



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de ovelha com diferentes tempos de cura

Mestrado em Inovação e Produção na Qualidade Alimentar

Teresa de Fátima Brida Lopes Baptista

Orientadores

Dr^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Fevereiro, 2014



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo de ovelha com diferentes tempos de cura

Teresa de Fátima Brida Lopes Baptista

Orientadores

Dr^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

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 Produção na Qualidade Alimentar, realizada sob orientação da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Fevereiro, 2014

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus dois filhos, pelo tempo e atenção que não pude prestar durante a realização deste trabalho. Com amor,

João Maria e José Pedro.

Agradecimentos

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela disponibilidade de ceder o laboratório de microbiologia e todo o material necessário para a elaboração dos ensaios.

À Doutora Cristina Santos Pintado, minha orientadora, pelo seu apoio, dedicação, incansável motivação e amizade que sempre demonstrou durante estes meses de trabalho.

À Helena e Manuela Goulão, técnicas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela ajuda na realização dos ensaios laboratoriais. Sem elas não teria sido possível a realização deste trabalho e pelo carinho que sempre demonstraram.

Ao Centro de Apoio Tecnológico Agro - Alimentar (CATAA), especialmente à Doutora Cristina Miguel, responsável pelo Laboratório de Análises Microbiológicas, pela ajuda, disponibilidade de meios e compreensão na realização de uma parte das análises laboratoriais.

À Doutora Catarina Gavinhos, pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstrou na ajuda da análise de dados e tratamento estatístico do trabalho.

Ao Sr. Amadeu Neto e ao Sr. Joaquim Duarte Alves e respetivas famílias, pelo fornecimento gratuito dos queijos e leites. Agradeço também a amabilidade, sem eles era impossível a realização deste trabalho.

À minha família, os meus filhos, meu marido, pais e sogros, que me deram força e empenho para conseguir alcançar os meus objetivos, a realização deste trabalho.

E a todos aqueles que de algum modo contribuíram para que este trabalho fosse possível.

A todos do fundo do coração o meu grande obrigado!

Resumo

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo fabricado com leite cru de ovelha ao longo do período de maturação, bem como avaliar a altura em que o seu número é mais elevado. Neste sentido, o trabalho foi dividido em três fases: 1) Análise de dados relativos à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos laborados com leite cru de 31 produtores e com diferentes tempos de cura; 2) Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 45 dias de maturação em dois lotes de queijo naturalmente contaminados; 3) Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado.

Da análise de resultados a 445 amostras de queijo feito com leite cru de 31 produtores, 75% apresentava um número de *Staphylococcus* coagulase positiva inferiores a 10^4 UFC/g e, portanto, apresenta qualidade satisfatória, ao passo que 25% apresentava valores superiores aos limites legais constantes no Regulamento (CE) nº 1441/2007. Por outro lado, a maior percentagem de amostras de queijo com resultados $\geq 10^4$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva, encontra-se ao primeiro dia de cura, seguido do terceiro dia de cura.

Relativamente ao estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva nos dois lotes de queijo naturalmente contaminados, verificou-se um pico máximo nos primeiros dias de fabrico (no dia 0 e no dia 3), decrescendo gradualmente ao longo do período de cura, mantendo no entanto contagens elevadas até ao dia 5 e dia 7. A partir do 18º dia os queijos analisados apresentavam contagens inferiores a 10^2 UFC/g. Verificou-se que a contaminação inicial do leite cru usado para o fabrico do queijo é um fator determinante que condiciona o valor máximo de *Staphylococcus* coagulase positiva atingido nos primeiros dias de maturação. Uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/ml permitiu que a contagem destes microrganismos nunca ultrapassasse o limite máximo legal ($M=10^5$ UFC/g), ao longo dos 45 dias de cura no produtor Z.

No estudo levado a cabo com o lote de queijos artificialmente contaminado, observou-se um pico ao 3º dia de cura, que corresponde à contagem mais elevada de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g), com um valor de $1,1 \times 10^5$ UFC/g. Podemos ainda constatar que, partindo de um leite com um valor de *Staphylococcus aureus* igual a $4,1 \times 10^2$ UFC/ml, o número deste microrganismo no queijo ultrapassou rapidamente o limite $m=10^4$ UFC/g e o limite $M=10^5$ UFC/g, respetivamente no 1º e no 3º dia de cura.

Palavras chave

Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva; Queijo feito com leite cru; Maturação do queijo; Segurança alimentar.

Abstract

The present work aimed to study the evolution of the number of coagulase positive *Staphylococcus* in cheese made from raw sheep's milk during the ripening time, as well as evaluating the time when your number is higher. In this sense, the work was divided into three stages: 1) Analysis of data on the count of coagulase positive *Staphylococcus* in cheeses made with raw milk from 31 producers and with different ripening times; 2) Study the evolution of the number of coagulase positive *Staphylococcus* over 45 days of aging in two batches of naturally contaminated cheeses; 3) Study the evolution of the number of coagulase positive *Staphylococcus* over 14 days of aging in a batch of artificially contaminated cheeses.

The analysis of results of 445 samples of cheese made with raw milk from 31 producers, allow us to conclude that 75% had a number of coagulase positive *Staphylococcus* less than 10^4 CFU/g and therefore presents satisfactory quality, while 25% had values above the legal limits contained in Regulation (EC) No 1441 /2007. Moreover, the largest proportion of cheese samples with results $\geq 10^4$ CFU/g of coagulase positive *Staphylococcus*, had one day of curing and three days of ripening time.

Regarding the study of the evolution of the number of coagulase positive *Staphylococcus* in two lots of naturally contaminated cheeses , there was a peak in the early days of manufacture (on day 0 and day 3), decreasing gradually over the ripening time, maintaining however high scores up to day 5 and day 7. From the 18th day the cheeses examined had counts less than 10^2 CFU/g. It was found that the contamination of raw milk used for cheese making is a factor that determines the maximum coagulase positive *Staphylococcus* in the first days of maturation. Values of coagulase positive *Staphylococcus* less than 1.0×10^2 CFU/mL allowed that the count of these microorganisms never exceed the maximum legal limit ($M = 10^5$ CFU/g) over the 45 days of ripening, in the producer Z.

In the study conducted for the batch of artificially contaminated cheeses, there was a peak on day 3 of ripening time, which is the highest score of coagulase positive *Staphylococcus* (CFU/g), with a value of 1.1×10^5 CFU/g. We can also observe that, starting from a milk with a value of *Staphylococcus aureus* equal to 4.1×10^2 CFU/mL, the number of these microorganisms in cheese quickly exceeded the limit $m = 10^4$ CFU/g and $M = 10^5$ CFU/g, respectively in 1st and 3rd day of ripening time.

Keywords

Enumeration of coagulase positive *Staphylococcus*; Raw milk cheese; Cheese ripening; Food safety.

Índice Geral

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Índice de figuras.....	VIII
Lista de tabelas.....	X
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XI
1.Introdução.....	1
2.Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Boas práticas de higiene e qualidade microbiológica do leite para o fabrico do queijo.....	2
2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	3
2.3. Intoxicações alimentares por enterotoxinas estafilocócicas.....	4
2.4. Fontes de contaminação por <i>Staphylococcus</i> durante o processo de fabrico dos queijos	8
2.5. Condições que favorecem o desenvolvimento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em leite e produtos lácteos.....	9
2.6. Produção de Queijo na região da Beira Baixa	10
2.7. Tecnologia do processo de fabrico.....	12
2.8. Parâmetros analíticos do queijo.....	15
2.8.1. Parâmetros físico-químicos.....	15
2.8.2. Parâmetros microbiológicos.....	16
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Levantamento dos dados de contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijo produzido na zona centro.....	18
3.2. Estudo da evolução do número de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ao longo de 45 dias de maturação em dois lotes de queijo naturalmente contaminados.....	19
3.2.1. Descrição dos processos de fabrico do produtor Z e S.....	19
3.2.2. Colheita de amostras.....	23

3.2.3. Preparação da amostra e das diluições.....	24
3.2.4. Procedimento para a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva – Técnica com confirmação de colónias.....	25
3.2.5. Crioconservação de culturas para posterior estudo.....	28
3.2.6. Análises físico-químicas.....	30
3.3. Estudo da evolução do número de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado.....	32
3.3.1. Produção do lote de queijos artificialmente contaminados.....	32
3.3.2. Colheita de amostras.....	33
3.3.3. Preparação da amostra e das diluições.....	33
3.3.4. Procedimento para a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva – TEMPO® Reader.....	33
3.4. Análise Estatística dos Dados.....	34
4. Apresentação e Discussão dos Resultados.....	35
4. 1. Análise de dados da contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em 31 produtores da região entre 2011 e 2013.....	35
4.2. Estudo da evolução do número de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva no Produtor S ao longo de 45 dias de maturação.....	38
4.3. Estudo da evolução do número de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva no Produtor Z ao longo de 45 dias de maturação.....	43
4.4. Estudo da evolução do número de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado.....	48
5. Conclusão.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	52
7. Anexos.....	57

Índice de figuras

Figura 1 - Peso da produção de queijo por espécie no ano 2005.....	11
Figura 2 - Produção de queijo (t) no período de 2006 a 2010.....	11
Figura 3 - Mapa com a identificação das localidades onde se obtiveram resultados de análises a <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijos.....	19
Figura 4 - Diferentes processos de fabrico dos queijos dos produtores Z e S.....	20
Figura 5 - Colheita de amostras através do uso de sonda.....	24
Figura 6 - Colónias características de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva no meio da cultura Baird Parker Agar.....	25
Figura 7 - Teste de coagulase em tubo.....	26
Figura 8 - Placa de meio Baird - Parker Agar +RPF inoculada para observação de reação da coagulase.....	27
Figura 9 - Protocolo para a crioconservação de culturas bacterianas.....	30
Figura 10 - Laboração dos queijos artificialmente contaminados.....	32
Figura 11 - Esquema relativo ao procedimento analítico para a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva usando o método TEMPO® Reader.....	34
Figura 12 -Valores de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em 445 amostras de queijo da região entre 2011 e 2013.....	36
Figura 13 - Frequência relativa da contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) em 445 amostras de queijo feito com leite cru da região, entre 2011 e 2013.....	37
Figura 14 - Frequência relativa de contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (10^4 UFC/g e $\geq 10^4$ UFC/g) em queijos com diferentes tempos de cura.....	37
Figura 15 - <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva Vs Tempo de cura, no produtor S.....	41
Figura 16 - Valores médios de percentagem de NaCl nos queijos dos produtores S e Z ao longo do tempo de maturação (45 dias).....	47

