Ocorrência de alterações no microbioma ao longo do tempo num queijo fabricado com leite cru; L-leite; C-coalhada. **Fonte:** Ordóñez *et al.* (2005).

De acordo com Montel *et al.* (2014), a sobrevivência e o desenvolvimento de alguns microrganismos depende 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; Gamboa *et al.*, 2018).

No interior do queijo as espécies dominantes variam consoante o tempo de maturação e a variedade de queijo (mole, semi-duro, duro), a composição físico-química e a estrutura da pasta varia muito entre este tipo de queijos, como se pode verificar pelo teor de humidade (42%-55%). Além disso também podem variar conforme o tipo de coalho usado, dentro da mesma variedade ou para queijos feitos com o mesmo leite (Montel *et al.*, 2014). No entanto, as bactérias lácticas são normalmente o grupo microbiano dominante, geralmente atingindo contagens acima de 9 Log UFC/g no primeiro dia de produção e permanecendo dominantes até ao final da cura, apesar das variações 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). A sua predominância na microbiota natural do queijo é atribuída aos seus numerosos sistemas enzimáticos, que lhes permitem utilizar os nutrientes do leite eficientemente. Além disso são tolerantes a valores seletivos de pH (<4.9), sal (6 % NaCl/ H<sub>2</sub>O), humidade (50 %) e uma ampla faixa de condições de temperatura (2 °C-53 °C) (Montel *et al.*, 2014).

Ao contrário do interior, a superfície do queijo exhibe uma alta diversidade microbiana. Leveduras, bolores e bactérias aeróbias como *Corynebacteriaceae* e *Micrococcaceae* encontram-se mais facilmente na superfície do queijo, onde o oxigénio está mais disponível. No caso das leveduras, as principais



espécies encontradas são: *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Firmicutes (bactérias lácticas e estafilococos), Actinobacteria e Proteobacteria, são as populações bacterianas codominantes, no entanto a sua proporção varia com o tipo de queijo (Montel *et al.*, 2014).

Segundo o mesmo autor, algumas espécies parecem ser específicas de determinadas variedades de queijos. Dando o exemplo *Mycetocola reblochoni* sp. em Reblochon e *Leucobacter* sp. na superfície de queijos Saint-Nectaire. Muitos microrganismos estão associados a estágios de maturação específicos, como por exemplo as leveduras (*Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis*, que estão presentes principalmente no estágio inicial de maturação, enquanto *Geotrichum candidum*, quando presente, está presente durante toda a maturação e no caso de *Yarrowia lipolytica* é detetada principalmente em queijos maturados). Bolores do género *Penicillium* foi considerado dominante na superfície do queijo Taleggio DOP. Além deste também se detetou *Cladosporium* sp. e *Aureobasidium pullulans*.

As interações levedura-levedura e levedura-bactéria condicionam o estabelecimento do ecossistema da superfície do queijo. Leveduras e bolores, quando presentes, metabolizam o ácido láctico e produzem amoníaco (NH<sub>3</sub>), aumentando assim o pH da superfície de (4,8 – 5,2 para 6 – 8,2), permitindo o crescimento de bactérias tolerantes ao sal e sensíveis ao ácido.

A fase de processamento do queijo é determinante para a sua microbiota. A acidificação que decorre durante a cura/maturação é o principal factor condicionante do desenvolvimento dos microrganismos, pois pode limitar, entre outros, o desenvolvimento de fungos (Barreira, 2008). Os fungos (leveduras e bolores), embora com crescimento mais lento que as bactérias lácticas, são também importantes, especialmente nesta fase (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, que tendem a ser específicos para cada tipo de queijo (Pereira *et al.*, 2000; Beresford *et al.*, 2001; Montel *et al.*, 2014), e pelas mesmas razões podem também contribuir para a deterioração do queijo (Pereira *et al.*, 2000).

Podemos então dividir a microbiota do queijo em dois grupos: microbiota ácido láctica (*starter*) e secundária. A *starter* é promotora da acidificação do queijo e contribui para a cura, enquanto que a secundária não contribui para a acidificação do queijo mas é essencial para o processo de cura. Independentemente de serem *starter* ou secundária, estes microrganismos inserem-se nos seguintes grupos: *Enterobacteriaceae*, estafilococos e fungos, bem como bactérias lácticas como *Lactobacillus* e *Lactococcus* e *Enterococcus* (Barreira, 2008).

A microbiota *starter* pode ser definida como um conjunto de microrganismos com capacidade de redução do pH do leite a <5,3 em 6 h a 30-37 °C (Barreira, 2008). Geralmente é composta por bactérias lácticas cujos géneros dominantes são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Entre estes as espécies mais frequentes são *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Montel *et al.*, 2014). Devido à temperatura a que se dá a coagulação do leite para a produção do queijo (27 °C – 36 °C), a maioria das bactérias lácticas presentes no queijo são mesófilas (Farkye, 2014; Kongo e Malcata, 2016), ou termófilas. Estas últimas associadas a métodos de fabrico que recorrem a temperaturas de 50-55°C (Barreira, 2008). Estas têm como principal função a produção de ácido durante a fermentação da lactose (essencial à formação da coalhada com a consequente diminuição do pH e inibição de microrganismos indesejáveis). Além disso ajudam no processo de cura devido à sua ação proteolítica e ainda ajudam no desenvolvimento dos aromas específicos por utilização dos aminoácidos (Beresford *et al.*, 2001; Montel *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013; Farkye, 2014; Dahl *et al.*, 2000). Além das bactérias lácticas existem ainda bactérias ácido propiônicas que metabolizam o lactato em propionato, cujo metabolismo é parte determinante das características organolépticas do produto final. Conhecem-se as seguintes espécies: *Propionibacterium freundenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* e *P. cyclohexanicum* (Barreira, 2008; Montel *et al.*, 2014).

A microbiota secundária pode ser adicionada na forma de culturas bem definidas (consoante as normas de produção do queijo), ou ser acidentalmente introduzidas no queijo quer por contaminação prévia do leite quer durante o processo de cura. No caso dos queijos tradicionais Portugueses, não se recorre à adição deliberada de bactérias *starter*, recorrendo-se alternativamente uma combinação indeterminada de microrganismos presentes naturalmente no leite e que se desenvolvem durante o processo de fabrico do queijo, atingindo densidades celulares de até  $10^8$  UFC/g no espaço de algumas horas (Barreira, 2008). A microbiota secundária inclui bactérias ácido-lácticas não *starter* que se desenvolvem naturalmente no interior dos queijos, e fungos que se desenvolvem quer no interior quer no exterior do queijo (Beresford *et al.*, 2001, Montel *et al.*, 2014).

Segundo Cogan *et al.* (1997) fonte citada por Barreira (2008), geralmente as bactérias não *starter* são lactobacilos e pediococos mesófilos. Estes constituem uma parte importante microbiana do queijo durante a cura, mas não fazem parte da *starter*, não se desenvolvem bem no leite e não contribuindo para a produção de ácido no queijo. Os lactobacilos mesófilos mais frequentes são: *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. curvatus*, e os pediococos mais frequentes são *Pediococcus Pentosaceus*. Existem poucos dados relativos à microbiota não *starter* dos queijos tradicionais portugueses. Roseiro e Barbosa (1996), citados por Beresford *et al.* (2001), afirmam que os lactobacilos predominam no Queijo de Serpa e no Queijo da Serra da Estrela, sobretudo *L. paracasei* e *L. plantarum*.

A microbiota do queijo apresenta-se assim como uma entidade muito complexa e diversificada. Dada as inúmeras interações metabólicas que pode existir entre microrganismos, existe inúmeras potencialidades enzimáticas, sendo por isso a diversidade microbiana um fator chave para os benefícios sensoriais.

### 2.4.3. Potencial dos microrganismos na produção de queijo

Os queijos tradicionais são considerados uma importante fonte de diversidade microbiana. Alguns destes microrganismos podem apresentar características tecnológicas interessantes, atuando de forma desejável, enquanto outros, podem atuar de forma indesejável, causando defeitos no queijo ou até mesmo serem patogénicos podendo causar doença ou danos nos seres humanos. De seguida, iremos abordar os diferentes microrganismos e tentar perceber de que forma eles atuam e que tipos de efeito provocam no queijo.

#### 2.4.3.1. Microrganismos de interesse tecnológico

### Bactérias lácticas

As bactérias lácticas, também designadas bactérias do ácido láctico (BAL), encontram-se largamente distribuídas na natureza ocorrendo naturalmente na microbiota nativa do leite cru (Guessas e Kihal, 2004; Freire *et al.*, 2021; Jesen *et al.*, 2012; Londoño *et al.*, 2015; Pacheco e Galindo, 2010). Embora sejam consideradas microbiota natural, a sua presença advém da contaminação da superfície do úbere, dos tetos, dos procedimentos e equipamento de ordenha, transporte, superfícies dos tanques e ambiente da queijaria (Gaglio *et al.*, 2019). São um grupo de microrganismos morfológicamente heterogéneo, que se apresentam sob a forma de cocos ou bacilos, que podem estar dispostos em cadeia ou individualmente. São Gram-positivos, não esporulados, catalase e oxidase negativos, desprovidos de citocromos, fastidiosos, anaeróbios tolerantes e tolerantes aos ácidos e estritamente fermentativos (Axelsson, 2004; von Wright e Axelsson, 2019; Jesen *et al.*, 2012; Holzapfel *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2021; Londoño *et al.*, 2015; Lahtinen *et al.*, 2012).

Estas podem ser mesófilas (entre 25 °C e 40 °C) ou termófilas (entre 45 °C e 65 °C), de acordo com a sua temperatura ótima de crescimento (Perin *et al.*, 2018; McSweeney *et al.*, 2017; von Wight e

Axelsson, 2019). Os principais géneros são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Perin *et al.*, 2019; McSweeney *et al.*, 2017; Pacheco e Galindo, 2010; Fox *et al.*, 2000).

Constituem um grupo bastante diverso de microrganismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico, através da fermentação dos hidratos de carbono (Axelsson, 2004; Medici *et al.*, 2004; Lahtinen *et al.*, 2012; Bjorkroth e Koort, 2011; von Wight e Axelsson, 2019; Londoño *et al.*, 2015). De acordo com os produtos da fermentação láctica, podem ser agrupadas em homofermentativas (produzem apenas ácido láctico a partir da glucose) e/ou heretofermentativas além de produzirem ácido láctico, produzem etanol, ácido acético e dióxido de carbono (Londoño *et al.*, 2015).

As bactérias lácticas são muito importantes na produção queijeira (Awad *et al.*, 2007), porque para além de serem as principais responsáveis pela acidificação do queijo, também favorecem a sua conservação (Medici *et al.*, 2004). Durante o fabrico do queijo, as bactérias lácticas ao fermentarem a lactose em ácido láctico diminuem o pH do meio, acelerando o processo de coagulação e o dessoramento (auxiliando na sinérese do soro) (Awad *et al.*, 2007; Beresford *et al.*, 2001). Além disso contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do produto (sabor, corpo e textura do queijo) (Medici *et al.*, 2004; McSweeney *et al.*, 2017; Perin *et al.*, 2019; Awad *et al.*, 2007). Durante a cura, as bactérias lácticas convertem aminoácidos em compostos aromáticos (Beresford *et al.*, 2001), contudo podem também produzir outras substâncias antimicrobianas como bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) que, tal como o pH baixo, inibem o crescimento de microrganismos patogénicos, contribuindo assim para a segurança microbiológica dos queijos produzidos com leite cru (McSweeney *et al.*, 2017; Perin *et al.*, 2019; Farkye, 2014; Gaglio *et al.*, 2019). Conforme já tínhamos referido anteriormente as bactérias lácticas envolvidas na produção de queijo dividem-se entre as dominantes (*starters*), e as secundárias “não *starter*. As iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido (Pacheco e Galindo, 2010) e contribuem para o processo de cura (Beresford *et al.*, 2001; Montel *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013; Farkye, 2014; Dahl *et al.*, 2000), enquanto as secundárias geralmente estão envolvidas nas características sensoriais do queijo.

## Fungos filamentosos

Os Fungos filamentosos, também denominados de bolores são fungos multicelulares, aeróbios, que crescem sob a forma de filamentos denominados de hifas (Monteiro, 2016). Na produção de algumas variedades de queijos, tanto industriais quanto artesanais, o crescimento de fungos filamentosos pode fazer parte da microbiota desejável como é o caso dos bolores brancos (*Penicillium camemberti*) em queijos como o Camembert e o Brie e os fungos azuis (*Penicillium roqueforti*) em queijos como o Gorgonzola e o Roquefort (Sobral *et al.*, 2017). Durante o processo de maturação estes fungos produzem enzimas (lipases e proteases) que atuam sobre as proteínas e as gorduras do queijo dando origem a aromas e sabores diferenciados (Ozturkoglu e Vries, 2017).

Embora o crescimento de fungos na superfície ou no interior em diversas variedades de queijo seja essencial para o amadurecimento, o crescimento de fungos geralmente não é desejado, uma vez que podem influenciar as características organolépticas dos queijos, pela produção de micotoxinas representando um potencial risco para a saúde (Torkar e Vengust, 2008; Ozturkoglu e Vries, 2017; Ferreira *et al.*, 2010). Para além disso, os fungos também são responsáveis pela liquefação do coágulo formado no processo da coalhada na produção de queijo (Fernandes, 2009). A sua presença em leite e queijo pode ter origem no ar, equipamento, água e no ambiente das salas de cura, como paredes e prateleiras de madeira (Torkar e Vengušt, 2008; Ozturkoglu e Vries, 2017). Quando utilizados em condições controladas, os bolores podem contribuir para o desenvolvimento da textura e propriedades sensoriais do queijo (Ozturkoglu e Vries, 2017; Kongo e Malcata, 2016; McSweeney *et al.*, 2017), *P. camemberti* e *P. roqueforti* são os fungos filamentosos mais comuns usados como culturas de amadurecimento em termos de aparência, textura e desenvolvimento de sabor de queijos curados

(Ozturkoglu e Vries, 2017). Os bolores normalmente envolvidos na deterioração de queijo incluem membros do género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Monilia* e *Alternaria* (Fernandes, 2009). Os fungos para além de terem interesse tecnológico, também podem ser indicadores de qualidade, à semelhança do parâmetro da contagem de microrganismos a 30 °C. A sua análise também é considerada como um indicador das condições de higiene do leite e como foi manipulado durante o processamento (Ferreira *et al.*, 2010).

#### 2.4.3.2. Microrganismos que afetam a qualidade

##### Bactérias coliformes

As bactérias coliformes são um grupo de organismos que podem ser encontrados no solo, nas águas naturais e residuais domésticas e no intestino do homem e de outros animais de sangue quente, sendo que, as bactérias coliformes totais incluem as espécies fecais e as ambientais (Correia, 2014; Paruch e Maehlum, 2012; APDA, 2012; Perin *et al.*, 2018).

Este grupo de microrganismos pertence à família *Enterobacteriaceae* (bacilos Gram-negativos não esporulados anaeróbios facultativos) que apresentam a particularidade de fermentar a lactose produzindo gás quando incubadas a 35-37 °C (Paruch e Maehlum, 2012; APDA, 2012; Trmčić *et al.*, 2016; Correia, 2015; Correia, 2014; Perin *et al.*, 2018; Flores e Melo, 2015). Os principais representantes deste grupo pertencem aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (Correia, 2014; Correia, 2015; Perin *et al.*, 2018; Chambers, 2002; Flores e Melo, 2015). Os coliformes termotolerantes ou fecais são coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5 +/- 0,2 °C em 24 a 48h. O principal representante deste grupo é *Escherichia coli*, sendo que alguns coliformes do género *Klebsiella* também apresentam essa capacidade (Flores e Melo, 2015). Alguns géneros, como *Enterobacter* são psicotróficos (Chambers, 2002; Perin *et al.*, 2018).

A sua presença era diretamente associada à contaminação de origem fecal, mas atualmente é reconhecido que a sua presença não é evidência inequívoca de contaminação fecal direta, mas pode ajudar a identificar deficiências sanitárias (Flores e Melo, 2015; Perin *et al.*, 2018; Chambers, 2002; Correia, 2015; Kornacki *et al.*, 2015).

A sua determinação em leite e queijos é bastante útil porque permite monitorizar a qualidade microbiológica dos processos (Flores e Melo, 2015). Uma elevada contagem destes microrganismos (> 2,0 Log UFC/mL) (Perin *et al.*, 2018), sugere falhas na higiene geral e/ou temperatura de armazenamento inadequada (Correia, 2015; Perin *et al.*, 2018). Contudo, uma contagem esporádica de coliformes elevada pode indicar a existência de mastite no rebanho (Chambers, 2002; Perin *et al.*, 2018; Flores e Melo, 2015).

Estas são responsáveis por causar problemas sérios na produção de queijo, além de formarem odores indesejáveis. A forte formação de gás provoca uma textura inadequada (estufamento precoce). O seu desenvolvimento é bloqueado em pH inferior a 6, o que explica a sua atuação restrita ao início da fermentação láctica (Flores e Melo, 2015).

## *Escherichia coli*

*E. coli* é a bactéria mais representativa do grupo das bactérias coliformes fecais. Consiste em bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae* (Gomes, *et al.*, 2016; Desmarchelier e Fegan, 2011; Brom *et al.*, 2020). É comumente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e outros vertebrados, onde a maioria não é patogénica, no entanto, existem vários grupos que podem ser patogénicos, causando uma variedade de doenças, algumas das quais fatais (Desmarchelier e Fegan, 2011). Existem seis principais grupos patogénicos de *E. coli* que afetam o intestino dos seres humanos: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), também chamada *E. coli* produtora de verotoxinas (VTEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que é um subgrupo de STEC/VTEC, onde se inclui o principal serotipo *E. coli* O157:H7, provavelmente a *E. coli* patogénica mais importante em termos de infeções alimentares; *E. coli* enteropatogénica (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Farrokh *et al.*, 2013; Desmarchelier e Fegan, 2011).

A *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) e *E. coli* STEC (STEC - Shiga Toxin-producing *E. coli*) são de particular importância no contexto de segurança alimentar porque produzem toxinas que podem causar doença grave (Farrokh *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2016; Brom *et al.*, 2020). Segundo Brom *et al.* (2020), a sua dose infecciosa é muito baixa (< 10 UFC). As doenças associadas a *E. coli* STEC e enterohemorrágica variam de diarreia sanguinolenta, à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica-urémica. Os ruminantes, em especial os caprinos e ovinos, são considerados o principal reservatório do STEC (Brom *et al.*, 2020).

Dada a sua origem estar geralmente associada a origem fecal, esta bactéria tem sido usada como indicador de falta de higiene (Metz *et al.*, 2020), no entanto a presença deste indicador pode não estar relacionada com a presença de microrganismos patogénicos de origem alimentar nem a sua quantificação se revelar útil para a deteção destes microrganismos. De igual modo, a ausência desta não significa a ausência de microrganismos patogénicos de origem alimentar (Kornacki *et al.*, 2015). No entanto, de acordo com Metz *et al.* (2020) continua a ser o indicador de contaminação fecal mais usado.

A presença no leite e em produtos lácticos podem ter diferentes origens (o leite pode ser contaminado durante a recolha indiretamente por meio de úberes sujos com fezes, solo, água, ração e cama contaminado, ou diretamente se o animal tiver mastite por *E. coli*. trabalhadores assintomáticos ou doentes, podem excretar *E. coli* nas suas fezes e más práticas de higiene pessoal podem levar à contaminação de produtos lácticos e equipamentos (Desmarchelier e Fegan, 2011; Chambers, 2002; McSweeney *et al.*, 2017; Perin *et al.*, 2018).

São sensíveis ao calor e dependem do meio de suspensão ou matriz alimentar, pH e da atividade de água ( $a_w$ ). Sobrevivem bem em alimentos refrigerados e congelados. Em leite pasteurizado, leite cru e desnatado, *E. coli* O157:H7 não cresce a 5 °C, no entanto a 8 °C, aumentos de 1-2 e 2 -3 log podem ocorrer após 4 e 7 dias respetivamente. Algumas espécies conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7 °C e 46 °C, mas a temperatura ótima de crescimento é entre 35 °C e 40 °, e pH entre 4,4 e 10, sendo o ideal 6-7 (Desmarchelier e Fegan, 2011).

No caso da produção dos queijos é importante referir que estes microrganismos têm uma tolerância significativa à acidez e às temperaturas baixas usadas no período de cura que podem constituir um perigo. Relativamente aos efeitos negativos que podem causar ao nível da qualidade dos queijos, está relacionado com o fato de estas provocarem o chamado “flato precoce”, provocado pela produção de gás, podendo inclusive chegar a rachar o queijo (Ordóñez *et al.*, 2005).

## ***Pseudomonas* spp. e outros microrganismos psicrotróficos**

*Pseudomonas* spp., é um dos principais agentes deteriorantes do leite (Montel *et al.*, 2014), é um microrganismo aeróbio estrito, não esporulado, Gram-negativo, e é caracterizado na sua forma como bacilos curtos, que apresenta flagelos polares (o que lhe permite ter mobilidade). São bactérias não fermentadoras da glucose, em geral são citocromo oxidase positiva e catalase positiva (Franzetti e Scarpellini, 2007). Este género pertence à família das *Pseudomonadaceae* e a sua espécie mais patogénica é *Pseudomonas aeruginosa*, a qual pode provocar infeções respiratórias e urinárias (Sharma *et al.*, 2014).

O género *Pseudomonas* é considerado o mais importante dentre os psicrotróficos, podendo ser encontrado em aproximadamente 10 % da microbiota do leite recém-ordenhado sendo que sob condições de refrigeração este género rapidamente predomina sobre a microbiota tanto do leite cru como do leite pasteurizado (Santos e Fonseca, 2001). Segundo Stulova *et al.* (2010), citado por Ângelo, *et al.* (2014) 50 % das bactérias psicrotróficas presentes em leite cru refrigerado pertencem ao género *Pseudomonas*, sendo *Pseudomonas fluorescens* a espécie predominante. *P. fluorescens*, é caracterizada pela produção de um pigmento fluorescente e difusível durante o crescimento em meios apropriados. *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie não-psicrotrófica mais importante, pois é considerada agente patogénico em humanos e animais, mas pode ser facilmente diferenciada das outras espécies do género *Pseudomonas* devido à sua capacidade de crescimento à temperatura de 41°C e sua habilidade de produzir piocianina. Psicrotróficos termodúricos constituem um grupo de bactérias capazes de resistir a temperaturas similares àquelas do processo de pasteurização (72 – 74°C) e possuem capacidade de crescimento em temperaturas de 4 a 7°C. Pertencem a este grupo os géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Micobacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Devido ao fato deste grupo de bactérias apresentarem longo tempo de crescimento em temperaturas de refrigeração, estas bactérias apresentam menor importância quando associadas com outros psicrotróficos, que predominam rapidamente em temperaturas abaixo de 7°C (Santos e Fonseca, 2001).

Os microrganismos psicrotróficos Gram-negativos são facilmente destruídos pela ação do calor, mas produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que mantêm a sua atividade enzimática mesmo após processos de pasteurização ou mesmo o tratamento UHT (Dias, 2016; Santana *et al.*, 2004; Santos e Fonseca, 2001; Kumaresam *et al.*, 2007). Os microrganismos Gram-positivos apresentam baixa ação proteolítica e ação lipolítica limitada em comparação com os microrganismos Gram-negativos (Santana *et al.*, 2004).

Os principais problemas associados à ação destas enzimas são: alteração de sabor (gosto amargo, ensaboado e ranço), odor do leite, problemas na coagulação do leite (perda de consistência na formação do coágulo para o fabrico de queijo) e consequentemente redução do rendimento queijeiro (Santana, *et al.*, 2004; Kumaresam *et al.*, 2007).

## **Leveduras**

As leveduras apresentam-se como microrganismos de grande importância como agentes deteriorantes de alimentos, porém são também, muitas vezes, empregadas no bioprocessamento de alimentos (Xavier *et al.*, 2006). Estes microrganismos quando da utilização de produtos lácteos como substrato para crescimento, especialmente queijos, podem desempenhar, de acordo com o tipo de produto e espécie de levedura envolvida, ações benéficas para o melhoramento da qualidade do produto através do desenvolvimento de características particulares de cor, odor, sabor e textura, bem como desenvolverem ações deteriorantes de alimentos, decorrentes da produção de enzimas capazes de causar mudanças nas características organolépticas do produto, tornando-o impróprio para o consumo (Xavier *et al.*, 2006). Segundo Viljoen (2001) as espécies de

leveduras que são frequentemente isoladas em produtos lácteos pertencem aos géneros *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Yarrowia* e *Candida*.

## ***Enterobacteriaceae***

As bactérias da família das Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos que fazem parte da população microbiana normal (comensais) do trato digestivo (cólon), de que são exemplos *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Providencia* (Alves, 2020). Esta bactéria desenvolve-se em atividade de água mínima de 0,935, pH em torno de 4,0 e 9,0 e faixa de temperatura de 7 a 49,4 °C, sendo considerada indicadora de contaminação fecal em alimentos processados (Veiga, 2012).

### **2.4.3.3. Microrganismos que afetam a segurança alimentar**

#### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica, aeróbia, Gram-positiva não esporulada, que provoca listeriose em humanos (Veiga, 2012; Gonçalves *et al.*, 2017). A listeriose causa gastroenterite, mas em casos mais graves, provoca septicemia, meningite e meningoencefalite (Veiga, 2012; Gonçalves *et al.*, 2017). Esta bactéria pode estar presente no meio ambiente, sendo transmitida principalmente pela via alimentar (Gonçalves *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, a indústria dos laticínios, principalmente a dos queijos, tem sido associada a casos e surtos de listeriose. A contaminação dos queijos por *L. monocytogenes* tem sido associada, principalmente, ao leite usado no fabrico (cru ou pasteurizado inadequadamente), ou ao ambiente de processamento (Pintado *et al.*, 2009; Veiga, 2012; Gonçalves *et al.*, 2017).

A sua ampla distribuição no meio ambiente, e as suas características fisiológicas como resistência a ambientes ácidos e altas concentrações de cloreto de sódio (10-12 %, sobrevivendo a 25,5 % de NaCl) (Veiga, 2012), a capacidade de sobreviver por longos períodos em condições adversas e a sua capacidade de se alojar em locais onde é difícil a penetração dos detergentes e desinfetantes, aderindo às superfícies dos equipamentos e formando biofilmes que as protegem de condições ambientais adversas, torna-a um microrganismo de grande preocupação na indústria alimentar (Veiga, 2012; Gonçalves *et al.*, 2017).

#### ***Salmonella spp.***

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, constituída por bacilos Gram-negativos não esporulados, anaeróbios facultativos (Veiga, 2012). *Salmonella* é um importante microrganismo patogénico de origem alimentar. Sendo responsável por um elevado número de surtos e de toxinfecções alimentares. A sua presença em alimentos pode causar salmonelose, uma doença que provoca diarreia, dor abdominal e febre. Normalmente as manifestações iniciam-se de 12 a 72 horas após infeção e a doença dura de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas recupera sem tratamento. No entanto, em algumas pessoas a diarreia pode ser severa a ponto de ser necessária a hospitalização devido à desidratação (Veiga, 2012). Se tiver implícita *Salmonella Typhi*, responsável pela febre tifoide a situação é muito mais grave (Mathur *et al.*, 2012).

De acordo com Modi *et al.* (2001) citado por Veiga (2012), *Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado por longos períodos 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 processados. A sua presença no alimento implica a rejeição de todo o lote de produto (Veiga, 2012).

## ***Staphylococcus* produtores de coagulase**

Os *Staphylococcus* são ubíquos no ambiente e podem ser encontrados no ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais, em seres humanos e animais (Ferreira, 2014). Pertencem à família *Staphylococcaceae*, são bactérias Gram-positivas com cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não formadores de esporos, que possuem uma parede celular espessa constituída por peptidoglicano e ácido teicóico. Podem ocorrer de forma isolada, em pares, tétradas, ou com o formato de um cacho de uvas. Estes são catalase positiva (o que permite distingui-los de *Streptococcus*) e fermentam carboidratos produzindo ácido láctico. São oxidase negativa e crescem tanto em aerobiose como anaerobiose, sendo anaeróbios facultativos (Rodrigues, 2021; Ferreira, 2014).

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes mais comuns em surtos de intoxicação alimentar. A intoxicação causada por *S. aureus* manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende da suscetibilidade do indivíduo, do peso corporal e, especialmente, do estado de saúde da pessoa acometida. Para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação é necessária  $10^5$  a  $10^6$  UFC de *S. aureus* por grama de alimento (Ferreira, 2014; Rodrigues, 2021). Este microrganismo é conhecido pela sua resistência a condições adversas, como alto teor de salinidade, temperatura e pH extremos e ao tratamento com desinfetantes e antibióticos (Rodrigues, 2021; Ferreira, 2014). Segundo Ferreira (2014), *S. aureus* multiplica-se bem em concentrações de NaCl até 10 %, no entanto é possível o seu crescimento retardado, mesmo em concentrações de NaCl até 20 %. Durante o processamento e armazenamento de alimentos, temperaturas fora do intervalo de 7-48 °C previnem a sua multiplicação.

## **2.5. Critérios microbiológicos aplicáveis pela legislação nacional**

Conforme podemos verificar no capítulo anterior, diferentes grupos microbianos podem apresentar características positivas e desejáveis, como o caso das bactérias lácticas (podendo a sua utilização ser benéfica como cultura iniciadora para produtos fermentados ou como probióticos (Perin *et al.*, 2018), mas por outro lado outros grupos microbianos podem indicar condições higiénicas de produção e armazenamento do leite (coliformes, microrganismos psicotróficos), permitindo que produtores, indústrias e inspetores de alimentos avaliem as condições de produção e prevejam a deterioração e o uso do leite para produtos lácteos. O controlo da contaminação microbiana no leite é por isso considerado um ponto chave no controlo de qualidade e segurança dos produtos lácteos (Perin *et al.*, 2018). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, só o leite com uma qualidade consistente e segurança satisfatória pode ser usado no fabrico de queijo com leite cru. Um dos principais requisitos sanitários aplicáveis à produção de leite cru é que este deve provir de animais pertencentes a explorações oficialmente indemnes de brucelose e tuberculose. Existem também requisitos aplicáveis às instalações e equipamentos, à higiene durante o transporte e também relativos à higiene do pessoal.

Para o presente estudo importa saber quais são os critérios<sup>1</sup> aplicados ao leite cru e aos queijos fabricados com leite cru. De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, os operadores das empresas que queiram fabricar produtos lácteos por um processo que não inclua nenhum tratamento térmico devem assegurar que se cumpra os seguintes critérios para o leite cru (Tabela 7).



**Tabela 7-** Critérios microbiológicos do leite não tratado termicamente e usado para produção de produtos lácteos.

Espécie Animal	Contagem em placas a 30 °C (UFC/ml)
Bovina	$\leq 1 \times 10^5$ (*)
Outras espécies	$\leq 5 \times 10^5$ (*)
(*) Média ao longo de um período de dois meses, com pelo menos duas colheitas mensais.	
<sup>1</sup> Critério microbiológico que define a aceitabilidade de um produto, de um lote de géneros alimentícios ou de um processo, baseado na ausência ou na presença de microrganismos, ou no seu número, e/ou na quantidade das suas toxinas/metabólitos, por unidade(s) de massa, volume, área ou lote (Reg. (CE) N.º 2073/2005).	

Fonte: Adaptado de Regulamento (CE) n.º 2073/2005.

Em queijos produzidos com leite cru, o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 prevê a quantificação de estafilococos coagulase positiva e as pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Tabelas 8 e 9). De acordo com este Regulamento, “um critério de segurança para os géneros alimentícios define a aceitabilidade de um produto ou de um lote de géneros alimentícios aplicável aos produtos colocados no mercado”. De acordo com o mesmo Regulamento, “um critério de higiene dos processos indica se o processo de produção funciona de modo aceitável. Não é aplicável aos produtos colocados no mercado. Estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar”.