Figura 17 - Evolução do número médio (n=3) de UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo dos primeiros 14 dias de cura num lote de queijos artificialmente contaminado. A linha vermelha corresponde ao limite superior legal (10^5 UFC/g) e a linha amarela corresponde ao limite inferior legal (10^4 UFC/g), segundo o Regulamento (CE) nº1441 (2007).....49

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais bactérias responsáveis por surtos de origem alimentar e patologias associadas.....	5
Tabela 2 - Tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificadores	7
Tabela 3 – Parâmetros importantes para o desenvolvimento de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas em alimentos.....	8
Tabela 4 – Valores mínimos aproximados de atividade da água para vários microrganismos patogênicos relevantes para o queijo.....	16
Tabela 5 – Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijos produzidos pelo produtor S, ao longo de um período de maturação de 45 dias.....	39
Tabela 6 – Percentagem de NaCl e isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva crioconservados em queijos produzidos pelo produtor S.....	42
Tabela 7 – Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijos produzidos pelo produtor Z, ao longo de um período de maturação de 45 dias.....	44
Tabela 8 - Percentagem de NaCl e isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva crioconservados em queijos produzidos pelo produtor Z.....	46

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AFNOR – Association Française de Normalisation

a_w – Atividade da água

BAL - Bactérias ácido-láticas

BAM – Manual Analítico Bacteriológico

BPH – Boas práticas de higiene

CCS – Contagem de células somáticas

CATAA – Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar

cs/ml – Células somáticas/ mililitro

DL – Decreto de lei

ESACB – Escola Superior Agrária de Castelo Branco

GPP - Gabinete de Planeamento e Políticas

HR – Humidade relativa

NaCl – Cloreto de sódio

NMP – Número Mais Provável

NP – Norma Portuguesa

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PVC – Cloreto de polivinil

Reg. – Regulamento

SE – Enterotoxinas estafilocócicas

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

sd – Sem data

UFC/g – Unidades formadoras de colónias/grama

UFC/ml – Unidades formadoras de colónias/mililitro

CONTENTS

Introduction	1
Chapter I	15
Chapter II	35
Chapter III	55
Chapter IV	75
Chapter V	95
Chapter VI	115
Chapter VII	135
Chapter VIII	155
Chapter IX	175
Chapter X	195
Chapter XI	215
Chapter XII	235
Chapter XIII	255
Chapter XIV	275
Chapter XV	295
Chapter XVI	315
Chapter XVII	335
Chapter XVIII	355
Chapter XIX	375
Chapter XX	395
Chapter XXI	415
Chapter XXII	435
Chapter XXIII	455
Chapter XXIV	475
Chapter XXV	495
Chapter XXVI	515
Chapter XXVII	535
Chapter XXVIII	555
Chapter XXIX	575
Chapter XXX	595
Chapter XXXI	615
Chapter XXXII	635
Chapter XXXIII	655
Chapter XXXIV	675
Chapter XXXV	695
Chapter XXXVI	715
Chapter XXXVII	735
Chapter XXXVIII	755
Chapter XXXIX	775
Chapter XL	795
Chapter XLI	815
Chapter XLII	835
Chapter XLIII	855
Chapter XLIV	875
Chapter XLV	895
Chapter XLVI	915
Chapter XLVII	935
Chapter XLVIII	955
Chapter XLIX	975
Chapter L	995

1. Introdução

A produção de queijo a partir de leite cru é uma atividade económica de grande importância para as regiões produtoras, representando uma fonte de rendimento para muitas famílias. Com a crescente preocupação do consumidor atual no que toca à aquisição de produtos de qualidade e que sejam seguros, cresce também a necessidade de efetuar estudos que orientem os produtores no cumprimento das boas práticas de fabrico e das boas práticas de higiene. A sanidade dos rebanhos, a ordenha higiénica, o licenciamento das queijarias e uma boa definição e controlo do processo de fabrico são alguns dos aspetos chave na produção de queijo. A segurança alimentar dos queijos tradicionais depende da atitude de todos os operadores envolvidos na produção face a estes aspetos.

Os perigos microbiológicos são os que mais devem preocupar o produtor e o consumidor, uma vez que a contaminação microbiológica é a que contribui para um maior número de doenças de origem alimentar. Existem microrganismos patogénicos como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, e microrganismos indicadores do grau de higiene, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para além deste papel como indicadores, as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, e outros *Staphylococcus coagulase positiva*, são responsáveis por intoxicações alimentares. Sendo assim, é fundamental conhecer o número destes microrganismos não só no queijo mas também no leite e nas superfícies e manipuladores.

De acordo com o Regulamento (CE) nº1441 de 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios, o queijo fabricado com leite cru deverá ser analisado com vista à contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o seu número seja mais elevado. Tendo em conta que o período mínimo de maturação dos queijos fabricados com leite cru na região da Beira Baixa é de 40 dias, e tendo ainda em conta que não existe informação sustentada em estudos científicos que orientem o técnico sobre o momento adequado para a colheita de amostras de acordo com o definido no Regulamento referido acima, este trabalho teve por principal objetivo quantificar os *Staphylococcus coagulase positiva* no leite e em queijo de ovelha ao longo do período de maturação e verificar o momento em que este número é mais elevado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Boas práticas de higiene e qualidade microbiológica do leite para o fabrico do queijo

É fundamental a qualidade higiénica do leite para o consumidor dos produtos lácteos. Requer-se da parte do produtor uma compreensão de todo o sistema de produção para garantir a qualidade do leite.

Sob o ponto de vista sanitário a qualidade microbiológica do leite é importante, uma vez que pode ser veículo de transmissão de microrganismos patogénicos. Os microrganismos não patogénicos também podem comprometer a qualidade do leite, por exemplo a presença de leites ácidos está associada à presença de microrganismos que comprometem os tratamentos térmicos e alguns estão na origem de defeitos dos produtos derivados (Canada, 2008).

A contaminação do leite torna-se possível através do contacto do leite com o equipamento, as mãos do operador, a presença de bactérias no canal e exterior do teto e existência de mamites. 10% da carga microbiana inicial do leite é devido às condições das salas de ordenha, mamites, ambiente do estábulo e o canal e a pele do teto. Os restantes 90% têm origem nos equipamentos e no próprio vasilhame (Silva, 2011).

Nas explorações pecuárias e na indústria dos laticínios, para a implementação das Boas Práticas de Higiene (BPH) deve-se considerar a sanidade e higiene animal, saúde e higiene do pessoal, a higiene dos locais de trabalho, equipamentos e utensílios e a rede de frio. Devem ter controlos periódicos que permitam verificar o cumprimento das condições gerais de higiene, nomeadamente as relativas aos equipamentos e às salas de ordenha e os animais devem ser submetidos a um controlo sanitário regular. Os locais onde se procede à ordenha, armazenamento, manipulação ou arrefecimento do leite devem estar situados e construídos de forma a evitar riscos de contaminação (Canada, 2008).

As bactérias que aparecem no leite têm origem principalmente na superfície do úbere e dos tetos; no leite dos animais com mamites e nas superfícies do equipamento da ordenha, das bilhas ou dos tanques. Para que se verifiquem baixas contagens de bactérias no leite, contribuem vários fatores, como: a higiene da ordenha, particularmente a secagem dos tetos com toalha individual; a higiene do estábulo, especialmente das camas; a limpeza dos animais; a higiene do equipamento de ordenha, particularmente das tetinas e outras borrachas, do lactoduto, dos pulsadores, da linha de vácuo e do tanque de reserva de vácuo; o método de ordenha; a filtração do leite; e a limpeza do tanque de refrigeração. Para diminuir a contaminação a partir do úbere e dos tetos, devem manter-se os animais, entre as ordenhas, num local limpo (Blowey e Edmondson, 2010).

O leite deve ser colocado em local apropriado imediatamente após a ordenha. Se não for recolhido nas duas horas seguintes à ordenha, o leite deve ser arrefecido a uma temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$, no caso de recolha diária, ou a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ se a recolha não for diária. Durante o transporte para os estabelecimentos de tratamento ou transformação a temperatura do leite não deve ser superior a 10°C (Canada, 2008).

A norma comunitária, Regulamento (CE) N^o853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, rege que a indústria de laticínios não deve transformar o leite cuja contagem de microrganismos totais excedem os 100.000 UFC/mL para o leite de vaca e 1.500.000 UFC/mL para o leite de outras espécies (sem tratamento térmico), bem como para a contagem de células somáticas (CCS) que excedem os 400.000 cs/mL para o leite de vaca.

Nos termos do Regulamento (CE) N^o1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) N^o 2073/2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no caso do queijo produzido com leite cru, a contagem de estafilococos deve estar dentro dos limites definidos pelo referido regulamento sendo $n=5$, $c=2$, $m=10^4$ UFC/g e $M= 10^5$ UFC/g em que n corresponde ao número de unidades que constituem a amostra e c o número de unidades da amostra com valores entre m e M .

A água utilizada em qualquer fase do processo produtivo é indispensável que seja potável, quer nas explorações pecuárias quer no circuito de recolha quer, ainda, nas diferentes fases de transformação. A água deve ser controlada regularmente de forma a cumprir o exigido no DL n.º 306/2007 de 27 de Agosto.

2.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica (cocos), que examinada ao microscópio aparece em pares, com cadeias curtas. São Gram-positivas, catalase positiva, aero-anaeróbias facultativas (Ortega *et al.*, 2010), imóveis, não esporuladas, podendo medir entre 0,5 a 1,0 μm e sensíveis a antibióticos, tais como *lisostafina* e furanos, mas resistentes a bacitracina. Podem crescer numa gama de temperaturas entre 7 a 48 $^{\circ}\text{C}$ e em concentrações de NaCl entre 10% a 20%. Todas as estirpes de *S. aureus* são catalase positiva e oxidase negativa (European Commission, 2003).

Atualmente, existem 35 espécies de estafilococos descritas de acordo com o seu potencial para a produção de coagulase. Os estafilococos são ubíquos no ambiente e existem no ar, esgoto, água, superfícies ambientais, no Homem e outros animais (Ortega *et al.*, 2010).