Para *Listeria monocytogenes*, o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 refere que em queijo fabricado com leite cru deve estar ausente em 25 g, sendo a pesquisa realizada “antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu”. No que diz respeito a *Salmonella* spp., o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 refere que a mesma deve estar ausente em 25 g de queijo fabricado com leite cru, devendo realizar-se a pesquisa quando os queijos são “colocados no mercado durante o seu período de vida útil”. Tanto a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. atesta a segurança do lote testado e as boas práticas de higiene nos processos, sendo um critério de avaliação da segurança dos géneros alimentícios.

A quantificação de estafilococos coagulase positiva, constitui um critério para avaliação da higiene dos processos que, segundo o Regulamento supramencionado, deve ser avaliado “durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”. Segundo McSweeney *et al.* (2017), este momento é imediatamente após o fabrico. Baptista (2014), refere que o número máximo na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acontece nos primeiros 5 dias, em particular no 3º dia. A legislação refere a recolha de cinco amostras de queijo do mesmo lote, no caso de resultado insatisfatório, com contagens superiores a  $10^5$  UFC/g (5 Log UFC /g), recomenda a “melhoria da higiene na produção e da seleção de matérias-primas”. É também mencionado neste Regulamento que “se se detetarem valores superiores a  $10^5$  UFC/g, o lote de queijo deve ser testado para deteção de enterotoxinas estafilocócicas” (CE, 2005). Nas tabelas 8 e 9, estão descritos os critérios microbiológicos a verificar em queijos fabricados com leite cru de acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005.

**Tabela 8 - Critérios microbiológicos a verificar em queijos fabricados com leite cru (critérios de segurança) (Reg. (CE) n.º 2073/2005).**

Categoria de alimento	Microrganismo/respetivas toxinas e metabolitos	Plano de amostragem <sup>(1)</sup>		Limites		Método de análise de referência <sup>(2)</sup>	Fase em que o critério se aplica
		n	c	m	M		
Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos.	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 UFC/g <sup>(3)</sup>		EN/ISO 11290-2 <sup>(4)</sup>	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil.
		5	0	Ausência em 25 g <sup>(5)</sup>		EN/ISO 11290-1	Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu.
Queijo, manteiga e natas fabricadas com leite cru ou leite que sido submetido a tratamento térmico mais fraco que a pasteurização	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausência em 25 g		EN/ISO 6579	Produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil.

(1) n = número de unidades que constituem a amostra; c = número de unidades da amostra com valores entre m e M; m = valor mínimo verificado; M = valor máximo verificado.  
(2) Utilizar-se á a edição mais recente desta norma.  
(3) Este critério é aplicável se o fabricante puder demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao termo da vida útil. O operador pode fixar limites intermediários durante o processo, que deverão ser suficientemente baixos para garantir que, no termo do período de vida útil, não seja ultrapassado o limite de 100 UFC/g.  
(4) Sementeira de 1 mL de inóculo numa placa de Petri de 140 mm de diâmetro ou em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.  
(5) Este critério é aplicável aos produtos antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do setor alimentar que os produz, se este não poder demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao termo do período de vida útil.

Fonte: Adaptado de Regulamento (CE) n.º 2073/2005.

**Tabela 9 - Critérios microbiológicos a verificar em queijos fabricados com leite cru (critérios de higiene dos processos) (Reg. (CE) n.º 2073/2005).**

Categoria de alimento	Microrganismo/respetivas toxinas e metabolitos	Plano de amostragem <sup>(1)</sup>		Limites		Método de análise de referência <sup>(2)</sup>	Fase em que o critério se aplica	Medidas em caso de resultados insatisfatórios
		n	c	m	M			
Queijo fabricado com leite cru	<i>Estafilococos coagulase positivos</i>	5	2	10 <sup>4</sup> UFC/g	10 <sup>5</sup> UFC/g	EN/ISO 6888 - 2	Durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que seja o número de estafilococos seja mais elevado	Melhoria da higiene na produção e da seleção de matérias-primas. Se detetarem valores > 10 <sup>5</sup> UFC/g, o lote de queijo deve ser testado para deteção de enterotoxinas estafilocócicas.

(1) n = número de unidades que constituem a amostra; c = número de unidades da amostra com valores entre m e M; m = valor mínimo verificado; M = valor máximo verificado.  
(2) Utilizar-se á a edição mais recente desta norma.

Fonte: Adaptado de Regulamento (CE) n.º 2073/2005.

Para além dos parâmetros legislados, na literatura são referidos outros indicadores de qualidade tais como as bactérias lácticas, enterobactérias, bactérias coliformes e leveduras (Tavaria e Malcata,

1998; Tavarina e Malcata, 2000; Tavarina *et al.*, 2006; Picon *et al.*, 2006; Pisano *et al.*, 2006; Pintado *et al.*, 2008).

Uma outra referência são os “Valores Guia” para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos-a-comer, estabelecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Os valores-guia não são tão restritivos como os critérios anteriores, uma vez que são recomendações sem estatuto legal, nem vínculo contratual, podendo por vezes anteceder o estabelecimento de um regulamento. Constituem linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica dos produtos, ou processos, geralmente estabelecidos por produtores, associações comerciais ou entidades governamentais. Estabelecem limites microbiológicos para um alimento e combinações de parâmetros microbiológicos, mas não definem planos de amostragem, nem métodos de análise. Estes valores são indicativos, pelo que o seu cumprimento não é obrigatório. São uma ferramenta para avaliação dos processos de produção e conservação de géneros alimentícios prontos para consumo, produtos intermédios de fabrico ou de matérias-primas, permitindo verificar se as boas práticas de higiene e de fabrico e as datas estipuladas para o consumo de produtos estão sob controlo e se os produtos obtidos são seguros do ponto de vista microbiológico. Indicam se os resultados dos ensaios microbiológicos se situam dentro de níveis habitualmente aceitáveis e, deste modo, permitem efetuar uma análise de tendências e identificar situações que se encontram fora de controlo, alertando para a necessidade de implementar medidas corretivas adequadas. Como não estão regulamentados acompanham as evoluções científicas, podendo ser rapidamente modificados e atualizados (Saraiva *et al.*, 2019). Este documento é utilizado atualmente na elaboração de pareceres técnicos por parte da Divisão de Riscos Alimentares da ASAE. De acordo com os “Valores -guia” estabelecidos pelo INSA, os queijos feitos com leite cru enquadram-se no grupo 4 para os microrganismos a 30 °C e no grupo 2D para os restantes parâmetros. Seguem-se os valores - guia para o Queijo produzido com leite cru (Tabela 10).

**Tabela 10** - “Valores-guia INSA” - microrganismos indicadores de higiene e de alteração em alimentos prontos para consumo.

Microorganismos indicadores de higiene e de alteração	Resultado		
	Contagens (UFC/g ou UFC/mL)		
	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Microorganismos a 30 °C/ contagem de aeróbios mesófilos	<10 <sup>6</sup> Razão CAM /BAL ≤100 Nota 1	10 <sup>6</sup> - ≤10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup> Razão CAM /BAL >100
Leveduras	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - ≤10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
Bolores	< 5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>2</sup> - ≤10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i> a 37 °C	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - ≤10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
<i>Escherichia coli</i>	<10 (Não detetado)	10 - ≤10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>
<i>Listeria spp.</i>	<10	10 - ≤10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>
<p><b>Nota 1</b> - Sempre que o resultado dos “Microorganismos a 30 °C” for superior ao VMR e inferior ou igual ao VMA, deverá ser tida em conta a razão CAM/BAL na interpretação do resultado em amostras que contenham componentes pasteurizados e/ou incluam componentes com flora específica própria.</p> <p>VMR – Valor Máximo de Referência  VMA – Valor Máximo Admissível  CAM – Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos  BAL - Bactérias ácido- lácticas</p>			

Fonte: Adaptado de Saraiva *et al.* (2019).

### 3. Queijos da Beira Baixa DOP

O fabrico de queijo na zona centro, e em particular na Beira Baixa, é uma atividade com muitos anos de história no que respeita aos métodos de fabrico bem como à matéria-prima base utilizada: o leite cru de pequenos ruminantes. A ancestralidade desde produtos bem como a sua reconhecida qualidade permitiu que estes beneficiassem de proteção legal com a publicação do Regulamento (CE) n.º 1107/1996 da Comissão de 12 de junho de 1996, relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem, com o reconhecimento dos Queijos da Beira Baixa DOP (Martino *et al.*, 2021). A tradição na produção de queijos na Beira Baixa tem a sua origem com os fluxos migratórios da transumância. A qualidade tão apreciada dos Queijos da Beira Baixa deve-se tanto a fatores edafoclimáticos que permitem o crescimento e cultivo de pastagens diversificadas para alimento dos rebanhos que nela pastoreiam em permanência, como a fatores humanos, associados aos saberes ancestrais ligados ao fabrico do queijo enraizados na população desta região desde tempo remotos.

De acordo com o Regulamento de execução (EU) 2021/245 da Comissão de 11 de fevereiro de 2021, designa-se por Queijos da Beira Baixa (Queijo de Castelo Branco, Queijo Amarelo da Beira Baixa, Queijo Picante da Beira Baixa) (DOP). Por cura prolongada do Queijo de Castelo Branco DOP e do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, obtém-se o Queijo de Castelo Branco Velho DOP e Queijo Amarelo da Beira Baixa Velho DOP. Os Queijos da Beira Baixa DOP (Amarelo e Castelo Branco) podem ter várias apresentações, no que respeita ao tamanho e à cura que deve ter, no mínimo, 40 dias, mas que para tempos de cura superiores a 90 dias acrescentam a designação de “Velho”. O Queijo Picante da Beira Baixa DOP implica um tempo de cura mínimo de 120 dias (Martino *et al.*, 2021).

#### 3.1. Área geográfica de produção

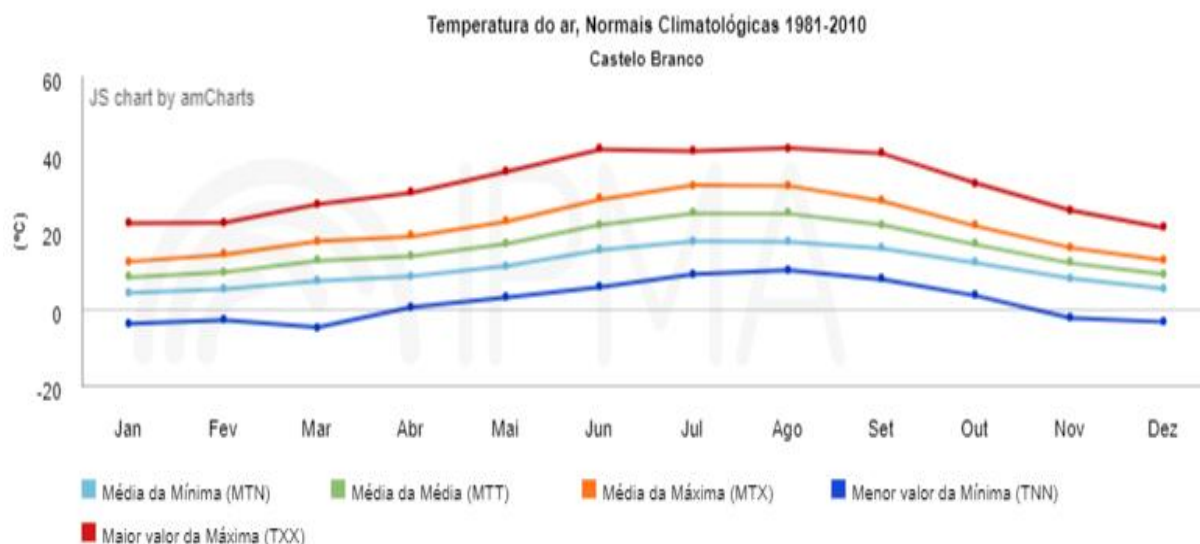
A produção de leite, o fabrico, maturação e cura dos Queijos da Beira Baixa DOP está delimitada aos concelhos de Castelo Branco, Fundão, Belmonte, Penamacor, Idanha-a-Nova, Vila Velha de Rodão, Proença-a-Nova, Vila de Rei, Sertão, Oleiros, Mação e às freguesias de Aldeia de São Francisco, União das Freguesias de Barco e Coutada, Boidobra, União das freguesias de Casegas e Orondo, União das freguesias de Covilhã e Canhoso, Dominguiso, Ferro, Orjais, Peraboa, União das freguesias de Peso e Vales do Rio, São Jorge da Beira, Sobral de São Miguel, União de freguesias de Teixoso e Sarzedo, Tortosendo, União das freguesias de Vale Formoso e Aldeia do Souto do concelho da Covilhã (Caderno de Especificações -Queijo da Beira Baixa DOP, 2016) (Figura 5). A região em referência encontra-se no centro da Beira Baixa, englobando toda a área habitualmente conhecida como “Zona do feijão-frade”, dada a ligação entre a cultura desta leguminosa com a criação de ovinos leiteiros, as condições ambientais e a dimensão das propriedades. Como principais recursos hídricos contam-se os rios Tejo a sul, o Zêzere a norte, o Ponsul a este e o Ocreza a oeste (Martino *et al.*, 2021).



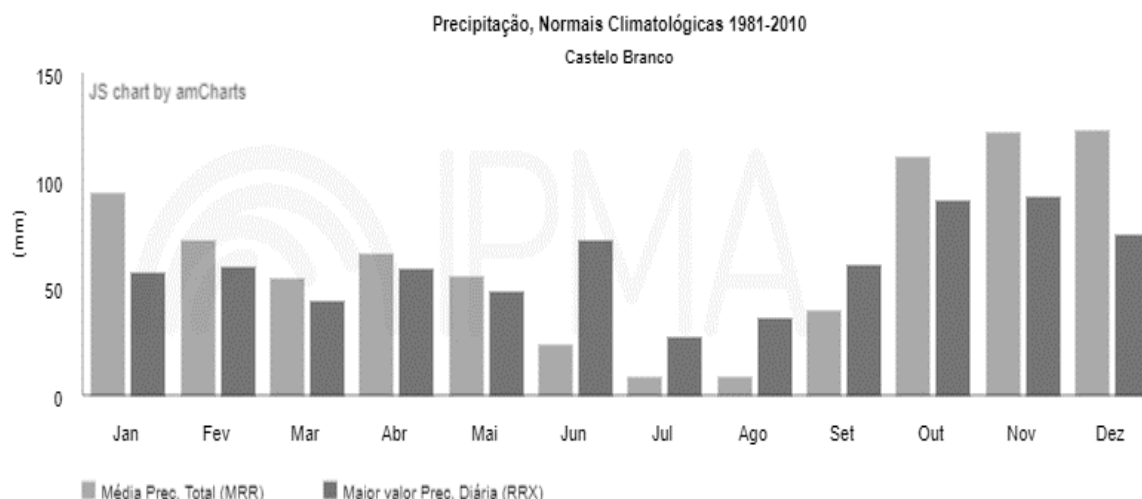
**Figura 5** - Áreas geográficas definidas para produção dos Queijos da Beira Baixa DOP.  
Fonte: <https://www.dgadr.gov.pt>, acedido em 26 de fevereiro de 2023.

### 3.1.1. Clima

A região da Beira Baixa apresenta verões quentes e secos e invernos relativamente moderados, no que respeita à temperatura média e à precipitação. A temperatura média durante os meses de junho a setembro é superior a 21°C e as temperaturas médias máximas em junho e agosto rondam os 32 °C. No que respeita à precipitação, concentra-se entre os meses de outubro a janeiro sendo muito baixa entre junho e setembro (Figuras 6 e 7).



**Figura 6**- Temperatura do ar em Castelo Branco..  
Fonte: <https://www.ipma.pt>, acedido em 26 de fevereiro de 2023.



**Figura 7** - Precipitação em Castelo Branco

Fonte: <https://www.ipma.pt>, acedido em 26 de fevereiro de 2023.