O cirurgião escocês, Sir Alexander Ogston, em artigos publicados entre 1879 e 1882, mencionou pela primeira vez o termo *Staphylococcus*, onde descreveu a presença desta bactéria em pus obtido de abscessos humanos. Rosenbach, dois anos

mais tarde, relatou o crescimento da mesma bactéria em cultura pura, dando o nome *Staphylococcus aureus* às colónias de pigmentação dourada (Fonte, 2012).

Embora, normalmente o *S. aureus* seja uma bactéria inofensiva, quando na superfície do corpo humano, onde desempenha um papel útil, metabolizando produtos para a pele e, eventualmente, prevenindo a colonização da pele por patogénicos, pode causar abscessos menores da pele, tais como furúnculos e, de um modo mais grave, pode atuar como um patogénio oportunista, quando a barreira da pele é violada ou a resistência do hospedeiro é baixa (Adams e Moss, 2008).

O género *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grupos, os que apresentam uma reação coagulase positiva e os que não produzem esta enzima.

A intoxicação alimentar devido a *S. aureus* afeta o Homem cerca de 8 horas após a ingestão de alimentos contaminados e está associada a náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia (Duquenne, 2010).

Entre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais envolvida em surtos de intoxicação alimentar pela habilidade de produzir exotoxinas superantigénicas (Dingues *et al.*, 2000).

Os estafilococos são únicos na sua capacidade de se multiplicarem em alimentos com valores de atividade da água (a_w) inferiores aos normalmente considerados mínimos para outras bactérias não halófilas. O valor mínimo de a_w para o crescimento é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses microrganismos em alimentos com a_w de 0,83. O intervalo em que ocorre a produção de enterotoxinas é mais limitado, com um a_w mínimo registado de 0,86 (Wong e Bergdoll, 2002; Adams e Moss, 2008).

2.3. Intoxicações alimentares por enterotoxinas estafilocócicas

As intoxicações ou infeções são doenças de origem alimentar que resultam do consumo de alimentos contaminados com toxinas produzidas por microrganismos específicos ou pela presença de microrganismos infecciosos.

A sua sintomatologia em geral está associada a uma gastroenterite. As bactérias são a principal causa de infeções e intoxicações alimentares. Após a ingestão de um alimento contaminado, o aparecimento dos seus sintomas são muito rápidos (algumas horas), uma vez que está associado ao consumo de toxinas produzidas pelas bactérias existentes no alimento. Em geral são *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Vibrio* (Duquenne, 2010).

A quantidade de toxina e o seu poder toxinogénico, estão relacionados com o aparecimento dos sintomas de intoxicação alimentar (Bhatia e Zahoor, 2007). A manipulação indevida por parte do pessoal está relacionada com a presença de *S. aureus* nos alimentos (André *et al.*, 2008).

As toxinfecções alimentares, em alguns casos são suspeitas por sintomas clínicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais bactérias responsáveis por casos de surtos de origem alimentar e patologias associadas (Nugon-Baudon e Mollier, 2002)

Bactérias Patogênicas	Alimentos Contaminados	Duração Incubação	Frequência Toxicidade	Sintomas
<i>Listeria monocytogenes</i> , pode multiplicar-se a partir de 1°C. Vantajosa em ambientes frios em comparação com outras bactérias (4°C). Sensível ao calor	Leite; queijo; carnes; aves; frutos do mar e fumados	1 dia, várias semanas, até 2 meses	Geralmente benigno, muito grave nas mulheres grávidas, crianças e imunodeprimidos, pouco frequente (200 casos/ano). Aproximadamente 25-30% dos casos mortais	Altamente variável, dependendo do indivíduo. Por vezes despercebido (gripe falsa), com diarreia e dor abdominal. Pode provocar meningite; mulheres grávidas provoca aborto no segundo trimestre de gravidez, nascimentos prematuros
<i>Campylobacter</i> , sensível ao calor	Carnes, aves, marisco cru, água e leite	1-10 dias (a maioria entre 2-5 dias)	Benigna, exceto jovens	Dores musculares, dores de cabeça, febre, diarreia, dor abdominal, náuseas. Grave em crianças, risco de septicemia e meningite.
<i>Escherichia coli</i> , sensível ao calor	Água, carne e leite cru	3 a 9 dias	Frequentemente benigna	Gastroenterite grave e diarreia abundante
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, sensível ao calor	Especialmente carne, agrião, água e leite cru	3 a 9 dias	Grave, raros casos notificados no Japão e Estados Unidos	Os sintomas podem persistir por mais de uma semana, diarreia abundante e sangrenta, náuseas, vômitos, por vezes fatal
<i>Salmonella enteridis</i> , <i>Typhimurium</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> são as mais peigosas e sensíveis ao calor	Carnes, aves, ovos, leite cru e frutos do mar	4 a 5 horas (especialmente 24 horas)	Benigna, exceto crianças e imunodeprimidos	Dor abdominal, dor de cabeça, calafrios, febre alta, vômitos, diarreia, prostração. Possível complicação, septicemia e complicações articulares
<i>Staphylococcus aureus</i> , sensíveis ao calor	Leite, creme de queijo, carnes congeladas, carne de aves domésticas, pratos de peixe	1 a 6 horas	Benignos	Náuseas, vômitos, dor severa abdominal, diarreia e febre. Em crianças leva à desidratação devido à diarreia.
<i>Clostridium botulinum</i> , responsável pelo botulismo. Resistente ao calor, bem com as suas toxinas.	Enlatados e salsichas	8 horas	Muito grave, especialmente o tipo A e E	Afeta o sistema nervoso, dificuldade na fala e deglutição, paralisia respiratória, coma, pode levar à morte.
<i>Clostridium perfringens</i> , resistente ao calor	Alimentos mal cozinhados, especialmente carne	9 a 24 horas	Geralmente em adultos, grave em crianças, especialmente o tipo C	Diarreia, dor abdominal, em crianças o tipo C pode causar necrose

Segundo Duquenne (2010), os alimentos que estão na origem de surtos cujo agente é a bactéria *Staphylococcus aureus* são principalmente produtos lácteos (16,3%), carnes (9,7%) e ovoprodutos (8,6%). *Staphylococcus aureus* é responsável em 68% dos casos de doenças de origem alimentar associados ao consumo de produtos lácteos.

O leite cru contaminado e os produtos lácteos estão frequentemente envolvidos em intoxicações alimentares estafilocócicas (De Buyser *et al.*, 2001).

As enterotoxinas estafilocócicas são divididas em diversos tipos: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, TSST-1, SEG, SEH, SEI e SEJ e, com base nas diferenças sorológicas, a enterotoxina estafilocócica SEC é ainda subdividida em SEC1, SEC2 e SEC3 (Kenny *et al.*, 1993).

Enterotoxina A está relacionada com um maior número de casos de intoxicações alimentares por *Staphylococcus* coagulase positiva. Esta enterotoxina A pode ser veiculada pelo leite cru, leite pasteurizado e produtos lácteos. A síndrome do choque tóxico é causada mais frequentemente pela TSST-1, porém as enterotoxinas do tipo B e C também podem estar implicadas (Sá *et al.*, 2004).

As enterotoxinas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. São termoestáveis, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização (Borges *et al.*, 2008).

Através do tratamento térmico as células bacterianas dos *Staphylococcus* spp. são destruídas, mas as suas enterotoxinas permanecem ativas nos alimentos, sendo um risco potencial para a saúde pública (Costa, 2008).

As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10 e 46°C, com uma temperatura ótima a 35 - 40°C (Adams e Moss, 2008). Relativamente ao pH o *Staphylococcus* spp. é capaz de produzir enterotoxinas em meios com pH entre 4,2 e 9,3, com um ótimo de 7,0 - 7,5 (Bhatia e Zahoor, 2007).

As bactérias do género *Staphylococcus* também podem produzir uma grande variedade de toxinas extracelulares e de fatores de virulência, além das SE, destacando entre elas a Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), reconhecida como a principal causa do choque tóxico em humanos (Fagundes e Oliveira, 2004).

Além de produzirem outras toxinas, os *S. aureus* podem produzir exoenzimas e agressinas, destacando entre as toxinas a α -toxina, β -toxina, γ -toxina, δ -toxina, leucocidina, toxina epidermolítica, TSST-1, exotoxina pirogénica e as exotoxinas: coagulase, estafiloquinase, proteases, fosfolipases, lipases, DNase, hialuronidase e fosfatase (Costa, 2008).

Estirpes de algumas espécies de *Staphylococcus*, quando presentes em populações elevadas ($>10^5$ UFC/mL ou g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O_2) produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE) nos alimentos. Já foram descritos 18 tipos de enterotoxinas distintas (Tabela 2). Os tipos clássicos SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED E SEE são considerados os de maior ocorrência (Borges *et al.*, 2008).

Tabela 2- Tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e genes codificantes (Borges *et al.*, 2008)

Tipos de SE	Genes codificantes	Referência
SEA	sea	Betley e Mekalanos (1988); Becker, Roth e Peters (1998)
SEB	seb	Bergdoll, Surgala e Dark (1959); Jones e Khan (1986); Becker, Roth e Peters (1998)
SEC ₁	sec1	Borja e Bergdoll (1967); Bohach e Schievert (1987); Becker, Roth e Peters (1998)
SEC ₂	sec2	Bergdoll, Borja e Avena (1965); Avena e Bergdoll (1967);
SEC ₃	sec3	Reiser <i>et al.</i> (1984)
SED	sed	Casman <i>et al.</i> (1967); Bayles e Iandolo (1989); Becker, Roth e Peters (1998)
SEE	see	Bergdoll <i>et al.</i> (1971); Couch, Soltis e Betley (1988); Becker, Roth e Peters (1998)
SEG	seg	Betley, Borst e Resgassa (1992); Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEGV	segv	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEH	seh	Ren <i>et al.</i> (1994); Su e Wong (1995); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEI	sei	Munson <i>et al.</i> (1998); Omoe <i>et al.</i> (2002)
SEIV	seiv	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEJ	sej	Zhang, Iandolo e Stewart (1998); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEK	sek	Orwin <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEL	sel	Fitzgerald <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEM	sem	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEN	sen	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Orwin <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SENV	senv	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)
SEO	seo	Jarraud <i>et al.</i> (2001); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEP	sep	Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEQ	seq	Yarwood <i>et al.</i> (2002); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SER	ser	Omoe <i>et al.</i> (2003); Omoe <i>et al.</i> (2005)
SEU	seu	Letertre <i>et al.</i> (2003)
SEUV	seuv	Blaiotta <i>et al.</i> (2004)

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.

Os parâmetros físicos e químicos, como temperatura, pH, atividade de água (a_w), concentração de sal (NaCl) e disponibilidade de oxigênio (Tabela 3), afetam o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas (Borges *et al.*, 2008).

Tabela 3 - Parâmetros importantes para o desenvolvimento de *S.aureus* e a produção de enterotoxinas em alimentos (Borges *et al.*, 2008).

Parâmetro	Desenvolvimento		Produção de enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Variação	Ótimo
Temperatura (°C)	35 - 37	7 - 48	35 - 40	1 - 45
pH	6,0 - 7,0	4,0 - 10,0	6,0 - 7,0	4,8 - 9,0
Atividade da água	>0,99	0,83 - 0,99	0,99	0,83 - 0,99
NaCl (%)	0 - 4	0 - 20	0 - 0,5	0 - 10
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica Anaeróbica	Aeróbica (5-20% de O ₂)	Aeróbica Anaeróbica

2.4. Fontes de Contaminação por *Staphylococcus* durante o processo de fabrico dos queijos

A contaminação do queijo por *S. aureus* durante o processo de fabrico deve-se à manipulação do leite e queijo pelos produtores, ao próprio equipamento e ao meio ambiente que o envolve. Assumpção *et al.* (2003), verificou que a contaminação por *S. aureus* no queijo Prato foi provavelmente devido à elevada contagem de *S. aureus* nas mãos e antebraços dos manipuladores. Na origem desta situação deve existir uma inadequada higienização das mãos e antebraços, bem como a não utilização de luvas (Silva, 2011).

A contaminação do leite cru pelo próprio animal não pode ser negligenciada, além da contaminação do leite pelas mãos do ordenhador, seja na ordenha manual ou mecânica, e pela contaminação dos equipamentos de ordenha (tubulações, teteiras, baldes, conexões, mangueiras, tanque de refrigeração, entre outros) e do próprio ambiente da sala de ordenha (Lucheis, 2012).

O *S. aureus* é o microrganismo patogénico mais prevalente e com maior impacto económico ao nível das infeções intramamárias nos ruminantes leiteiros, com responsabilidade entre 30% a 40% dos casos de mamite (Peles *et al.*, 2007).

Quando alimentos contaminados são armazenados na proximidade de alimentos processados ou na proximidade de superfícies de trabalho, pode ocorrer contaminação (Downes e Ito, 2001). No grupo de microrganismos contaminantes incluem-se os que conferem características anormais ao produto assim como os patogénicos, ou seja, aqueles que podem provocar danos na saúde do consumidor (Noronha, 2003). A prevenção de contaminações cruzadas é bastante importante,

pois contribui para uma melhor segurança alimentar. Quando se encontram elevados números de *Staphylococcus aureus*, em alimentos processados, pode-se inferir que a higienização, o controle de temperaturas, ou ambos, não foram suficientes (Downes & Ito, 2001).

2.5. Condições que favorecem o desenvolvimento de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite e produtos lácteos.

A correlação entre a presença de um gene e a produção de enterotoxina é cerca de 70-80% e está influenciada pelas condições ambientais, tais como a temperatura, pH e atividade da água, que são importantes para o crescimento e produção de enterotoxinas. Por esta razão é necessário conhecer os fatores intrínsecos e extrínsecos que impedem o crescimento de *S. aureus* em queijo feito com leite cru (Medvedová e Valík, 2012).

O crescimento e produção de *S. aureus* e as suas enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos podem ser prevenidos ou inibidos através do tratamento térmico do leite, do uso de fermentos, do aumento da concentração de sal, da diminuição do pH e/ou do uso de temperaturas baixas de processamento e armazenamento do queijo (European Commission, 2003).

O *S. aureus* é um organismo mesófilo com temperaturas de crescimento ótimo de 37°C a 40°C, a temperatura mínima para o crescimento é cerca de 7°C. 99,6% das células são destruídas pela pasteurização a 72°C durante 15 segundos e a 72°C durante 35 segundos todas as células estão mortas. As enterotoxinas podem resistir ao processo de pasteurização do leite (Medvedová e Valík, 2012).

O leite cru ou pasteurizado é um excelente meio para o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas, se for mantido a temperaturas superiores a 10°C e a flora microbiana natural for baixa. O *S. aureus* no leite está relacionado com as mamites nos rebanhos e pode ter contagens de 10⁵ UFC/ml. No leite cru ou pasteurizado a temperatura de armazenamento do leite influencia a produção da enterotoxina. O leite é um excelente meio para o crescimento de enterotoxinas estafilocócicas, devido ao seu pH favorável, atividade da água, potencial redox, nutrientes e a temperaturas superiores a 7°C (European Commission, 2003).

S. aureus é capaz de crescer num pH de 4,0-9,8 e com um ótimo de 6-7. Os valores mínimos de pH para o crescimento são influenciados por outros fatores ambientais. O crescimento de *S. aureus* é inibido por 0,1% de ácido acético e pela presença de ácidos gordos. A inibição completa de *S. aureus* é conseguida com um pH inferior a 5,0 (Medvedová e Valík, 2012).

Uma característica que distingue o *S. aureus* de outras bactérias é a sua elevada tolerância a baixos valores de atividade da água e concentrações de NaCl até 20%.

Para o crescimento de *S. aureus* o valor mínimo da atividade da água mínima é de 0,83-0,86 (Medvedová e Valík, 2012).

O desenvolvimento de *Staphylococcus* coagulase positiva está relacionado com os diferentes tipos de queijo.

No queijo fresco a enterotoxina estafilocócica pode ser produzida quando o número de microrganismos da flora natural for baixo. Queijos com elevado número de bactérias ácido lácticas (LAB), o número de estafilococos é baixo e a produção de enterotoxinas é impedida mesmo com grandes contagens de estafilococos presentes no início do processo (10^3 UFC/ml).

Os queijos semi-curados e curados representam um meio mais favorável para o crescimento de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas, se a contagem inicial de estafilococos no leite for menor que 10^3 UFC/ml (European Commission, 2003).

2.6. Produção de Queijo na região da Beira Baixa

De acordo com a NP 1589 (1983) queijo é um produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite, ou do leite total ou parcialmente desnatado mesmo que reconstituído, assim como da nata, do leitelho e a mistura de alguns ou de todos estes produtos (incluindo lactosoro), com ou sem a adição de géneros alimentícios. É classificado de acordo com:

- i) o leite utilizado (de vaca, ovelha ou cabra),
- ii) a cura,
- iii) a textura ou consistência e
- iv) teor de matéria gorda no resíduo seco

A indústria no subsector dos queijos em 2005 encontrava-se muito suprimida, existindo empresas de grandes e pequenas dimensões, muitas delas com baixo nível de diferenciação de produção e fracos recursos tecnológicos (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2007).

Os queijos tradicionais da Beira Interior têm para a região uma importância socioeconómica elevada, devido ao número muito significativo de pequenos agricultores que os produzem (Reis *et al.*, 2003).

Um dos estrangulamentos mais importantes associados à produção de queijos artesanais em Portugal em geral, e na Beira Interior em particular, prende-se com a pequena dimensão das explorações artesanais, e o conseqüente pequeno volume de leite de pequenos ruminantes diariamente processado (Reis *et al.*, 2003).

O setor dos lacticínios em 2007 representava cerca de 11,5% da produção agrícola nacional, verificando-se uma crescente oferta de leite e produtos lácteos, bem como uma melhoria global na qualidade da matéria-prima e dos produtos transformados. A

produção de queijos de ovelha e cabra apresentava uma produção média anual de 13,6 t num número muito significativo de empresas de média/pequena dimensão. Na produção de queijo são utilizados, maioritariamente, os leites de ovelha e cabra, quer em mistura com leite de vaca quer em uso exclusivo, sendo o seu peso relativo significativo face ao volume total de queijo produzido (Figura 1) (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2007).

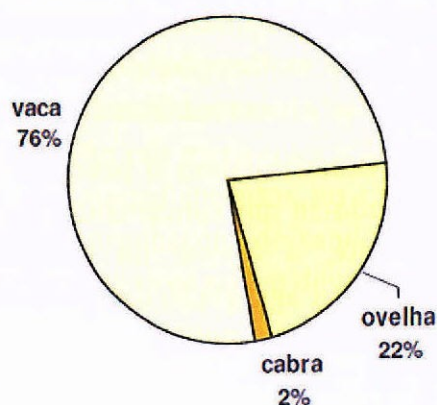


Figura 1 - Peso da produção de queijo por espécie no ano 2005 (Gabinete de Planeamento e Políticas, 2007).

Devido à aposta feita pelos produtores na certificação de qualificação e valorização no mercado dos produtos tradicionais, verificou-se um aumento na produção de queijos, segundo dados de 2010 (Figura 2).

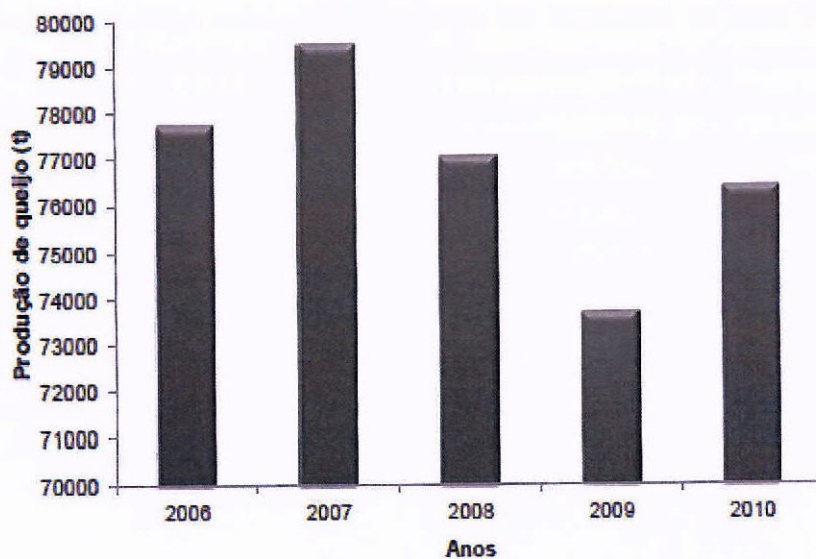


Figura 2 - Produção de queijo (t) no período de 2006 a 2010 (INE, 2011)

Na Beira Interior, a designação de alguns produtos alimentares, nomeadamente os queijos, está diretamente ligada à região na qual é produzido, bem como à forma como é produzido. Pela especificidade das suas características organoléticas, tem-se verificado um enorme interesse em queijos tradicionais (Reis *et al.*, 2003).