### 3.2. Caracterização do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP

O queijo Amarelo da Beira Baixa é definido no anexo II do Despacho nº 10518/2007 como sendo um queijo curado, de pasta semi-dura ou semi-mole, ligeiramente amarelada, com alguns olhos irregulares, obtido pelo esgotamento da coalhada após coagulação do leite de ovelha cru, in *extreme* ou mistura de leite de ovelha e cabra, por ação de coalho animal e produzido na área geográfica delimitada de produção. O caderno de especificações dos Queijos da Beira Baixa DOP não obriga à utilização de leite de raças específicas e autóctones, permitindo a utilização de leite de raças exóticas. Ainda assim, o caderno de especificações refere as duas raças autóctones que, historicamente, se encontram associadas ao Queijo da Beira Baixa DOP, a raça Merino da Beira Baixa e a raça caprina Charnequeira, abrindo assim espaço a quaisquer outras raças bem adaptadas à região (Martino *et al.*, 2021). Segundo Tavarina *et al.* (2006), o fabrico dos Queijos da Beira Baixa DOP, deve-se às características únicas do leite utilizado. Estas características podem ser atribuídas parcialmente ao facto de os rebanhos serem criados com acesso a pastagens espontâneas, num regime de produção ao ar livre e, em épocas de escassez, pode ser fornecido alimento conservado (fenos e palha) produzido na região (Caderno de Especificações – Queijo da Beira Baixa DOP, 2016).

Como descrito no Despacho n.º 10518/2007 e no seu Caderno de Especificações, o queijo tem um teor de humidade de 54 a 69 %, referido ao queijo isento de matéria gorda, e apresenta um teor de gordura de 45 a 60 %, referido ao resíduo seco. Apresenta uma forma de cilindro baixo (prato), regular, com abaulamento lateral e ligeiro na face superior, sem bordos definidos. Crosta de consistência semidura, de aspeto bem formada, fina e inteira e de cor amarelo ou amarelo-torrado. A pasta é de textura fechada, medianamente amanteigada de aspeto untuoso, com alguns olhos irregulares, de cor ligeiramente amarelada, uniforme. Quanto ao aroma e sabor apresenta um aroma intenso e agradável, sabor limpo e ligeiramente acidulado. As dimensões e pesos estabelecidos variam entre os 12 e os 16 cm de diâmetro, para a altura de 3 a 5 cm. O peso pode variar entre 600 e 1000 g. A maturação tem um tempo mínimo de 40 dias e decorre em condições que variam entre os 10 e os 18 °C para a temperatura, e entre os 50 e os 70 % para a humidade relativa. De forma resumida, na Tabela 11, estão descritas as principais características que o Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP deve apresentar.

**Tabela 11-** Principais características do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP

Caraterísticas	Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP
Massa (Kg)	0,6 - 1,0
Diâmetro (cm)	12 - 16
Altura (cm)	3 - 5
Forma	Cilindro baixo (prato), regular, abaulamento lateral e abaulamento ligeiro na face superior, sem bordos definidos.
Crosta	Semidura, bem formada, fina e inteira
Textura da Pasta	Fechada ou com alguns olhos irregulares, medianamente amanteigada e untuosa.
Aroma e sabor	Aroma intenso e agradável, sabor limpo e ligeiramente acidulado.
Gordura (%)	45 - 60
Humidade (%)	54 - 69
Para o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, pode também fabricar-se uma “merendeira” (0,32 - 0,5 kg, diâmetro de 7 a 10 cm e com uma altura de 3 a 4 cm)	

**Fonte:** Adaptado de Despacho n.º 10518/2007; Caderno de Especificações - Queijos da Beira Baixa DOP (2016).

### Tecnologia de fabrico

A ordenha, ou seja, a obtenção do leite, é o ponto inicial de todo o processo, sendo a qualidade tecnológica e segurança alimentar do leite fundamentais para todo o processo, estando dependentes da sua composição físico-química e microbiológica. O leite deve ser rico em proteína (caseína), gordura e deve ter um bom equilíbrio mineral, garantindo bom rendimento queijeiro (Martins, 2001). Imediatamente após a ordenha, o leite deve ser refrigerado. Segundo o Regulamento (CE) n.º 1662/2006, se o leite não for recolhido nas duas horas seguintes à ordenha, deve ser arrefecido a uma temperatura igual ou inferior a 8°C no caso de recolha diária; ou a 6°C, se a recolha não for diária. Durante o transporte para a queijaria, a temperatura do leite arrefecido não deve exceder 10°C. Este deve estar em perfeitas condições sanitárias e cumprir os critérios aplicáveis ao leite definidos no Regulamento (CE) n.º 1662/2006. As queijarias apenas devem aceitar leite produzido na área delimitada.

No início da laboração do queijo, o leite é aquecido até alcançar a temperatura ótima de coagulação (27 - 36 °C), durante 30 a 60 minutos. Durante esta fase pode ser adicionado o sal, que vai ajudar na extração das enzimas proteolíticas (McSweeney, 2007). Neste tipo de Queijo o agente coagulante é de origem animal, obtido a partir do abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerras lactentes, que contêm quimosina e pepsina, duas proteases que coagulam o leite (Manuelian *et al.*, 2020). A quantidade de agente coagulante e sal usada no fabrico são empíricas, estando associadas ao saber tradicional, transmitido entre gerações (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020). Segundo o Caderno de Especificações dos Queijos da Beira Baixa DOP, a salga pode ser por espalhamento de sal sobre a superfície após a prensagem, ou por imersão em salmoura. O processo de coagulação termina quando a coalhada se solta das paredes do recipiente que a contém. Nesta fase, o agente coagulante interage com as caseínas, conduzindo a uma clivagem do domínio hidrofílico da k-caseína, que provoca uma alteração na superfície das micelas de caseína, permitindo a sua agregação. Segue-se o aumento da viscosidade do leite, provocando a sua gelificação, ou seja, a formação da coalhada (McSweeney *et al.*, 2017). Finda a coagulação, a coalhada é trabalhada fazendo o seu corte com uma lira, com o objetivo de reduzir a sua granulometria e iniciar o dessoramento. Quando se atinge a granulometria apropriada, é colocada em moldes e iniciada a prensagem, por forma a continuar o esgotamento do soro (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020).

Segue-se a cura, etapa de fabrico em que se desenvolvem as principais características sensoriais do queijo (Reis e Malcata, 2011). Relativamente ao período mínimo de cura, os Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo deve ser de 40 dias sob condições de humidade e temperatura descritas na Tabela 12.

**Tabela 12** - Temperatura, humidade e período mínimo de cura do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP.

Condições de cura	Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP
Temperatura (°C)	10 - 18
Humidade relativa (%)	50 - 70
Período mínimo (dias)	40

Fonte: Adaptado de Despacho N.º 10518/2007; Caderno de Especificações - Queijos da Beira Baixa DOP (2016).

Terminado o processo de cura, segundo o Caderno de Especificações dos Queijos da Beira Baixa DOP, estes devem ser armazenados em ambiente refrigerado (0-5°C), transportados a temperaturas entre 0 e 10°C e, no local de venda/retalho, o produto deve estar entre 0 e 12°C. A congelação pode ser efetuada a temperaturas entre -1°C e os -18 °C, por longos períodos. No que concerne à rotulagem, para além da informação obrigatória legalmente exigida, deve figurar na rotulagem indicação DOP e respetivo símbolo e a referência ao Organismo de certificação (Figura 8). As fases de fabrico deste tipo de queijo estão representadas na Figura 9.



**Figura 8** - Selos que devem constar nos Rótulos dos queijos da Beira Baixa DOP.

Fonte: [Produtos Tradicionais Portugueses - DOP - Denominação de Origem Protegida \(Produtos agrícolas e géneros alimentícios\) \(dgadr.gov.pt\)](http://produtos.tradicionais.pt).



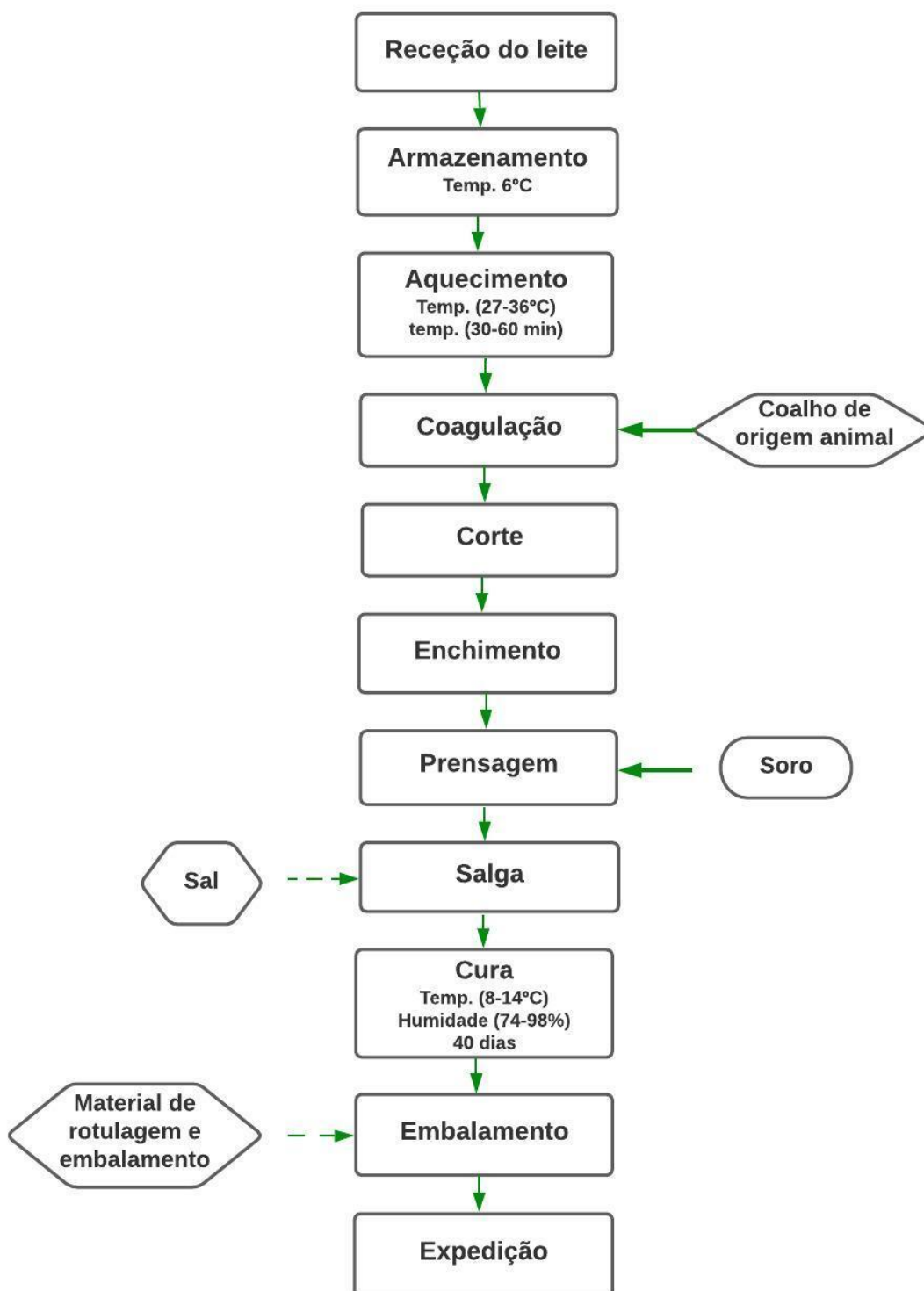


Figura 9 - Fases de produção do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP.  
FONTE: Adaptado de Caderno de Especificações - Queijos da Beira Baixa DOP (2016).

## 4. Material e métodos

### 4.1. Amostragem

Para cumprir com os objetivos estipulados, foram realizadas análises microbiológicas a amostras de Queijo da Beira Baixa DOP – Tipo Amarelo e a amostras de leite cru de cabra e ovelha. Após a recolha de amostras de leite cru e de queijo, foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do CATAA em condições de refrigeração (caixas isotérmicas com termoacumuladores). As amostras de queijo, apresentavam-se embrulhadas em papel vegetal e/ou saco de plástico. As análises foram realizadas imediatamente após a sua receção. As amostras analisadas foram recolhidas num horizonte temporal de junho de 2019 a junho de 2021, não tendo havido uma periodicidade regular. As amostras de leite e queijo foram recolhidas num produtor de Queijo da Beira Baixa. No total, foram recolhidas 31 amostras de leite cru (30 de ovelha e 1 de cabra) utilizado para o fabrico de Queijos DOP da Beira Baixa e 20 Queijos (Tabela 13 e 14).

**Tabela 13 - Características das amostras de leite cru recolhidas para análise.**

Data de recolha	Tipo de leite	Mês de recolha	Época	Nº
06/12/2019	Ovelha	12	Inverno	10
20/12/2019	Ovelha	12		
10/01/2020	Ovelha	1		
24/01/2020	Ovelha	1		
07/02/2020	Ovelha	2		
21/02/2020	Ovelha	2		
18/12/2020	Ovelha	12		
08/01/2021	Ovelha	1		
22/01/2021	Ovelha	1		
26/02/2021	Ovelha	2		
06/03/2020	Ovelha	3	Primavera	7
18/05/2020	Ovelha	5		
26/03/2021	Ovelha	3		
09/04/2021	Ovelha	4		
30/04/2021	Ovelha	4		
14/05/2021	Ovelha	5		
28/05/2021	Ovelha	5	Verão	7
14/06/2019	Ovelha	6		
12/07/2019	Ovelha	7		
12/07/2019	Cabra	7		
09/08/2019	Ovelha	8		
01/06/2020	Ovelha	6		
15/06/2020	Ovelha	6		
25/06/2021	Ovelha	6	Outono	7
11/10/2019	Ovelha	10		
08/11/2019	Ovelha	11		
22/11/2019	Ovelha	11		
02/10/2020	Ovelha	10		
16/10/2020	Ovelha	10		
30/10/2020	Ovelha	10		
13/11/2020	Ovelha	11		
<b>Total de amostras de leite analisadas</b>			<b>31</b>	

Tabela 14 - Características das amostras de queijo curado recolhidas para análise.

Data de recolha	Mês de recolha	Época	Nº	Total de amostras
20/12/2019	12	Inverno	5	20
24/01/2020	1			
21/02/2020	2			
08/01/2021	1			
26/02/2021	2			
18/05/2020	5	Primavera	5	
16/03/2021	3			
30/04/2021	4			
04/05/2021	5			
28/05/2021	5			
14/06/2019	6	Verão	5	
12/07/2019	7			
09/08/2019	8			
15/06/2020	6			
25/06/2021	6			
01/10/2019	10	Outono	5	
25/10/2019	10			
22/11/2019	11			
30/10/2020	10			
27/11/2020	11			

## 4.2. Análises microbiológicas em amostras de leite cru e de queijo

Para a caracterização da microbiota de leite cru utilizado no fabrico de Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, para além dos mesófilos que estão legislados (Regulamento (CE) N.º 1662/2006), foram efetuadas contagens (UFC/mL) de microrganismos psicotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, leveduras e bolores, de acordo com as metodologias indicadas na Tabela 15. Seguindo as instruções da ISO 6887-1 (1999) e ISO 6887-5 (2010), foi feita a preparação da suspensão inicial e das diluições decimais sucessivas.

Tabela 15 - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de leite cru.