2.7. Tecnologia do processo de fabrico

Existem vários processos no fabrico do queijo que envolvem muitas etapas e várias modificações bioquímicas. Esses processos são a coagulação e o dessoramento, a moldagem/prensagem, a salga e a maturação/cura. Pode-se obter uma enorme variedade de queijos através de vários processos tecnológicos (Walstra *et al.*, 2006).

O fabrico de queijo pode ser descrito como o processo de remoção de água e alguns minerais do leite, produzindo-se um concentrado de gordura e proteína. Os ingredientes essenciais são o leite, o agente de coagulação (coalho), a flora microbiana e o sal. O coalho provoca a agregação das proteínas e transforma o leite líquido numa espécie de gel firme (Noronha, 2003).

. Coagulação

O fenómeno da coagulação ocorre quando a caseína se separa dos restantes constituintes do leite, dando origem a um corpo sólido, a coalhada que depois origina o queijo a um líquido, o soro.

Existem dois tipos de coagulação, a coagulação enzimática (por ação do coalho) e a coagulação láctica. A coagulação pelo coalho só tem lugar em presença dos sais de cálcio (Sá e Barbosa, sd).

Na coagulação enzimática pode ser usado coalho animal, o qual é uma substância que se extrai do estômago dos mamíferos durante o período de alimentação láctea. O coalho além das propriedades coagulantes, possui ainda propriedades enzimáticas que têm ação sobre o desdobramento da caseína e, por consequência, sobre a maturação do queijo. Para além do coalho animal também pode ser usado coalho vegetal, o qual tem propriedades proteolíticas mais acentuadas que o coalho animal, o que origina queijos com uma pasta mais mole. O fabrico tradicional de quase todos os queijos de ovelha é feito usando o cardo como substância coagulante. A temperatura ideal da coagulação é entre 28 e 37°C (Sá e Barbosa, sd).

. Moldagem e Prensagem

Após o dessoramento, a coalhada pode ser transferida diretamente para os moldes (queijo granular) ou ser previamente, prensado e cortado.

Esta etapa tem como objetivo expulsar o restante soro, melhorar a textura e dar forma ao queijo. A velocidade de prensagem deve ser gradual e aplicada a cada tipo de queijo, a fim de não provocar bolsas de humidade (Moreira, 2011).

A massa de coalhada é colocada em moldes para dar ao queijo a sua forma final. A massa é espremida lentamente. A moldagem no cincho é uma das fases em que cada queijaria poderá dar o seu “toque pessoal” ao queijo. A experiência adquirida permite saber quando é que a massa já está dessorada “quanto baste”.

A prensagem pode ser feita por mera colocação de pesos ou por ação pneumática. As pressões aplicadas são menos intensas no caso dos queijos mais brandos. Em alguns casos não se aplica a prensagem, deixando o queijo no molde apenas sujeito à ação do próprio peso. O local da prensagem deve ser fresco (Noronha, 2003).

. Salga

O sal é um condimento que remove a humidade do queijo através do efeito osmótico. O sal pode ser adicionado diretamente à coalhada, por pulverização após a expulsão do soro ou submergindo os queijos em tanques com salmoura. Este passo contribui para o sabor, durabilidade e consistência do queijo, assim como para a sua maturação (Fox *et al.*, 2000).

A salga destina-se a evitar que o queijo se deteriore e a transmitir o sabor final. 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. No processo de salga na massa, a mistura de sal é feita antes da massa ser colocada nos moldes. Em salmoura, o queijo moldado é imerso numa solução salina para incorporação do sal (tempo de salmoura é condicionado pelo tamanho do queijo e pela concentração final de sal pretendida). Na salga direta, o queijo é coberto com grãos de sal sendo este absorvido lentamente, enquanto que na salga mista, o queijo é primeiro mergulhado em salmoura e depois coberto com sal sólido. Dos processos acima referidos, o mais comum, é a imersão em salmoura. É necessário todo o cuidado no manuseamento e escolha do sal para que este não contamine o queijo, conforme descrito anteriormente (Noronha, 2003).

. Cura ou Maturação

A cura é o processo durante o qual a maturação do queijo se completa. As condições e a duração da cura dependem do tipo de queijo. Durante esta fase os queijos tradicionais são mantidos a uma temperatura refrigerada (pode variar entre 5°C e 12°C) e humidade controlada (pode variar entre 80% e 90% de humidade relativa) sendo virados periodicamente. É durante este período que o queijo vai perdendo água (reduzindo a atividade da água) e os microrganismos vão atuando sobre a lactose, as proteínas e as gorduras, originando a textura e aromas característicos de cada tipo de queijo (Noronha, 2003).

Os queijos podem ser curados, durante um período compreendido entre 3 semanas a 2 anos, podem ser consumidos frescos. A duração do período de maturação é inversamente proporcional ao teor de humidade do queijo. Pelo processo de fabrico são determinadas as mudanças que ocorrem durante a maturação e que influenciam a formação do sabor, aroma e textura, pela composição (humidade, NaCl e pH), pelo nível de atividade coagulante e pelo início do processo de maturação (acidificação química ou biológica) (Fox *et al.*, 2000, 2004).

A maturação é o resultado de uma ação conjunta de natureza enzimática de proveniência microbiana, do coalho adicionado ou do próprio leite, além da ação de outras substâncias que resultam do metabolismo microbiano. A humidade, a temperatura e o grau de acidez são fatores que interferem na condução da maturação. Na maturação dos queijos os microrganismos que intervêm são muito variados, uns atuando somente no interior da massa do queijo e ao abrigo do ar, anaeróbios, e outros atuando em presença do ar, aeróbios (Sá e Barbosa, sd).

O período de cura é variável, podendo estender-se por vários meses. Nos queijos de leite cru, é fundamental que o período mínimo de cura de 30 dias seja cumprido, pois só assim garantirá a confluência de vários fatores importantes para a segurança do produto. As condições de arejamento e o ar das câmaras também são importantes para o sucesso do processo de cura (Noronha, 2003).

A proteólise, a glucólise e a lipólise são as principais alterações bioquímicas, no entanto, podem ocorrer outras reações como o catabolismo de compostos produzidos nas reações principais, que incluem a desaminação, a descarboxilação e a desfosforalização de aminoácidos ou, ainda, reações de esterificação. (Fox *et al.*, 2000, 2004).

2.8. Parâmetros analíticos do queijo

2.8.1. Parâmetros físico-químicos

As proporções relativas de água, gordura, proteínas e minerais, a natureza e extensão da fermentação, são os principais fatores que determinam a composição do queijo, sendo influenciadas pela tecnologia de fabrico (Fuquay *et al.*, 2011).

Geralmente, o pH em queijos de ovelha está entre os valores de 4,9 e 5,7 e o seu aumento ocorre, essencialmente, na maturação mais longa, isto é, superior a 45 dias. O pH é uma característica importante durante o processo de produção e o seu valor final indica como decorreu o processo, e se há ou não ausência de defeitos, como uma elevada acidez (Moreira, 2011). O pH é determinado pela relação de ácido láctico e a sua capacidade tampão que é controlada, principalmente, pelos níveis de caseína e fosfato de cálcio (Fuquay *et al.*, 2011).

A acidez, normalmente medida pelo pH, é um dos parâmetros mais críticos no que diz respeito à segurança alimentar e ao controlo de qualidade do processo de fabrico do queijo. O leite tem um pH próximo de 6,8, o que significa que, é um meio adequado ao crescimento da maioria das bactérias. A fermentação natural do leite cru, por ação das bactérias lácticas, conduz à redução significativa do pH, cuja diminuição depende do tipo de bactérias lácticas envolvidas e da tecnologia de produção. A redução do pH do queijo, para valores entre 4,5 e 5,5 contribui para a prevenção do crescimento de bactérias patogénicas, implicados na deterioração do queijo. A acidez, é um fator de segurança dos queijos (Noronha, 2003).

O sal atua como conservante e contribui, diretamente, para o sabor e qualidade. Assim sendo o teor de NaCl é um parâmetro estatisticamente significativo para todas as características microbiológicas e físico-químicas devido à sua capacidade de reduzir a atividade da água, a qual afeta o desenvolvimento microbiano. Concentrações elevadas de sal são associadas ao aumento dos níveis de gordura e proteína, devido à perda de água. Quando se relacionam os níveis de gordura e humidade, estes apresentam uma proporção inversa (Fox *et al.*, 2000; McSweeney, 2007).

O desenvolvimento microbiano ocorre apenas na presença de água. O parâmetro que dá indicação sobre a quantidade de água disponível para o crescimento microbiano é designado por atividade da água. O leite tem uma grande percentagem de água (88% - 89%) na sua composição. Este nível corresponde a uma elevada quantidade de água disponível, o que contribui para que o leite seja um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos.

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação em meios com reduzida atividade da água, varia conforme os microrganismos. Considerando que há exceções, os principais grupos de microrganismos apresentam os seguintes valores de atividades de água, como mínimos para o seu desenvolvimento (Noronha, 2003):

- > Maioria das bactérias: 0,90 – 0,91
- > Maioria das leveduras: 0,87 – 0,94
- > Maioria dos bolores: 0,70 – 0,80

A atividade da água vai decrescendo quando passamos de um queijo de pasta mole (por ex: 0,95) para um queijo de pasta dura (por ex: 0,85), fator que reforça a proteção do produto contra a presença de microrganismos (Tabela 4). Nos queijos com baixa atividade da água crescem preferencialmente leveduras e fungos filamentosos (Noronha, 2003).

Tabela 4 - Valores mínimos aproximados de atividade da água para vários microrganismos patogénicos relevantes para o queijo (Noronha, 2003).

Microrganismo patogénico	Atividade da água (a_w)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.92
<i>Salmonella</i> spp.	0.95
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.95
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0.95

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

2.8.2. Parâmetros microbiológicos

As enzimas microbianas atuam, incisivamente, sobre os carboidratos, as gorduras e as proteínas presentes no leite, potenciando os atributos sensoriais de textura, aroma e sabor, típicos desse produto. Além disso, as bactérias lácticas são capazes de competir ou inibir a proliferação de patogénios e microrganismos oportunistas auxiliando na estabilidade físico-química desse produto (Barros *et al.*, 2011).