Parâmetros microbiológicos	Métodos	Meio de cultura	Inoculação	Incubação
Mesófilos	ISO 4833-1:2013	PCA	Incorporação	30 °C; 72±3h
Psicotróficos	ISO 8552:2004	PCA	Incorporação	21°C; 22h
<i>Pseudomonas</i> spp.	ISO 11059:2009	PPA	Espalhamento	25 °C; 48±2h
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	VRBL	Incorporação dupla camada	37 °C; 24±2h
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva	ISO 16649-2:2001	TBX	Incorporação	44 °C; 18-24h
Leveduras e bolores ( $a_w > 0,95$ )	ISO 21527-1:2008	DRBC	Espalhamento	25 °C; 2-5 dias

A caracterização da microbiota de Queijo da Beira Baixa DOP - tipo Amarelo, foi realizada à massa à semelhança do descrito por Choi et al. (2020). Para esta caracterização, efetuou-se a contagem de UFC/g de bactérias lácticas, microrganismos psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positiva (previsto no Regulamento (CE) n.º

2073/2005), leveduras, bolores. Nas amostras de queijo, dado que se trata de um produto final, e seguindo os critérios de segurança alimentar definidos no Regulamento (CE) n.º 2073/2005, efetuou-se ainda a pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 g (ISO 6579-1:2017) e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25 g (ISO 11290-1:2017). Na Tabela 16 apresentam-se os métodos, meios de cultura, técnicas de inoculação e condições de incubação para as análises efetuadas na massa do queijo. Nas contagens, procedeu-se à validação das leituras efetuadas nas diluições sucessivas e nos ensaios em paralelo (ISO 14461-2:2005) e efetuaram-se os cálculos (ISO 7218:2007), sendo os resultados expressos em UFC/mL para a matriz leite e em UFC/g para o queijo.

**Tabela 16** - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de queijo.

<b>Parâmetros microbiológicos</b>	<b>Métodos</b>	<b>Meio de Cultura</b>	<b>Inoculação</b>	<b>Incubação</b>
Bactérias Lácticas	ISO 15214:1998	<b>MRS</b>	Incorporação	30 °C; 72±3h
Psicrotróficos	ISO 17410:2001	<b>PCA</b>	Incorporação	6,5 °C; 10dias
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2017	<b>VRBG</b>	Incorporação dupla camada	37 °C; 24±2h
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	<b>VRBL</b>	Incorporação dupla camada	37 °C; 24±2h
<i>Escherichia coli</i> β-glucuronidase positiva	ISO 16649-2:2001	<b>TBX</b>	Incorporação	44 °C; 18-24h
Estafilococos coagulase positiva	ISO 6888-2:1999/ Amd 1:2003	<b>BP+RPF</b>	Incorporação	35 °C; 18-24h (+24h)
Leveduras e bolores ( $a_w < 0,95$ )	ISO 21527-1:2008	<b>DG18</b>	Espalhamento	25 °C; 5-7 dias

É de referir que as análises aos parâmetros microbiológicos, bactérias coliformes e *E. coli*, foram realizadas em menor número, uma vez que só começaram a ser realizadas a partir de agosto de 2019.

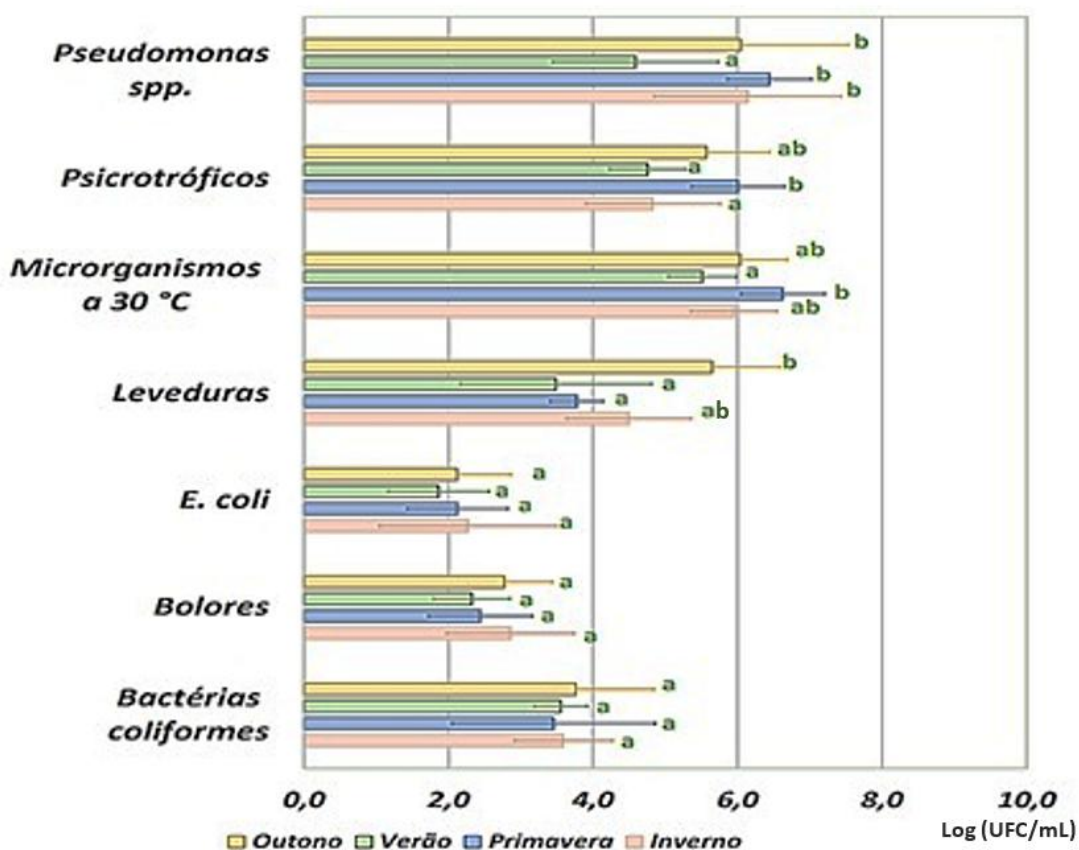
### 4.3. Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS Statistics 21. As contagens foram transformadas em log, foram calculadas médias, desvios-padrão e realizou-se testes não paramétricos nomeadamente o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes com um nível de significância de 5%.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Qualidade microbiológica do leite cru e efeito da época de produção.

Do total das amostras de leite analisadas neste estudo (n=31), 96,7% correspondem a leite cru de ovelha. Foi analisada apenas uma amostra de leite cru de cabra. A Figura 10 mostra os valores médios de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E. coli*, leveduras e bolores das amostras de leite cru de ovelha e cabra, recolhidas nas diferentes épocas do Ano (inverno, primavera, verão e outono).



**Figura 10** - Contagens microbianas no leite (31 amostras), em que cada estação são expressas como valores médios  $\pm$  desvio-padrão para cada microrganismo, letras diferentes dentro de cada grupo microbiano são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com os testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Kruskal-Wallis.

O leite no verão apresentou valores médios para as contagens dos referidos microrganismos estatisticamente inferiores aos das restantes épocas, à exceção das bactérias coliformes (3,5 Log UFC/mL).

Além disso, os resultados mostram uma clara predominância de *Pseudomonas* spp, psicrotróficos e mesófilos na primavera.

De acordo com diferentes autores, mudanças sazonais na composição do leite, influenciam não só rendimento do queijo, como a qualidade microbiológica do leite (Barron *et al.*, 2001). Tal como já era

esperado, após revisão bibliográfica, as contagens microbiológicas no leite apresentaram alta variabilidade. Os valores médios para as contagens dos referidos microrganismos, deferiram significativamente com a época, à exceção dos bolores, *E. coli* e das bactérias coliformes (Tabela 17).

**Tabela 17** - Influência sazonal nas contagens microbianas (Log UFC/mL) nas amostras de leite analisadas.

Grupo Microbiológico / Época	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<i>Pseudomonas</i> spp.	6,1±1,3 <sup>b</sup>	6,4±0,6 <sup>b</sup>	4,6±1,2 <sup>a</sup>	6,0±1,5 <sup>b</sup>
Psicrotróficos	4,8±0,9 <sup>a</sup>	6,0±0,7 <sup>b</sup>	4,8±0,5 <sup>a</sup>	5,6±0,9 <sup>ab</sup>
Mesófilos	6,0±0,6 <sup>ab</sup>	6,6±0,6 <sup>b</sup>	5,5±0,5 <sup>a</sup>	6,0±0,7 <sup>ab</sup>
Leveduras	4,5±0,9 <sup>ab</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	3,5±1,3 <sup>a</sup>	5,7±0,9 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	2,3±1,2 <sup>a</sup>	2,1±0,7 <sup>a</sup>	1,9±0,7 <sup>a</sup>	2,1±0,7 <sup>a</sup>
Bolores	2,9±0,9 <sup>a</sup>	2,4±0,7 <sup>a</sup>	2,3±0,5 <sup>a</sup>	2,8±0,7 <sup>a</sup>
Bactérias coliformes	3,6±0,7 <sup>a</sup>	3,5±1,4 <sup>a</sup>	3,6±0,4 <sup>a</sup>	3,8±1,1 <sup>a</sup>

As contagens microbianas em cada estação são expressas como valores médios±desvio padrão para cada microrganismo. Letras diferentes dentro de cada grupo microbiano são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com os testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Kruskal-Wallis.

O leite no verão apresentou valores médios das contagens de *Pseudomonas* spp. (4,6 Log UFC/mL) estatisticamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos leites analisados nas restantes épocas, à semelhança dos resultados obtidos por Vega (1996) citado por Barron *et al.* (2001).

À semelhança de *Pseudomonas* spp. os leites analisados no verão apresentaram valores médios das contagens de psicrotróficos (4,8 Log UFC/mL) inferiores aos leites analisados na primavera e no outono, tendo-se verificado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre verão e a primavera e inverno e primavera. Sendo estes um dos principais indicadores de qualidade do leite (Chambers, 2002; Perin *et al.*, 2018), estes resultados parecem sugerir que, para estas amostras, o leite no verão apresentou melhor qualidade. Das 31 amostras de leite analisadas, 77% apresentaram contagens de psicrotróficos inferiores ao valor recomendado por McSweeney (2007) (6 Log UFC/mL).

Fotou *et al.* (2011) observou, em 240 amostras de leite cru de ovelha, valores de psicrotróficos que variaram entre 2,7 e 4,7 Log UFC/mL, resultados semelhantes foram observados, em 61 amostras de leite cru de cabra por Yamazi *et al.* (2013) (4,1 Log UFC/mL), os valores obtidos nas amostras deste trabalho são superiores aos observados por estes autores.

No que concerne a *Pseudomonas* spp., o estudo realizado por Fotou *et al.* (2011) em leite cru de ovelha, relatou que todas as 240 amostras analisados no seu trabalho apresentaram contagens inferiores ao limite de quantificação, mas Montel *et al.* (2014), observou em amostras de leite de ovelha e cabra, valores de *Pseudomonas* spp. que variaram entre 2,0 e 4,7 Log UFC/mL. Resultados semelhantes foram obtidos por Sanjuan *et al.* (2003), em 16 amostras de leite cru ovino, reportando um valor médio de 4,1 Log UFC/mL. Comparando com os resultados observados por estes autores, as médias das contagens de *Pseudomonas* spp. no verão (4,6 Log UFC/mL), outono (6,0 Log UFC/mL), primavera (6,4 Log UFC/mL) e inverno (6,1 Log UFC/mL) estão acima desses valores.

A refrigeração adequada do leite é fundamental para controlar o desenvolvimento de psicrotróficos e *Pseudomonas* spp. (D'Amico *et al.*, 2008). Embora se tenha verificado na recolha que o leite se encontrava refrigerado a 4 °C em conformidade com o previsto no Regulamento (CE) n.º 1662/2006, que dita que o leite deve ser arrefecido a uma temperatura igual ou inferior a 8°C no caso de recolha diária, ou 6 °C, se a recolha não for diária, não conseguimos ter informação sobre há quanto tempo o leite tinha sido recolhido. Dado que a maioria das explorações de leite da região é de pequena

dimensão, podemos suspeitar que o leite recolhido não seja do dia, fator este que pode ter contribuindo para uma elevada contagem de *Pseudomonas*.

A frequência de recolha de leites mais alargada, combinado com as temperaturas de refrigeração baixas, reforça o pressuposto de que um longo intervalo de tempo entre a ordenha e a utilização do leite aumenta a possibilidade de contaminação do mesmo, permitindo o desenvolvimento de psicrotóxicos e de *Pseudomonas* spp. em leite cru (D'Amico *et al.*, 2008).

Relativamente aos valores obtidos nas contagens médias de mesófilos nas diferentes épocas, verificou-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o verão (5,5 Log UFC/mL) e a primavera (6,6 Log UFC/mL), à semelhança dos resultados observados por Veja (1996) citado por (Barron *et al.*, 2001), tendo este também observado valores mais baixos em junho (6,6 Log UFC/mL), mês que corresponde à época de verão no presente trabalho. As médias das contagens variaram entre 5,0 e 6,6 Log UFC/mL, com valores superiores aos encontrados por outros autores em leite cru de ovelha, cabra (4,2-5,4 Log UFC/mL) (D'Amico *et al.*, 2008; D'Amico e Donnelly, 2010). Sendo os microrganismos mesófilos indicadores de qualidade do leite, refletindo as condições de higiene a que este esteve sujeito (Perin *et al.*, 2018; Saraiva *et al.*, 2019), podemos considerar que as amostras de leite cru analisadas têm qualidade questionável de acordo com as recomendações para o leite cru (Grupo 4 – Alimentos ou seus componentes contendo flora específica ( $10^6 - \leq 10^7$ ) (Tabela 10). Das 31 amostras analisadas, apenas 45% apresentava qualidade microbiológica satisfatória ( $\leq 5,7$  Log UFC/mL), em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1662/2006. Embora este critério seja apenas aplicado aos produtores (média ao longo de um período de dois meses, com pelo menos duas colheitas mensais) referimos aqui este critério de forma a ter um valor de referência para avaliação do leite. A contaminação do leite cru pode ocorrer em diferentes etapas, através do contato com o animal e com o equipamento, se as condições de higiene forem deficientes (Martins, 2001; Quigley *et al.*, 2013). A realização de algumas práticas (deficiente ou ausência de higiene da superfície dos tetos, como equipamentos, utensílios de ordenha e o uso de água não tratada), são alguns dos fatores que podem, de alguma forma, ter provocado contagens superiores ao limite exposto no Regulamento (CE) n.º 1662/2006 ( $\leq 5,7$  Log UFC/mL).

No que concerne à quantificação de bactérias coliformes, o leite cru analisado não apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), entre estações. Resultados semelhantes foram obtidos por Veja (1996) citado por (Barron *et al.*, 2001). Os valores médios das contagens de coliformes no leite cru são superiores à média obtida por Sanjuan *et al.* (2003) (2,3 Log UFC/mL), mas semelhantes aos resultados obtidos por Pisano *et al.* (2006) (3,5 Log UFC/mL) quando analisou o leite cru de ovelha utilizado no fabrico de Queijo Fiore Sardo DOP. Diversos autores referem que contagens superiores a 2 Log UFC/mL para coliformes são indicadoras de práticas de higiene inadequadas, contaminação da água utilizada ou presença de mastites no rebanho (McSweeney, 2007; D'Amico e Donnelly, 2010).

Relativamente aos valores obtidos nas contagens médias de *E. coli*, não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas diferentes épocas. Os valores observados neste trabalho (1,9- 2,3 Log UFC/mL) são superiores aos reportados por Sanjuan *et al.* (2003) (0,45 Log UFC/mL). De acordo, com os “Valores Guia” do INSA, os leites analisados têm qualidade questionável. A presença de *E. coli* está muitas vezes associada à presença de mastites no efetivo leiteiro, sendo uma possível fonte de contaminação do leite. Outra possível fonte é a ausência de limpeza dos úberes antes de iniciar a ordenha, (Chambers, 2002; McSweeney, 2007; McSweeney *et al.*, 2017; Perin *et al.*, 2018).

À semelhança das bactérias coliformes e *E. coli*, a média das contagens no leite cru para bolores não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Os valores médios variaram entre 2,3 e 2,9 Log UFC/mL. Segundo Quigley *et al.* (2013), as contagens de bolores tendem a estar presentes em contagens inferiores às das leveduras, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo, tendo-se verificado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das contagens entre o verão-outono (3,5-5,7 Log UFC/mL) e primavera-outono (3,8- 5,7 Log UFC/mL).