A qualidade microbiológica do leite cru e do queijo normalmente fabricado com leite cru, depende basicamente das condições higio-sanitárias adotadas no sistema de produção, no processamento e na comercialização desses produtos. A carga microbiana do leite depende do número de microrganismos que entram em contato com o leite antes da ordenha ou através de contaminações subsequentes ressaltando-se que a multiplicação microbiana depende do tempo e temperatura de conservação do leite (Alves *et al.*, 2009).

O leite é uma fonte de bactérias lácticas, mas também pode ser uma fonte de microrganismos indesejáveis do ponto de vista de segurança microbiológica. Estas

bactérias contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do produto. São consideradas as principais responsáveis pela acidificação do queijo, produzindo ácido e fermentando hidratos de carbono, favorecendo assim a sua conservação (Veiga, 2012).

A microflora láctica e a microflora secundária são os dois tipos de grupos existentes na microflora do queijo. A contribuição para a acidificação e cura do queijo está principalmente na primeira, enquanto não contribui para a acidificação mas é essencial para o processo de cura, temos a flora secundária. Estes dois grupos inserem-se nos seguintes grupos de microrganismos: *Enterobacteriaceae*, estafilococos e fungos, bem como bactérias lácticas como *Lactobacillus* e lactococos e *Enterococcus* (Fox e Wallace, 1997, citados por Beresford *et al.*, 2001).

Os microrganismos com capacidade de redução do pH do leite com valores inferiores a 5,3 em 6 h a 30-37°C, estão definidos na microflora *starter*, que é composta por bactérias ácido-lácticas, como os géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. A microflora secundária inclui bactérias lácticas não-starter, que se desenvolvem naturalmente no interior dos queijos, e fungos que se desenvolvem quer no interior quer no exterior do queijo, e que tendem a ser específicos do tipo do queijo (Beresford *et al.*, 2001).

Devido à sua forte componente artesanal, o Queijo de Castelo Branco, mesmo quando produzido num estabelecimento industrial, apresenta uma grande variação de contagens microbianas (Tavaria e Malcata, 2000), tal como se constata noutros queijos feitos a partir de leite cru de ovelha (Prodromou *et al.*, 2001).

Os produtos lácteos devido à sua rica composição em nutrientes podem apresentar contaminações por microrganismos, inclusive patogénicos. A sua qualidade dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima. Das várias bactérias que podem crescer em queijos destacam-se, principalmente, os coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium spp.*, *Listeria*, e algumas espécies do género *Bacillus* (Donnelly, 2004).

Os queijos podem apresentar diferenças significativas na contaminação por microrganismos patogénicos, na sequência da sua presença no leite cru usado na produção e subsequente sobrevivência durante o processo de fabrico. Também podem contaminar o queijo pós-processamento, se as condições de higiene na linha de produção não forem suficientes para prevenir a recontaminação (LITTLE *et al.*, 2008).

3. Material e Métodos

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar o número de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo ao longo do período de maturação, bem como avaliar a altura em que se prevê que o seu número seja mais elevado. Para o cumprimento deste objetivo, o trabalho foi dividido em três fases:

- 1) Levantamento de dados de 31 produtores de queijo relativos à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos laborados com leite cru de ovelha e com diferentes tempos de cura;
- 2) Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 45 dias de maturação em dois lotes de queijo naturalmente contaminados;
- 3) Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado.

3.1. Levantamento dos dados de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo produzido na zona centro

Com o objetivo de avaliar os valores médios de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos da região centro, laborados com leite cru e com diferentes tempos de cura, foi efetuado um levantamento de dados analíticos na Aquimisa, Consultores Agro-Industrias, Lda. Esta é uma empresa que presta serviços de consultoria a um vasto número de queijarias e faz análises a um grande número de parâmetros microbiológicos, incluindo a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos.

No total foram recolhidos 445 resultados da análise a 445 queijos pertencentes a 31 produtores distribuídos pela região centro (Figura 3). Estes resultados dizem respeito a análises efetuadas a amostras de queijo com diferentes tempos de cura, laborado com leite cru de ovelha e/ou de cabra, durante o período de 2011 a 2013.



Figura 3 - Mapa com a identificação das localidades onde se obtiveram resultados de análises a *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos

3.2. Estudo da evolução do número de *Staphylococcus coagulase positiva* ao longo de 45 dias de maturação em dois lotes de queijo naturalmente contaminados

Como já foi referido, numa segunda fase foram seleccionados dois produtores de queijo de ovelha laborado com leite cru. A seleção foi feita tendo por base o tipo de cura, já que as condições de maturação, em termos de humidade relativa e temperatura, influenciam a multiplicação deste grupo de bactérias. Assim, este estudo decorreu na queijaria Z (com cura natural, não controlada, e localizada na freguesia de Zebras) e na queijaria S (com cura controlada e localizada na freguesia da Soalheira).

3.2.1. Descrição dos processos de fabrico dos produtores Z e S

Irão ser descritos os processos de fabrico dos queijos nas queijarias Z e S, os quais foram acompanhados durante a produção dos dois lotes de queijo naturalmente contaminados. Em anexo encontram-se os fluxogramas do fabrico de queijo do produtor Z e do produtor S (Anexo III e Anexo IV).

Após a descrição dos processos de fabrico será descrita a forma como foi efetuada a colheita de amostras nas duas queijarias e a metodologia analítica.

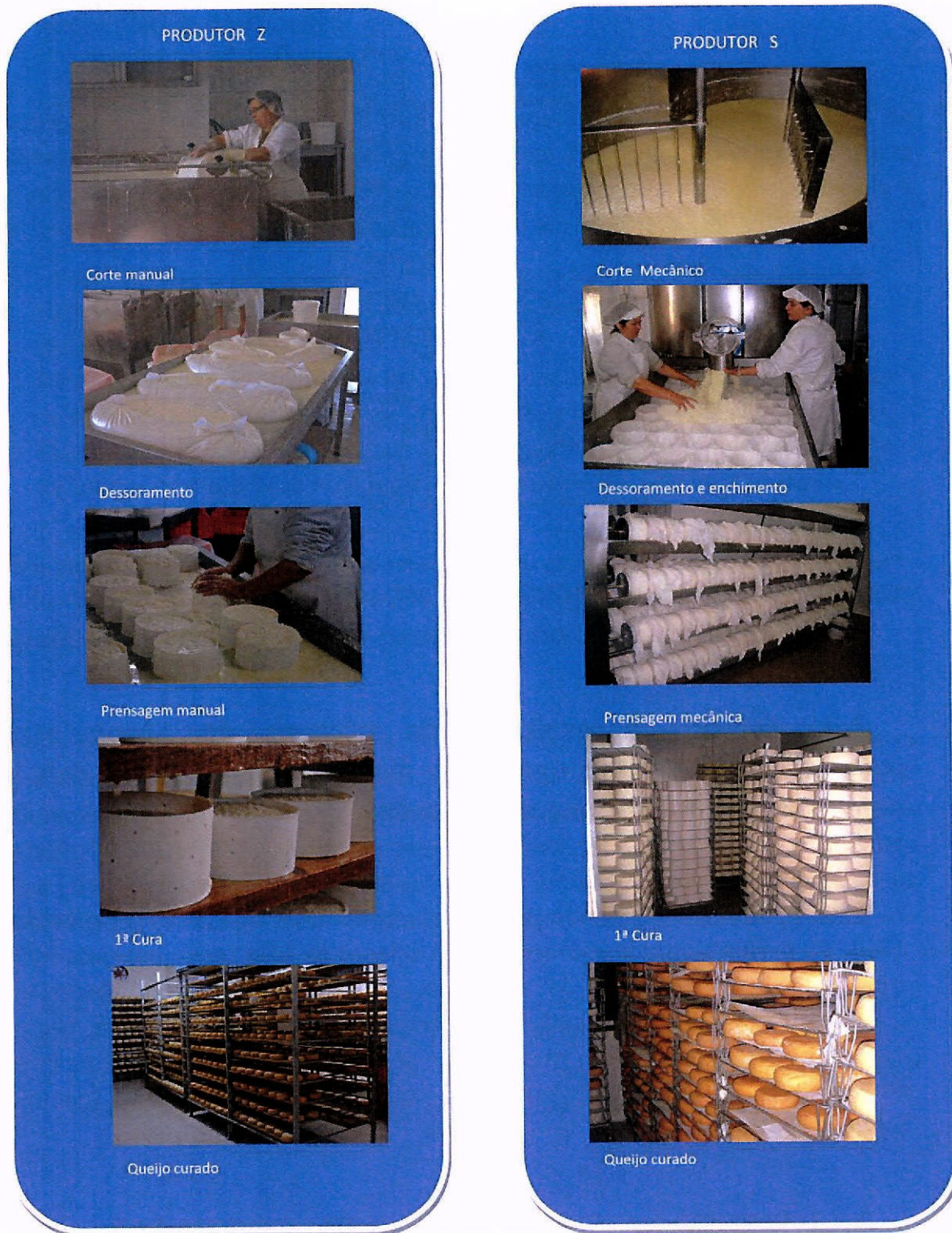


Figura 4 - Diferentes processos de fabrico dos queijos dos produtores Z e S

Recolha do leite

Tanto o produtor Z como o S, procedem à recolha do leite junto dos produtores, e verificam a qualidade higiénica do leite, observando a cor, odor e aspeto, sendo responsáveis pelo transporte até à unidade. À chegada o produtor Z apenas regista a temperatura do leite que foi transferido para a cuba ou quando existe necessidade de armazenar o leite no tanque, o produtor S além de verificar a temperatura, também faz o teste para a deteção de inibidores, acidez e pH. No caso de resultados positivos, presença de inibidores, o leite é considerado impróprio para consumo humano, sendo a partir daí identificado como subproduto de origem animal e encaminhado de acordo com as regras previstas no Reg.(CE) nº1774/2002, não sendo prática da unidade, em caso algum, a sua devolução, nem mesmo à exploração de origem. Procede-se para o efeito a notificação das Autoridades Competentes (Direção Regional de Veterinária de Castelo Branco).

Receção e armazenamento do Leite

O leite rececionado é destinado ao fabrico de queijo curado na Queijaria do produtor Z e no produtor S sendo essa prática diária.

O armazenamento do leite é realizado quando não existe possibilidade de laboração no próprio dia, sendo neste caso, laborado no dia seguinte. A temperatura de armazenamento é de 3°C no produtor Z e no produtor S é de 4°C, constatada no registo de armazenamento do leite.

Coagulação

É uma operação mediante a qual o leite sofre uma transformação do estado líquido ao estado semisólido (coalhada). Este processo é induzido pela adição de um agente coagulante, de origem animal (coalho).

A coagulação do leite dá-se a uma temperatura entre os 28°C e os 30°C, durante aproximadamente 45 a 50 minutos.

Corte

O corte tem como objetivo o dessoramento da coalhada e é feito manualmente através da fataça no produtor Z e através de liras em sentidos circulares a uma velocidade reduzida, por forma a otimizar o dessoramento, no produtor S. Esta operação é monitorizada no dispositivo indicador das rotações das liras.

Dessoramento e enchimento das formas

Após o corte e repouso da massa esta é despejada para as formas para um melhor dessoramento da massa e colocada manualmente dentro dos moldes, no caso do produtor Z. No produtor S, a massa é despejada para uma francela microperfurada e é depois colocada manualmente dentro dos moldes.

Prensagem

É uma operação que tem como objetivo completar o dessoramento e finalizar a textura da coalhada.

No produtor Z a prensagem é feita manualmente deixando-se escorrer na francela, no produtor S, nas formas são colocadas as tampas com um pano, para evitar a perda de coalhada e são levadas a prensas automáticas do tipo horizontal. No final da prensagem os queijos são retirados das formas, seguindo para o túnel onde se procederá à sua higienização.

Salga

A salga dos queijos é feita a seco pela aplicação de sal na superfície dos queijos. Finalizada a salga, os queijos são transportados em carros para a sala de cura e aí são colocados em tábuas de madeira (no produtor Z) ou sobre redes em *clairs* (no produtor S).

Cura

Durante a maturação ocorre uma série de transformações bioquímicas e microbiológicas no queijo.

Na queijaria do produtor Z, numa primeira fase os queijos ficam na primeira sala de cura durante cerca de 8 dias, passando para a segunda sala de cura onde permanecem até serem expedidos, e na queijaria do produtor S os queijos ficam na primeira câmara de cura durante cerca de 8 a 9 dias, passando para a segunda câmara onde permanecem pelo menos 16 dias.

Lavagem

A lavagem dos queijos é feita com água corrente manualmente.

Preparação dos queijos para venda

A preparação para venda engloba a pesagem, rotulagem e a embalagem.

Os queijos poderão ser embrulhados em papel vegetal certificado próprio para uso alimentar. A colocação do rótulo passa pelo uso de cola alimentar no papel ou diretamente no próprio queijo.

Os queijos poderão ser pesados individualmente ou por caixa, em balanças digitais calibradas.

A expedição do queijo é feita em caixas de papel certificadas para uso alimentar com impressão do logotipo da unidade ou em caixas plásticas.

O público alvo da venda do queijo são as pequenas cadeias de distribuição, pequenos retalhistas e venda direta.

3.2.2. Colheita de amostras

Num período de 45 dias, de 4 de Junho a 18 de Julho de 2012, recolheram-se assepticamente amostras de queijos do mesmo lote, de duas queijarias da região da Beira Baixa. Recolheram-se ainda amostras do leite usado na laboração dos dois lotes do queijo em estudo.

Ao longo de 45 dias foram recolhidas 40 amostras de cada produtor, em subunidades de cinco amostras, nos seguintes tempos de maturação: 0, 1, 3, 5, 7, 12, 18 e 45 dias de maturação.

As amostras foram recolhidas com uma sonda (Figura 5), devidamente esterilizada, e as amostras foram depois colocadas em sacos estéreis de *Stomacker* bem fechados. De seguida foram transportadas em caixas isotérmicas refrigeradas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.



Figura 5: Colheita de amostras através do uso de sonda.

3.2.3. Preparação da amostra e das diluições

Durante a preparação das amostras e as análises microbiológicas foram seguidas as boas práticas de laboratório (BPL) descritas na norma ISO 7218 (2007).

A preparação da suspensão-mãe e das diluições foi feita seguindo as instruções da norma ISO 6887-5 (2010).

A amostra de queijo foi cortada numa placa de Petri esterilizada de 120 mm de diâmetro em pequenos fragmentos (num total de 10 g), incluindo a superfície do queijo / casca, com material esterilizado e em condições de assepsia, e colocada em sacos esterilizados próprios para *Stomacher* (PE dim 177x304 mm com tela filtrante Seward Limited, London, UK) devidamente identificados com o número da amostra, data e hora da colheita. À toma da amostra de 10 g adicionou-se 90 ml de diluente estéril (citrato de trisódio), de forma a obter-se uma suspensão-mãe equivalente à primeira diluição decimal (10^{-1}). A mistura assim preparada foi ao aparelho homogeneizador *Stomacher* (*Stomacher 400 Circulator*, Seward Limited, London, UK) durante 1 minuto a 230 rotações por minuto (rpm), de modo a obter-se uma correta homogeneização. A partir desta suspensão-mãe foi efetuado um máximo de quatro diluições decimais (correspondente à diluição 10^{-5}), dependendo do número de *Staphylococcus coagulase positiva* estimado.

Após a retirada da toma de amostra para as análises microbiológicas a amostra restante foi colocada num saco estéril e posteriormente usada para a realização das análises físico-químicas.

3.2.4. Procedimento para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* - Técnica com confirmação de colónias

O procedimento seguido baseou-se na norma NP 4400-1 (2002).

A partir da suspensão-mãe e das respetivas diluições foi feita uma sementeira à superfície de 0.1 ml em placas com meio seletivo Baird-Parker Agar (BP) (Oxoid, ref^ª CM0275) suplementado com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (Oxoid ref^ª SR0054C). Seguiu-se a incubação durante $48\text{h} \pm 2\text{h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para posterior contagem e isolamento das colónias características e não características como descrito na norma de referência. Neste meio a glicina, o cloreto de lítio e o telurito de potássio atuam como agentes seletivos ao passo que a adição de gema de ovo permite avaliar a atividade da enzima lecitinase. As colónias características são cinzentas escuras ou pretas devido à redução do telurito, brilhantes, convexas, com margens inteiras, de diâmetro compreendido entre 1mm a 1,5 mm após 24 horas de incubação e 1,5 mm a 2,5 mm de diâmetro após 48 horas de incubação, rodeadas de um halo transparente. Neste halo pode aparecer um anel opalescente imediatamente em contacto com as colónias (Figura 6). As colónias não características podem apresentar-se como colónias negras ou cinzentas, brilhantes, com ou sem rebordo branco estreito e em que a zona clara está ausente ou é fracamente visível.



Figura 6: Colónias características de *Staphylococcus coagulase positiva* no meio de cultura Baird Parker Agar.

Para a contagem de colónias selecionaram-se as placas de duas diluições sucessivas contendo menos de 150 e mais de 15 colónias características e/ou não características, seguindo as indicações da norma (ISO 7218, 2007). A contagem foi feita considerando os diferentes tipos morfológicos das colónias.

Para confirmação escolheram-se 3 a 5 colónias características e/ou não características, a partir de cada placa previamente selecionada, as quais foram depois inoculadas no caldo Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Merck, Danstald, Germany). Após incubação durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, juntou-se 0,1 ml de cada cultura jovem

em BHI a 0,3 ml de plasma de coelho com EDTA (Merck, Danstald, Germany), em tubos de hemólise, e incubou-se a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 h a 6 h ou, se necessário, até 24 h. A pesquisa da coagulase foi considerada positiva quando o coágulo ocupa mais de 3 quartos do volume inicialmente ocupado pelo líquido (Figura 7). Para efeitos de controlo, juntou-se num tubo 0,1 ml de meio BHI não inoculado com 0,3 ml de plasma de coelho e incubou-se o tubo nas mesmas condições. Para que a reação seja válida o plasma do tubo testemunha não deve mostrar sinais de coagulação.

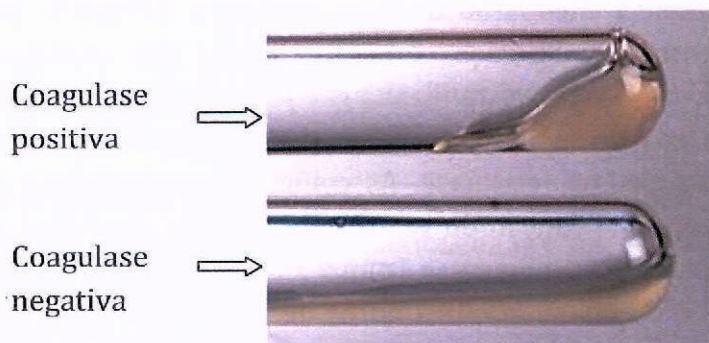


Figura 7 - Teste da coagulase em tubo (Fonte: <http://prokariotae.tripod.com/Coagulase.jpg>)

Em alternativa ao teste da coagulase em tubo, referido anteriormente, foi usado o meio de cultura Baird-Parker Agar com o suplemento *Rabbit Plasma Fibrinogen*, RPF (Biomérieux, ref^a 44003), previamente preparado de acordo com as instruções do fabricante. Este é um meio seletivo e diferencial. O suplemento RPF contém plasma de coelho e fibrinogénio de vaca, que permitem detetar a atividade da coagulase pela formação de halos opacos em redor das colónias de *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como um inibidor de tripsina que evita a fibrinólise total ou parcial dos halos opacos previamente formados. Cada placa de Petri com o meio Baird-Parker Agar suplementado com RPF foi subdividida em quadrículas e em cada espaço foi inoculada uma cultura por picada, usando um fio reto, como mostra a figura 8. Cada placa permite inocular 20 a 30 culturas.

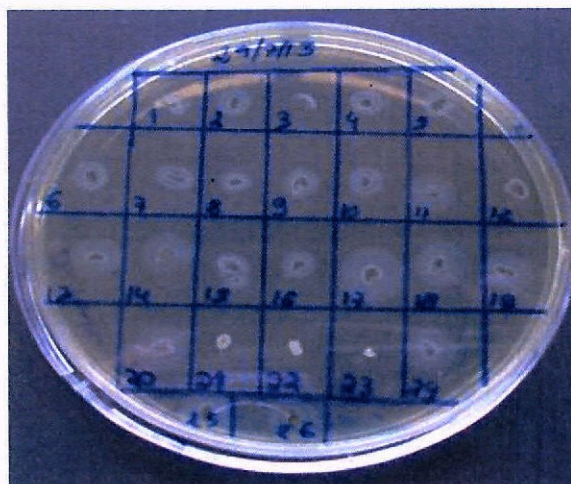


Figura 8 - Placa de meio Baird-Parker Agar + RPF inoculada para observação da reação da coagulase.