## 5.2. Qualidade microbiológica do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP e efeito da época de produção

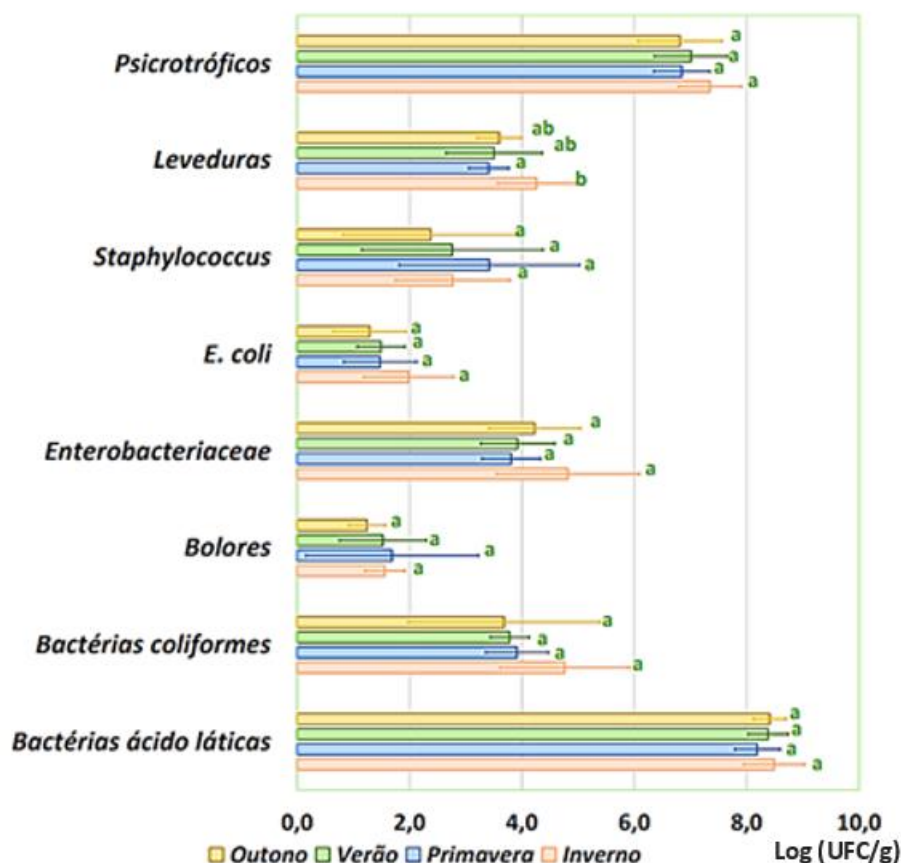
Os queijos de leite cru podem ser veículos potenciais de microrganismos e constituir um risco para o consumidor. No Regulamento (CE) n.º 2073/2005, está prevista a quantificação de estafilococos coagulase positiva e as pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Tabelas 8 e 9). Neste trabalho para avaliar a qualidade do Queijo Amarelo da Beira Baixa, para além dos parâmetros previstos por este regulamento foram também incluídas contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrótróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E. coli* β-glucuronidase positiva, leveduras, bolores e estafilococos, à semelhança da metodologia utilizada por outros autores (Freitas *et al.*, 1996; Tavaría e Malcata 1998; Tavaría e Malcata, 2000; Picon *et al.*, 2006; Pisano *et al.*, 2006; Tavaría *et al.*, 2006). A Tabela 18 reúne os valores médios e desvios-padrão da contagem de estafilococos coagulase positiva, que constitui um critério de higiene dos processos e resultados das pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* no Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP analisados neste trabalho.

**Tabela 18** - Valores médios e desvios-padrão das contagens de estafilococos coagulase positiva, e resultados das pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* nos Queijos Amarelos da Beira Baixa DOP.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<i>Estafilococos</i> coagulase positiva (Log UFC/g)	2,8±1,0	3,4±1,6	2,8±1,6	2,4±1,6
<i>Salmonella</i> spp.	<b>Ausência em 25 g (n=20)</b>			
<i>Listeria monocytogenes</i>				

De acordo com os resultados apresentados na tabela 18, as amostras de queijo analisadas não excedem o limite imposto para estafilococos coagulase positiva, estando em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005. Neste Regulamento está prevista a contagem de estafilococos coagulase positiva em queijo fabricado com leite cru, “durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”. Está regulamentado que caso sejam observados valores superiores a 5 Log UFC/g, o lote de queijo deve ser testado para enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, importa referir que o Regulamento refere a recolha de cinco amostras de queijo dentro do mesmo lote, não se tendo cumprido com este pressuposto. Relativamente às pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (critérios de segurança dos géneros alimentícios) em todas as amostras de queijo analisadas observou-se ausência em 25 g. O cumprimento dos critérios regulamentados assegura que os queijos analisados neste trabalho não contêm microrganismos, nem as suas toxinas, em quantidades que ofereçam risco à saúde humana, assegurando desta forma a proteção do consumidor. A Figura 11 reúne os valores médios e desvios-padrão das contagens efetuadas na massa do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP em estudo nas diferentes épocas do ano.





**Figura 11-** Contagens microbianas no queijo Amarelo da Beira Baixa dop (20 amostras), em que cada estação são expressas como valores médios  $\pm$  desvio-padrão para cada microrganismo, letras diferentes dentro de cada grupo microbiano são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com os testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Kruskal-Wallis.

Fazendo uma apreciação global dos resultados observados, podemos concluir que as contagens de bactérias lácticas, enterobactérias e leveduras apresentam valores similares a outros estudos anteriores. As contagens de bactérias lácticas apresentaram valores médios de 8,2 e 8,5 Log UFC/g, em conformidade com resultados obtidos por Tavarina e Malcata (1998) e Tavarina *et al.* (2006) (7-9 Log UFC/g). Para enterobactérias, o valor médio das contagens foi de 3,8 a 4,8 Log UFC/g. Autores como Freitas *et al.* (1996), Tavarina e Malcata (1998), Tavarina e Malcata (2000), Pintado *et al.* (2008), reportaram contagens médias compreendidas entre os 3 e >8 Log UFC/g.

As leveduras, apresentaram valores médios de 3,4 e 4,3 Log UFC/g, em conformidade com os resultados de outros autores para a mesma tipologia de queijo (Queijo Fiore Sardo DOP, Queijo da Beira Baixa DOP- Tipo Picante e Terrincho DOP), para os quais variaram entre <1 e 7 Log UFC/g (Freitas *et al.*, 1996; Pisano *et al.*, 2006; Pintado *et al.* 2008). Os bolores apresentaram valores médios de 1,2 e 1,7 Log UFC/g e os psicrotróficos valores médios entre os 6,8 e 7,4 Log UFC/g. Relativamente à quantificação de bactérias coliformes, obtiveram-se contagens médias compreendidas entre 3,7 e 4,8 Log UFC/g. Estes valores foram superiores aos observados por Pisano *et al.* (2006), em Queijo Fiore Sardo DOP (2,9 Log UFC/g), produzido em Itália.

Para contagem de *E. coli*, a Food Standards Scotland (2018), recomenda um limite higiênico de 2 Log UFC/g. No nosso trabalho obtiveram-se contagens médias compreendidas entre 1,3 e 2,0 Log UFC/g, cumprindo assim o limite recomendado.

Considerando os parâmetros analisados neste trabalho, os microrganismos predominantes na massa dos queijos foram as bactérias lácticas, seguidas de microrganismos psicrótróficos, enterobactérias e bactérias coliformes. Verificam-se, maiores contagens no inverno e menores contagens na primavera. Relativamente à média das contagens de estafilococos, leveduras e bolores, observaram-se maiores contagens na primavera e menor contagem no outono, à exceção das leveduras que tiveram maior contagem no inverno e menor contagem na primavera. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (Figueiredo *et al.*, 2015; Bonetta *et al.*, 2008; Tapia, 2018). Num estudo feito por Tapia (2018), a três produtores durante duas épocas de produção (seca e chuvosa), observou-se diferenças entre estações, em que a estação chuvosa estava associada a uma maior diversidade bacteriana. Resultados semelhantes foram também observados no leite e no Queijo Artesanal de Minas do Serro em diferentes meses. No leite e nos queijos foram observadas maiores contagens de coliformes em janeiro e novembro, os quais apresentavam maior índice pluviométrico (Figueiredo *et al.*, 2015). Embora no nosso estudo não se tenham verificado diferenças significativas das médias das contagens entre épocas tanto nos leites como nos queijos para bactérias coliformes, à semelhança deste autor, obtivemos valores médios de coliformes superiores no outono (no leite) e no inverno (nos queijos). No caso das leveduras, não se verificaram diferenças significativas entre épocas no leite, no entanto no queijo houve diferenças significativas  $p < 0,05$  entre o inverno e a primavera (4,3 – 3,4 Log UFC/g) (Tabela 19).

**Tabela 19** - Influência sazonal nas contagens microbianas (Log UFC/g) nas amostras de Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP analisadas.

Grupo Microbiológico / Época	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Psicrótróficos	7,4±0,6 <sup>a</sup>	6,9±0,5 <sup>a</sup>	7,0±0,7 <sup>a</sup>	6,8±0,8 <sup>a</sup>
Leveduras	4,3±0,7 <sup>b</sup>	3,4±0,4 <sup>a</sup>	3,5±0,9 <sup>ab</sup>	3,6±0,4 <sup>ab</sup>
Estafilococos	2,8±1,0 <sup>a</sup>	3,4±1,6 <sup>a</sup>	2,8±1,6 <sup>a</sup>	2,4±1,6 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	2,0±0,8 <sup>a</sup>	1,5±0,7 <sup>a</sup>	1,5±0,4 <sup>a</sup>	1,3±0,7 <sup>a</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,8±1,3 <sup>a</sup>	3,8±0,5 <sup>a</sup>	3,9±0,7 <sup>a</sup>	4,2±0,8 <sup>a</sup>
Bolores	1,6±0,4 <sup>a</sup>	1,7±1,5 <sup>a</sup>	1,5±0,8 <sup>a</sup>	1,2±0,3 <sup>a</sup>
Bactérias coliformes	4,8±1,2 <sup>a</sup>	3,9±0,6 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	3,7±1,7 <sup>a</sup>
Bactérias lácticas mesófilas	8,5±0,5 <sup>a</sup>	8,2±0,4 <sup>a</sup>	8,4±0,4 <sup>a</sup>	8,4±0,3 <sup>a</sup>

As contagens microbianas em cada estação são expressas como valores médios±desvio padrão para cada microrganismo. Letras diferentes dentro de cada grupo microbiano são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com os testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Kruskal-Wallis.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Bonetta *et al.* (2008), segundo estes autores, a época de produção parece influenciar a qualidade do queijo, reportando um efeito sazonal significativo na contagem de mesófilos, bactérias lácticas e fungos (inverno < verão < primavera,  $p < 0,05$ ), nas amostras de queijo Robiola di Roccaverano (queijo italiano feito de leite cru de cabra com Denominação de Origem Protegida). De acordo com o mesmo estudo, também houve diferenças significativas entre as estações do ano para os microrganismos do grupo dos coliformes (inverno < primavera < verão).

Verificou-se que tanto no leite como no queijo as bactérias coliformes e as leveduras encontram-se em maior número nas épocas de outono e inverno. O índice pluviométrico registado nestas alturas do ano, podem contribuir para a presença destes microrganismos, no entanto, não nos podemos esquecer que existem inúmeros fatores que podem condicionar a qualidade do leite e do queijo.

## 6. Conclusão

Com o objetivo de determinar a qualidade do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP e verificar a influência da estação do ano na sua qualidade microbiológica, foram analisadas 31 amostras de leite cru (30 de ovelha e 1 de cabra) e 20 amostras de queijos. As amostras foram recolhidas e analisadas entre junho de 2019 e junho de 2021. No leite, foram feitas contagens de mesófilos (parâmetro referido no regulamento (CE) n.º 1662/2006), psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E. coli*. β-glucunosidade positiva, leveduras e bolores. No queijo, foram feitas contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E. coli*. β-glucunosidade positiva, leveduras, bolores e estafilococos coagulase positiva (previsto no Regulamento (CE) n.º 1441/2007), bem como a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados deste trabalho demonstram que relativamente aos mesófilos (indicador de qualidade no leite), os leites analisados apresentam qualidade microbiológica insatisfatória.

As médias das contagens por época foram superiores ao limite legal em vigor (5,7 Log UFC/mL). Embora este critério só possa ser aplicado ao produtor, e os leites analisados sejam de um conjunto de produtores, os resultados demonstram a necessidade de melhoria da qualidade microbiológica do leite cru produzido.

Para os restantes parâmetros microbiológicos analisados, foram obtidas contagens médias para *Pseudomonas* spp. de 6,1 Log UFC/mL (inverno), 6,4 Log UFC/mL (primavera), 4,6 Log UFC/mL (verão) e 6,0 Log UFC/mL (outono), tendo-se verificado no verão valores médios das contagens de *Pseudomonas* spp., (4,6 Log UFC/mL), estatisticamente inferiores ( $p < 0,05$ ), aos leites analisados nas restantes épocas.

Para os psicrotróficos, foram obtidas contagens médias de 4,8 Log UFC/mL no inverno, 6,0 Log UFC/mL na primavera, 4,8 Log UFC/mL no verão e 5,6 Log UFC/mL no outono. À semelhança do que se observou para *Pseudomonas* spp., os leites analisados no verão apresentaram valores médios das contagens de psicrotróficos (4,8 Log UFC/mL), inferiores aos leites analisados na primavera e no outono, tendo-se verificado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o verão < primavera e inverno < primavera. Os valores observados estão de acordo com o recomendado por McSweeney (2007), ou seja, devem ser inferiores a 6 Log UFC/mL.

Relativamente à contagem de bolores e leveduras, obtiveram-se contagens médias de bolores (inverno < outono < primavera < verão), inferiores às contagens de leveduras (outono < inverno < primavera < verão), verificando-se apenas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na contagem de leveduras entre as médias das contagens do verão < outono (3,5 – 5,7 Log UFC/mL) e a primavera < outono (3,8 – 5,7 Log UFC/mL).

No que concerne à contagem de bactérias coliformes e *Escherichia coli*, não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as quatro estações. Os resultados obtidos, que excedem o limite higiénico recomendado de 2 Log UFC/mL, indicam a necessidade de adoção de boas práticas de higiene por forma a garantir uma melhoria na qualidade higiénica do leite.

Os resultados nas determinações microbiológicas realizadas às amostras de Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, relativamente aos parâmetros do Regulamento (CE) n.º 2073/2005, indicam uma conformidade no que diz respeito às pesquisas de *Salmonella* spp. (ausência em 25 g), e de *Listeria monocytogenes* (ausência em 25 g). Em relação à quantificação de estafilococos positiva, observaram-se contagens inferiores ao limite superior legislado (5 Log UFC/g).

De um modo geral, as contagens médias dos diferentes grupos microbianos no queijo, à exceção dos bolores e dos estafilococos coagulase positiva, são superiores no inverno do que nas restantes estações do ano.

As quantificações de bactérias lácticas, *enterobacteriaceae* e leveduras apresentaram valores semelhantes aos resultados de outros autores. As bactérias lácticas obtiveram-se contagens superiores no inverno>outono>verão>primavera, não se tendo verificado diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre as diferentes épocas. Em relação às bactérias coliformes, embora se tenham obtido contagens médias superiores no inverno>primavera>verão>outono, não se verificaram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre épocas. Relativamente à média das contagens de *Escherichia coli*, obtiveram-se contagens superiores no inverno, nas diferentes épocas, no entanto sem significância estatística.

À semelhança do leite, obtiveram-se contagens de leveduras superiores às contagens de bolores. Para os bolores obtiveram-se contagens superiores na primavera (1,5 Log UFC/g), não se tendo verificado diferenças significativas entre as diferentes épocas. Já em relação à quantificação de leveduras, verificou-se diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre o inverno>primavera (4,3 -3,4 Log/UFC/g) respetivamente.

Para as médias das contagens de psicotróficos e enterobactérias, também não se verificaram diferenças significativas ( $p<0,05$ ), tendo-se obtido contagens superiores no inverno (7,4 e 4,8 Log UFC/g), respetivamente.

De um modo geral, podemos concluir que tanto no leite como no queijo o grupo predominante são os psicotróficos. Estes resultados demonstram a necessidade de melhoria da qualidade do leite e conseqüentemente do queijo.

Em suma, a realização deste trabalho permitiu um melhor conhecimento acerca do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, bem como da matéria-prima utilizada na sua produção. Este estudo teve como principal limitação a baixa representatividade de amostras, constituindo assim apenas um estudo preliminar, que carece de mais investigação futuramente.

## 7. Referências bibliográficas

- AESBUC (2003). Segurança alimentar – Queijos Tradicionais. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica.
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, C. M., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2018). Characterization of bacterial communities in Mexican artisanal raw milk “bola de ocosingo” cheese by high-throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2598.
- Alves, A. C. F. O. S. (2020). Fatores de risco e prevenção da colonização e infecção por *Enterobacteriaceas* Resistentes a Carbapenemes (Doctoral dissertation).
- Alves, L. M. C., do Amaral, L. A., do Rosário Corrêa, M., e Sales, S. S. (2009). Qualidade Microbiológica do Leite cru e de Queijo de Coalho Comercializados Informalmente na Cidade de São Luís -Má. *Pesquisa em foco*,17(2).
- Ângelo, F. F., Ribeiro, C. D. S., Oliveira, L. D., Araujo, T. F. D., e Cardarelli, H. R. (2014). Bactérias psicrotóricas em leite cru refrigerado. *R. cient. eletr. Med. Vet.*, 1-14.
- APDA - Bactérias Coliformes. 2012a.
- APQDCB: Associação de Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco (2016). Queijos da Beira Baixa DOP. Caderno de Especificações. P. 1-26. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt>.
- Arango, O., e Castillo, M. (2018). A method for the inline measurement of milk gel firmness using an optical sensor. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3910-3917. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13595>.
- Araújo-Rodrigues, H., Tavora, F.K., dos Santos, M.T.P.G., Alvarenga, N. and Pintado, M. M. 2020. A review on microbiological and technological aspects of serpa pdo cheese: an ovine raw milk cheese. *International Dairy Journal*. 100, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104561>.
- Awad, S., Ahmed, N., Soda, M. E. 2007. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chemistry*. 104: 1192-1199.
- 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.
- Baião, A. (2007). Acompanhamento do Processo de Fabrico do Queijo Serpa. Relatório de trabalho de fim de licenciatura em Engenharia Técnica Alimentar. Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Beja. Beja. 30 pp.
- Bandeira, P. R. A. D. S. (2010). *Desenvolvimento de um queijo fresco de cabra com contribuição da fermentação láctica* (Doctoral dissertation, ISA).
- Baptista, T. D. F. B. L. (2014). *Contagem de Staphylococcus coagulase positiva em queijo de ovelha com diferentes tempos de cura* (Doctoral dissertation).
- Barreira, A. C. R. (2008). *Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beira Baixa com base em contagem de células somáticas* (Doctoral dissertation, Universidade Tecnica de Lisboa (Portugal)).
- Barron, L. J. R., de Labastida, E. F., Perea, S., Chávarri, F., de Vega, C., Vicente, M. S., ... & Renobales, M. (2001). Seasonal changes in the composition of bulk raw ewe's milk used for Idiazabal cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 11(10), 771-778.

Barros, A. C. B. B. (2012). *Avaliação da aptidão tecnológica do leite de ovelha para o fabrico de Queijo de Azeitão DOP* (Doctoral dissertation, Universidade Tecnica de Lisboa (Portugal)).

Batista, E. N. B. (2017). *Caracterização microbiológica e físico-química de queijos tradicionais Portugueses com Denominação de Origem Protegida* (Doctoral dissertation).

Batista, E. N. B. (2018). *Caracterização microbiológica e físico-química de queijos tradicionais Portugueses com Denominação de Origem Protegida* (Doctoral dissertation).

Bencini, R., e Pulina, G. (1997). A qualidade do leite de ovelha: uma revisão. *Revista australiana de agricultura experimental*, 37(4), 485-504.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M.. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11 (4-7):259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).

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.

Bjorkroth, J. & Koort, J. (2011). Lactic acid bacteria: Taxonomy and Biodiversity. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Sciences*. Academic Press, London, pp. 45-48.

Bonetta, S., Coisson, J. D., Barile, D., Bonetta, S., Travaglia, F., Piana, G., ... & Arlorio, M. (2008). Caracterização microbiológica e química de um queijo típico italiano: Robiola di Roccaverano. *Revista de Química Agrícola e Alimentar*, 56(16), 7223-7230.

Bore, E., & Langsrud, S. (2005). Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *Journal of applied microbiology*, 98(1), 96-105.

Brom, R., de Jong, A., van Engelen, E., Heuvelink, A. and Vellema, P. (2020). Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. *Small Ruminant Research*. 189, 106123. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106123>.

CA: Codex Alimentarius (2011). *Milk and Milk Products*, second edition. World Health Organization, Rome.

Canada, J. S. B. (1998). Caracterização dos Queijos Tradicionais Portugueses. *Via láctea* 12: 32- 34.

Chambers, J. (2002). The microbiology of raw milk. In *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, 3rd ed.. New York, 22-68. <https://doi.org/10.1201/b17915>.

Choi, J., Lee, S.I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Do Ha, S., Kim, J.H. and Park, S.H. (2020). Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *Journal of Dairy Science*. 103 (5): 4026- 4042. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>.

Cogan, T.M.,Barbosa, M.,Beauvier, E.,Bianchi-Salvadori, B.,Coconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomes, J.,Gomez,R., Kalantzopoulos, G.,Ledda, A.,Medina, M.,Rea, M.C. e RODRIGUEZ, e.,(1997). Characterisation of the lactic acid bacteria in artesanal dairy products. *J.Dairy Res.*64:409-421.

Comissão Europeia. 1996. Regulamento (CE) N.º 1107/96 da Comissão de 12 de junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17 o do Regulamento (CEE) N.º 2081/92 do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*.

Comissão Europeia. 2005. Regulamento (CE) N.º 2073/2005 Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial Da União Europeia. Comissão Europeia. 2005.

Comissão Europeia. 2006. Regulamento (CE) N.º 1662/2006 da Comissão de 6 de novembro de 2006 que altera o Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial Da União Europeia. Comissão Europeia. 2007.

Comissão Europeia. 2021. Regulamento (EU) 2021/245 de Comissão de 11 de fevereiro de 2021, que aprova uma alteração não menor do caderno de especificações de uma denominação inscrita no registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegidas [«Queijos da Beira Baixa (Queijo de Castelo Branco, Queijo Amarelo da Beira Baixa, Queijo Picante da Beira Baixa)» (DOP)].

Correia, A. M. G. G. 2014. Presença de bactérias coliformes e *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos ciprofloxacina e estreptomicina em água natural. Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto.

Correia, J. L. (2015). *Avaliação microbiológica de refeições servidas em Cantina Universitária* (Doctoral dissertation).

da Câmara Flores, A. M. P., & de Melo, C. B. (2015). Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 37(1), 65-72.

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

D'Amico, D.J., Groves, E. and Donnelly, C.W. (2008). Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection*. 71 (8): 1580-1589. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1580>.

Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Lee, M. R., Ougham, H. J., & Humphreys, M. O. (2003). Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proceedings of the Nutrition society*, 62(2), 329-336.

Dias, J. R. D. L. (2016). *Controlo da qualidade do leite numa empresa de lacticínios* (Doctoral dissertation).

Dias, V., R. Faustino, A. R. Chiché, A. (2008). Fabrico de Queijo. Disciplina Tecnologia de Leites do curso Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja.

DRAP-Centro-Direção Regional da Agricultura e Pescas do Centro (2023). Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP. Ficha do Produto. Disponível em : [https://ptqc.drappc.gov.pt/documentos/queijo\\_amarelo\\_beira\\_baixa.pdf](https://ptqc.drappc.gov.pt/documentos/queijo_amarelo_beira_baixa.pdf)

Duru, I. C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., . . . Smolander, O.-P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 10-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017>

Fagan, E. P., Tamanini, R., Fagnani, R., Beloti, V., Barros, M. D. A. F., & Jobim, C. C. (2008). Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, 29(3), 651. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n3p651>

Farkye, N. Y. (2014). Cheese: microbiology of cheesemaking and maturation. *Encyclopedia of Food Microbiology*: 2nd Ed.. Elsevier. 395–401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00059-8>.

Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., ... & Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International journal of food microbiology*, 162(2), 190-212.

Fernandes, M. A. M., Monteiro, A. L. G., de Barros, C. S., Fernandes, S. R., da Silva, M. G. B., & Ferreira, F. S. (2009). Métodos para avaliação de produção de leite ovino. *Current Agricultural Science and Technology*, 15(1-4).

Fernandes, F. D. C. M. (2017). *Escherichia coli em queijos produzidos com leite cru* (Doctoral dissertation).

Ferreira, A. R. (2017). *Diversidade genética de isolados bacterianos de Pseudomonas e géneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo* (Doctoral dissertation).

Ferreira, J. M. C. N. (2014). *Genes enterotoxigénicos e resistência a antibióticos em isolados de Staphylococcus coagulase positiva de origem alimentar* (Doctoral dissertation).

Figueiredo, J. M., Fernandes, V., Limpo, v., Gonçalves, L., Pedrosa, F., & Diniz, C. (2001). Guia técnico - Indústria de lacticínios. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisboa. In.

Food Standards Scotland. 2018. Review of controls for pathogen risks in scottish artisan cheeses made from unpasteurized milk. Acedido em novembro de 2022. [https://www.foodstandards.gov.scot/downloads/FSS\\_2017\\_015\\_-\\_Control\\_of\\_pathogens\\_in\\_unpasteurised\\_milk\\_cheese\\_-\\_Final\\_report\\_v\\_4.7\\_-\\_20th\\_November\\_2018\\_.pdf](https://www.foodstandards.gov.scot/downloads/FSS_2017_015_-_Control_of_pathogens_in_unpasteurised_milk_cheese_-_Final_report_v_4.7_-_20th_November_2018_.pdf)

Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R. and Stradiotto, K.. 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*. 69 (2): 213–225. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005459>.

Fotou, K., Tzora, A., Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Avgeris, I., Bezirtzoglou, E., Akrida-Demertzi, K. and Demertzis, P.G. (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe*. 17 (6): 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.002>.

Fox, P.; McSweeney, P.; Cogan, T.; Guinee, T. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishers, USA.

Franzetti, L., & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of microbiology*, 57, 39-47.

Freire, T. T., Tolentino, A. L., Ferreira, B. K. O., & dos Santos, T. M. (2021). Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. *Research, Society and Development*, 10(11), e513101119964-e513101119964.

Freitas, A. C., Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (2000). Review: technological and organoléptica issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International* 6, 351-370.

Freitas, A.C., Pais, C., Malcata, F.X. and Hogg, T.A. (1996). Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*. 59 (2): 155–160. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.155>.

Freitas, C. and Malcata, F.X.. (2000). Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the iberian peninsula from ovine and caprine milks.



Journal of Dairy Science. 83 (3): 584–602. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74918-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74918-6).

Furtado, C. M. (2016). *Estudo dos fatores que influenciam a qualidade do leite para certificação do produto na ilha de São Miguel, Açores* (Doctoral dissertation).

Gaglio, R., Todaro, M., Scatassa, M.L., Franciosi, E., Corona, O., Mancuso, I., et al. (2019). Transformation of raw ewes' milk applying "Grana" type pressed cheese technology: Development of extra-hard "Gran Ovino" cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 307, 108277

Ganchinho, J. P. P. (2020). *Monitorização das condições ambientais na cura de queijo de cabra de leite cru* (Doctoral dissertation).

Geng, X. L., van den Berg, F. W., Bager, A. N., & Ipsen, R. (2011). Visualização dinâmica e microestrutura de sinerese de queijo coalho durante o tratamento mecânico. *Revista internacional de laticínios*, 21(9), 711-717.

Gomes, S. (2012). *Qualidade do leite cru de ovinos da área geográfica de produção do Queijo Terrincho DOP (Trás-os-Montes): dos factores de produção animal à qualidade do queijo* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária).

Gomes, S., Mendonça, Á., & Fernandes, A. (2016). Qualidade do leite cru de ovinos da área geográfica de produção do queijo terrincho DOP (Trás-os-Montes).

Gonçalves, M., Furtado, R., Coelho, A., Correia, C. B., & Valente, A. (2017). Presença de *Listeria monocytogenes* em queijos de pasta mole da região a sul do Tejo. *Portuguese Journal of Public Health*, 35(1), 37-43.

Guessas, B., M. Kihal. 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology* vol. 3 (6), p. 339-342.

IPMA, (2023). <https://www.ipma.pt>, acessado em 26 de fevereiro de 2023.

ISO 707 / IDF 50. 2008. Milk and milk products — Guidance on sampling. International Organization for Standardization.

ISO 4833-1. 2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization.

ISO 4832. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique. International Organization for Standardization.

ISO 6579-1. 2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.. International Organization for Standardization.

ISO 6887-1. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization.

ISO 6887-5. 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. International Organization for Standardization.

ISO 6888-2/Amd 1:2003. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other

species) — Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. AMENDMENT 1: Inclusion of precision data. International Organization for Standardization.

ISO 7218. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations. International Organization for Standardization.

ISO 8552. 2004. Milk — Estimation of psychrotrophic microorganisms — Colony-count technique at 21 °C (Rapid method). International Organization for Standardization.

ISO 11059 / IDF 225. 2009. Milk and milk products — Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp. International Organization for Standardization.

ISO 11290-1. 2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. AMENDMENT 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. International Organization for Standardization.

ISO 14461-2. 2005. Milk and milk products — Quality control in microbiological laboratories — Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps. International Organization for Standardization.

ISO 15214. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization.

ISO 16649-2. 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive *E. coli* — Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide. 93 International Organization for Standardization.

ISO 17410. 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms. International Organization for Standardization.

ISO 21527-1. 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. International Organization for Standardization.

ISO 21527-2. 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. International Organization for Standardization.

ISO 21528-2. 2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization.

Jensen, H.; Grmmer, s.; Naterstad, K.; Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 153, p. 216–222.

Kheadr, E. E., Vuillemand, J. C., & El-Deeb, S. A. (2003). Impact of liposomeencapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International*, 36(3), 241-252. doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00166-7).

Kongo, J. M. and Malcata, F. X. (2016). Cheese: chemistry and microbiology. *Encyclopedia of Food and Health*, 1st ed. Elsevier. 735-740. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00135-5>.

Kornacki, J., Gurtler, J. and Stawick, B. (2015). Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators, *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th edition. Eds. Y. Salfinger and M.L. Tortorello. Ch. 9. American Public Health Association, Washington DC.

- Kumaresan, G., Annalvilli, R., & Sivakumar, K. (2007). Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Science Research*, 3, 1383-1387.
- 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.
- Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5644-5650.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Wright, A. V. (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4ª edição. Taylor & Francis Group, LLB. USA.
- Lauzin, A., Bérubé, A., Britten, M., & Pouliot, Y. (2019). Effect of pH adjustment on the composition and rennet-gelation properties of milk concentrates made from ultrafiltration and reverse osmosis. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3939-3946. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15902> .
- Leira, M. H., Botelho, H. A., Barreto, B. B., Botelho, J. H. V., & Pessoa, G. O. (2018). Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. *Pubvet*, 12, 172.
- Leitner, G., Merin, U., & Silanikove, N. (2004). Alterações na composição do leite afetadas pela mastite subclínica em cabras. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1719-1726.
- Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, 23(36), 186-205.
- Lourenço, A. I. P. (2015). *Estudo de Listeria monocytogenes e E. coli produtora da toxina Shiga (STEC) em leite cru de pequenos ruminantes e avaliação da qualidade microbiológica de queijo curado* (Doctoral dissertation).
- Lyndgaard, C. B., Engelsen, S. B., & van den Berg, F. W. J. (2012). Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 345-352. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.07.029>.
- Manuelian, C. L., Boselli, C., Vigolo, V., Giangolini, G. and De Marchi, M. (2020). Effects of animal versus vegetal rennet on milk coagulation traits in mediterranean buffalo bulk milk. *Journal of Dairy Science*. 103 (6): 4958-4964. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17208>.
- Martino, J., Lopes, A., Lourenço, F. (2021). Modelo Técnico económico – Queijo da Beira Baixa DOP. Produção Rural.
- Martins, A.P.L. (1999). Fatores tecnológicos e qualidade do queijo de leite de pequenos ruminantes. Jornadas sobre qualidade e segurança alimentar dos produtos dos pequenos ruminantes. SPOC-Vol. 10, nº 1. p. 13-40. Direção Geral de Veterinária, Lisboa.
- Martins, A.P.L. (2001). Factores tecnológicos e qualidade do queijo de leite de pequenos ruminantes. In *Colectânea Da SPOC*. 10: 13-40.
- Martins, A. P. L., Vasconcelos, M. M. (2003). A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos. *Pastagens e Forragens*, 24(25), 15-33.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S. G., Seo, J., Koblansky, A., ... & Ghosh, S. (2012). A mouse model of Salmonella typhi infection. *Cell*, 151(3), 590-602.
- Medici, M.; Vinderola, C. G.; Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J*, 14 (7), 611-618.

Metz, M., Sheehan, J. and Feng, P.C.H. (2019). Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses – a literature review. *Food Microbiology*. 85, 103283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283>.

McSweeney, P.L.H. 2007. *Cheese Problems Solved*. Cambridge. Woodhead Publishing.

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter P.D., and Everett, D.W. (2017). *Cheese chemistry, physics & microbiology*. 4th ed. Cambridge. Woodhead Publishing.

Monteiro, S. D. E. A. (2016). *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa* (Doctoral dissertation).

Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. and Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177: 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.

Morais, L. V. (2019). *Estudo dos defeitos de cor em queijos de ovelha e cabra laborados com leite cru* (Doctoral dissertation).

Moreira, C. P. M. (2011). *Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos. Estudo de caso: Queijos da Beira Interior*. Universidade Técnica de Lisboa

Novotná, L., Kuchtlík, J., Ustová, K., Zapletal, D., & Filip [cbreve] ík, R. (2009). Effects of lactation stage and parity on milk yield, composition and properties of organic sheep milk. *Journal of Applied Animal Research*, 36(1), 71-76.

Nunes, Ó. S. (2018). *Análise do Ciclo de Vida de Produtos Lácteos – Caso de Estudo do Queijo da Beira Baixa* (Doctoral dissertation).

Oliveira, M e Carvalho, M. (2016). *Políticas Públicas para a Agricultura pós 2020 – Atlas do VIII Congresso da Associação Portuguesa de Economia Agrária*. Escola Superior Agrária de Coimbra. Edição Associação Portuguesa de Economia Agrária.

Ordóñez, J. A., Rodríguez, M. I., Álvares, L. F., Sanz, M. L., Minguillón, G. D., Perales, L., Cortecero, M. D. (2005). *Tecnología de Alimentos volume 2. Alimentos de Origen Animal*, Artmed editora S. A., Porto Alegre.

Ozcan, T., Yaslioglu, E., Kilic, I., & Simsek, E. (2015). The influence of the season and milking time on the properties and the fatty acid composition of the milk in different dairy cattle farms. *Mljekarstvo/Dairy*, 65(1).

Ozturkoglu-Budak, S., & de Vries, R. P. (2017). Queijos de leite amadurecidos e crus: Produção, riscos e benefícios para a saúde humana. *Laticínios em saúde humana e doenças ao longo da vida*, 353-361.

Pacheco, F. P., & Galindo, A. B. (2010). Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microbial Biotechnol*, 2, 1205-1216.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, 68(1-2), 88-113.

Paruch, A. M., T. Maehlum. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators* 23, p.140-142

P. Desmarchelier, N. Fegan. (2011). Pathogens in Milk | Escherichia coli. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Pages 60-66. ISBN 9780123744074. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00393-9>.

Paula, J. C. J., Carvalho, A. F., & Furtado, M. M. (2009). Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Revista do Instituto de Lacticínios Cândido Tostes, 64(367), 19-19-25.

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.

Perin, L.M., Pereira, J.G., Bersot, L.S. and Nero, L.A. (2019). The microbiology of raw milk. Raw Milk. 45-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00003-1>.

Picon, A., Garde, S., Ávila, M. and Nuñez, M. (2016). Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. International Dairy Journal. 58: 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.010>.

Pinho, O., Ferreira, I., & Ferreira, M. (1999). Queijos Portugueses com Denominação de Origem Protegida.

Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L., Pintado, M.M., Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. International Dairy Journal. 18 (6): 631-640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.021>.

Pintado, C. M., Grant, K. A., Halford-Maw, R., Hampton, M. D., Ferreira, M. A., & McLauchlin, J. (2009). Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5), 569-575.

Pisano, M.B., Fadda, M.E., Deplano, M., Corda, A. and Cosentino, S. (2006). Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional sardinian cheese made from ewe's milk. International Journal of Dairy Technology. 59 (3): 171-179. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00260.x>.

Ponciano, R. J. F. (2010). Avaliação da Qualidade Higiênica da Produção de Leite de Pequenos Ruminantes e de Queijo Fresco da Região do Rabaçal. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. In.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews. 37 (5): 664-698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.

Ramos, J. M. D. S. (2009). *Efeito da refrigeração em leite de ovelha-evolução da flora microbiana e efeito na aptidão tecnológica para queijo* (Doctoral dissertation).

Rebello, A. G. (1994). Queijaria Racional: realidade dos nossos queijos tradicionais. Ministério da Agricultura. 301pp. Lisboa.

Reis, K. T. M. G., de Santana, E. H. W., & Roig, S. M. (2013). Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: revisão. *Journal of Health Sciences*.

Reis, P.J.M. and Malcata, F.X. 2011. Current state of portuguese dairy products from ovine and caprine milks. Small Ruminant Research. 101 (1-3): 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.032>.

Rodrigues, B. M. (2021). Validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva* e auditoria interna.

Sá, V., F. e Barbosa, M. (1990). O leite e os seus Produtos. Nova Coleção Técnica Agrária, 5ª ED., Clássica Editora, Lisboa.

Sánchez-Gamboa, C., Hicks-Pérez, L., Gutiérrez-Méndez, N., Heredia, N., García, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. *Foods*, 7(9), 153.

Sanjuan, S., Rúa, J. and García-Armesto, M.R. (2003). Microbial flora of technological interest in raw ovine milk during 6°C storage. *International Journal of Dairy Technology*. 56 (3): 143–148. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00091.x>.

Santana, E. H. W., Beloti, V., Müller, E. E., de Aguiar Ferreira, M., de Moraes, L. B., Pereira, M. S., & Gusmão, V. V. (2004). Contaminação do leite em diferentes pontos da produção leiteira: ii) microrganismos mesófilos, psicrotróficos e proteolíticos. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), 349-358.

Santapaola, J., Maldonado, S., & Medina, J. L. (2013). NaCl diffusion kinetics in dry salting of goat cheese. *Journal of Food Engineering*, 118(2), 172-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.028>.

Santos, M. V., & Fonseca, L. F. L. D. (2001). Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. *Revista Higiene Alimentar*, 15(82), 13-19.

SARAIVA, Margarida et al. Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: Valores-guia. 2019.

Serol, P. C. L. (2017). *Caracterização microbiológica quantitativa e qualitativa de queijo Serpa: Estudo prévio para o desenvolvimento de "Starters" autóctones* (Doctoral dissertation).

Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A., & Muscio, A. (2004). Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research*, 51(3), 251-259.

Sezer, B., Bilge, G., Eseller, K. E., Berberoglu, H., & Boyaci, I. H. (2019). Laser induced breakdown spectroscopy based diffusion modelling in cheese matrix. *Journal of Food Engineering*, 263, 320-325. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.007>.

Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). Pseudomonas aeruginosa biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, 42, 1-7.

Stulova, I., Adamberg, S., Kriščiunaite, T., Kampura, M., Blank, L., & Laht, T. M. (2010). Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Letters in applied microbiology*, 51(6), 683-690. Citado por Ângelo, F. F., Ribeiro, C. D. S., Oliveira, L. D., Araujo, T. F. D., & Cardarelli, H. R. (2014). Bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado. *R. cient. eletr. Med. Vet.*, 1-14.

Tavaria, F.K. and Malcata, F.X. (1998). Microbiological characterization of Serra Da Estrela cheese throughout its appellation d'origine protegee region. *Journal of Food Protection*. 61 (5): 601–607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.601>.

Tavaria, F.K. and Malcata, F.X. (2000). On the microbiology of Serra Da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiology*. 17 (3): 293– 304. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0315>.

Tavaria, F.K., Reis, P.J.M. and Malcata, F.X. (2006). Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*. 16 (8): 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.08.010>.

Torkar, K. G. and Vengušt, A.. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin m1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*. 19 (6): 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.008>.

Trmčić, A., Chauhan, K. H. U. S. H. B. O. O., Kent, D. J., Ralyea, R. D., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. A. R. T. I. N. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6105-6120.

Vasconcelos, M. (1990). Estudo do queijo de Azeitão. Melhoramento da tecnologia tradicional e sua influência nas características do queijo. Ph.D. Tesis. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Nacional de Tecnologia dos Produtos Agrários, Núcleo de Tecnologia do Leite e Derivados. Lisboa, Portugal.

Vega, M. C. (1996). Contribución a la caracterización microbiológica de la leche de oveja para la producción de Queso Idiazabal. *Vitoria-Gasteiz: Tesis de Grado, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Eus kal Herriko Unibertsitatea*.(citado por Barron et al., 2001)

Veiga, S. N. T. (2012). *Qualidade microbiológica e físico-química de queijos comercializados em Portugal* (Doctoral dissertation, Universidade Tecnica de Lisboa (Portugal)).

Velázquez-Varela, J., Castro-Giraldez, M., Cuibus, L., Tomas-Egea, J. A., Socaciu, C., & Fito, P. J. (2018). Study of the cheese salting process by dielectric properties at microwave frequencies. *Journal of Food Engineering*, 224, 121-128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.024>.

Viljoen, B. C., Knox, A. M., De Jager, P. H., & Lourens-Hattingh, A. (2003). Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. *Food Technol. Biotechnol.*, 41, 291-297.

von Wright, A. & Axelsson, L. (2019). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In G.. Vinderola, A.C. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5<sup>a</sup> ed., pp. 1-16). Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis.

Xavier, L. D. S., Lima, E. D. O., & Souza, E. L. D. (2006). Presença de leveduras em produtos lácteos: uma abordagem especial para significância de leveduras em queijos. *Hig. aliment*, 61-64. **Presença de leveduras em produtos lácteos: uma abordagem especial para significância de leveduras em queijos | Hig. aliment;20(139): 61-64, mar. 2006. | VETINDEX (bvsalud.org)**

Yamazi, A. K., Moreira, T. S., Cavicchioli, V. Q., Burin, R.C.K. and Nero, L.A. (2013). Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. *Small Ruminant Research*. 113: 205-210. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.02.004


Yoon, Y., Lee, S. and Choi, K.H. ( 2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*. 63: 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>.





# Apêndice

Poster apresentado no Congresso Dare2Change – Innovation Drive Agrifood Business, no Centro de Congressos do Super Bock Arena no Porto



Food Development & Production

## Quality of Beira Baixa “Queijo Amarelo” (Yellow Cheese) P.D.O. - Effect of Production Season on Microbiological Quality

Rodrigues, A.<sup>1</sup>, Riscado, A.<sup>1</sup>, Silveira, A.<sup>1</sup>, Pintado, C.<sup>1</sup>, Pintado, C.M.S.<sup>2,3</sup>, Brandão, L.<sup>1,4</sup>, Cristóvão, M.<sup>1</sup>, Espírito Santo, C.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>CATAA – Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar, Zona Industrial de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal;

<sup>2</sup> Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal;


<sup>3</sup> CERNAS -IPCB (project UIDB/00681/2020 funding by FCT), Castelo Branco, 6001-909 Castelo Branco, Portugal;

<sup>4</sup> Centre for Functional Ecology, University of Coimbra, 300-456 Coimbra, Portugal.


\*ana.rodrigues@cataa.pt

### Introduction




Seasons have been reportedly associated to changes in milk and cheese microbiological quality



The Beira Baixa PDO “Amarelo” cheese is made with either a combination of raw sheep’s and goat’s milk or only sheep’s



How does the microbiological quality of “Amarelo” PDO cheese changes throughout the year?

### Methods

Table 1 – Microbiological parameters and associated methods for milk counts

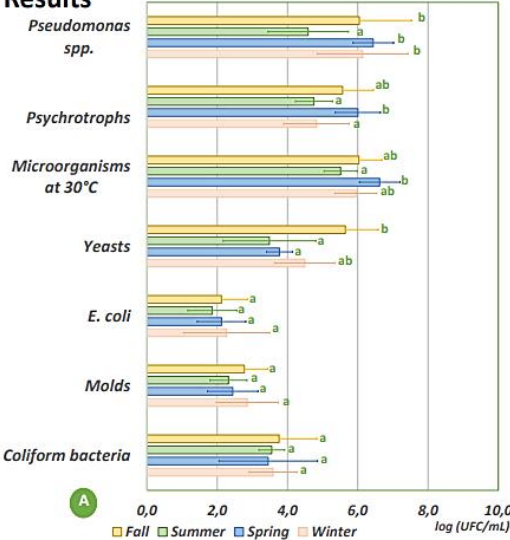
Microbiological parameters	Methods
Microorganisms at 30°C	ISO 4833-1:2013
Psychrotrophs	ISO 8552:2004
<i>Pseudomonas spp.</i>	ISO 11059:2009
Coliform Bacteria	ISO 4832:2006
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positive	ISO 16649-2:2001
Yeasts and Molds ( $a_w > 0,95$ )	ISO 21527-1:2008

Table 2 – Microbiological parameters and associated methods for cheese counts

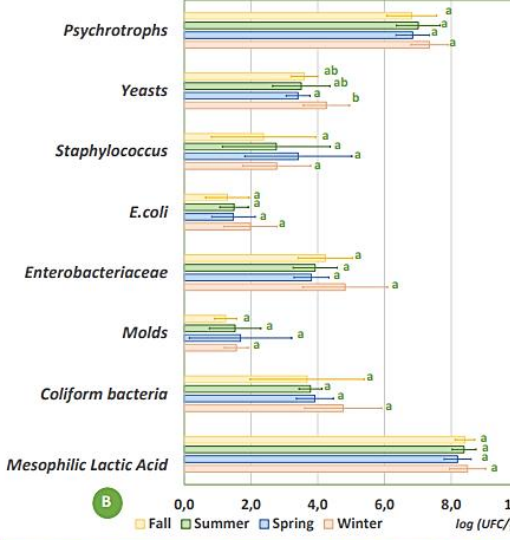
Microbiological parameters	Methods
Mesophilic Lactic Acid	ISO 15214:1998
Psychrotrophs	ISO 17410:2001
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2017
Coliform Bacteria	ISO 4832:2006
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positive	ISO 16649-2:2001
<i>Staphylococcus positive coagulase</i>	ISO 6888-2:1999/ Amd 1:2003
Yeasts and Molds ( $a_w > 0,95$ )	ISO 21527-1:2008
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290 -1:2017
<i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579 -1:2017

### Results

**A - Milk (31 samples)**



**B - Cheese (20 samples)**










Salmonella spp. and Listeria monocytogenes (safety criteria for foodstuffs) in all cheese samples analyzed, absence was observed in 25 g.

**Figure 1** - Means standard deviation A- Milk (31 samples); B- Cheese (20 samples). Microbial counts at each season are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation for each microorganism. Different letters within each microbial group are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the non-parametric tests, namely the Kruskal-Wallis test.

### Conclusion

- In general, we conclude that in milk and cheese, coliform bacteria and yeasts are predominant in the autumn and winter seasons. In milk, mean counts differed significantly  $p < 0.05$  with season, except for molds, *E. coli* and coliform bacteria.
- In cheese, yeast count means are significantly lower in spring as compared to winter,  $p < 0.05$ . On the other hand, in milk samples, yeasts are significantly higher in fall as compared to all other seasons,  $p < 0.05$ .
- The analyzed cheeses in this study do not contain pathogen microorganisms, meeting safety regulations and ensuring the safety of consumers.

Organized by:

References : <https://www.dgadr.gov.pt>, acedido em 26 de fevereiro de 2023.