Após confirmação das colónias previamente selecionadas, calculou-se o número de colónias de *Staphylococcus* coagulase positiva para cada placa com contagem de colónias, usando a fórmula seguinte:

$$\underline{a} = \frac{\underline{b^c}}{\underline{A^c}} \times \underline{C^c} + \frac{\underline{b^{nc}}}{\underline{A^{nc}}} \times \underline{C^{nc}}$$

Em que:

b^c - número de colónias características que se revelaram coagulase positiva

b^{nc} - número de colónias não características com resultado coagulase positiva

C^c - número total de colónias características contabilizadas na placa

C^{nc} - número total de colónias não características contabilizadas na placa

A^c - número de colónias características submetidas ao teste da coagulase

A^{nc} - número de colónias não características submetidas ao teste da coagulase

De seguida, calculou-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) de *Staphylococcus* coagulase positiva por grama de queijo ou por ml de leite aplicando a fórmula geral (considerando contagens em duas diluições consecutivas e pelo menos uma placa com um número de colónias igual ou superior a 15):

$$N = \frac{\Sigma a}{1,1 \times V \times d}$$

Em que:

Σa - soma das colónias de *Staphylococcus* coagulase positiva confirmadas nas placas consideradas nas duas diluições consecutivas

V - volume (em mililitros) do inóculo semeado em cada placa

d - taxa de diluição correspondente à primeira diluição considerada para contagem

Em todas as contagens, quando a placa da primeira diluição inoculada apresentou um número de colónias inferior a 15, o resultado foi considerado um número estimado de UFC de *Staphylococcus* coagulase positiva por grama de queijo ou por ml de leite, tendo sido obtido através da equação:

$$N_E = \frac{N}{V \times d}$$

Em que:

NE - número estimado de UFC

N - número de colónias contadas na placa

V - volume inoculado

d - fator de diluição

Quando na placa correspondente à primeira diluição inoculada não ocorreu desenvolvimento de colónias confirmadas como *Staphylococcus* coagulase positiva, o resultado obteve-se através da seguinte fórmula:

$$< \frac{1}{V \times d}$$

Todos os resultados foram arredondados a dois algarismos significativos, entre 1,1 e 9,9, multiplicados pela potência de base 10 apropriada, tendo em conta a correta expressão dos resultados de acordo com a notação científica (NF ISO 7218, 1996)

3.2.5. Crioconservação de culturas para posterior estudo

Todas as culturas isoladas dos queijos dos produtores S e Z confirmadas como *Staphylococcus* coagulase positiva, assim como outras culturas de interesse do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa, foram repicadas para Agar Nutritivo (Oxoid™, Cambridge, UK), através de riscado com ansa estéril até esgotamento, e incubadas a 37°C durante 48 horas para purificação e posterior avaliação das características culturais (cor, forma, superfície, margem e tamanho da colónia). Após a avaliação macroscópica das colónias, foi feito ainda um esfregaço para avaliação microscópica,

nomeadamente ao nível das características morfológicas dos microrganismos após coloração diferencial de Gram.

Foi também verificada a produção de hemolisinas por parte de todas as culturas testadas para a prova da coagulase. Para a prova da hemólise foi usado o meio de cultura Agar-sangue (*Columbia Agar Base* com 5% de sangue de carneiro; BioMérieux ref^ª 43041COS). Cada placa deste meio foi subdividida na base em quadrículas e, em cada espaço, usando um fio reto, foi inoculada uma cultura. Cada placa permite inocular 20 a 30 culturas. Após 24 horas de incubação a 37°C foi possível caracterizar as culturas como hemolíticas ou não hemolíticas.

Todas as culturas previamente purificadas e caracterizadas, como descrito acima, foram crioconservadas a -80°C para posterior estudo das suas características ao nível da capacidade para produzir enterotoxinas estafilocócicas, ao nível da sua susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, ao nível do estudo do efeito de fatores ambientais (pH, temperatura e NaCl) na sua multiplicação e sobrevivência, e por último, para tipagem molecular.

O protocolo seguido na crioconservação encontra-se esquematizado na figura 9.

O primeiro passo da crioconservação foi a repicagem de uma ansa com cultura para um tubo com 10ml de meio TSB, devidamente identificado. Após a inoculação, os tubos foram incubados cerca de 5 a 6h e retirados na fase exponencial do crescimento bacteriano.

Para cada estirpe usaram-se dois criotubos de 2ml, devidamente identificados. Colocou-se 1,5ml de suspensão de células e centrifugou-se durante 5min a 10.000rpm. Após a centrifugação rejeitou-se o sobrenadante, colocou-se de novo 1,5ml de suspensão de células e repetiu-se a centrifugação, durante 5min. a 10.000rpm. Rejeitou-se novamente o sobrenadante e colocou-se em cada eppendorf 500µl de TSB com 15% de glicerol. Selaram-se as tampas dos eppendorfs com parafilm e agitaram-se no Vortex para suspender o pelet depositado no fundo. Finalmente, foram congelados a uma temperatura de -80°C.

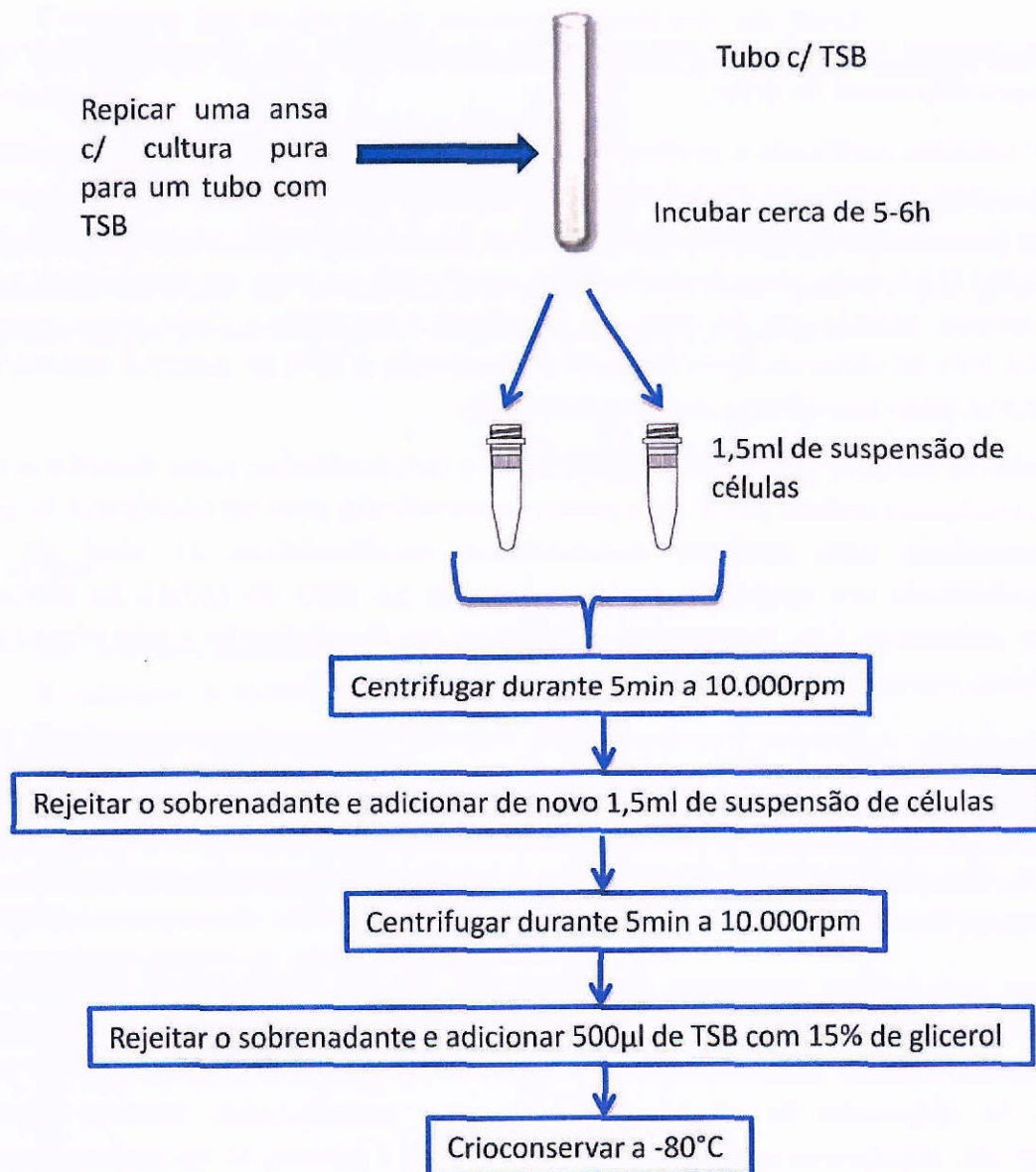


Figura 9 - Protocolo para a criopreservação de culturas bacterianas.

3.2.6. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal e no Laboratório de Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB). Os parâmetros analisados foram os seguintes: atividade da água (a_w) e teor de cloretos (% NaCl).

A partir de cada amostra anteriormente analisada microbiologicamente, foi efetuada a preparação de amostra para as análises físico-químicas. O produto foi triturado e homogeneizado até se obter uma pasta fina. As amostras assim preparadas foram colocadas em frascos de vidro de boca larga com tampa hermética, devidamente identificados, para sua posterior análise físico-química.

Determinação da atividade da água

A determinação da atividade da água (a_w) foi efetuada a todas as amostras de queijo com 45 dias de maturação. Esta determinação foi efetuada no Laboratório de Tecnologia Alimentar da ESACB, com recurso a um aparelho previamente calibrado, modelo Rotronic Hygroskop DT, equipado com uma estação de medida do tipo WA14-TH termicamente estável a 25°C e copos de poliestireno ref^a PS 14 (14ml).

A amostra foi hermeticamente fechada na célula do aparelho, permitindo que a humidade relativa (HR) do alimento e a HR do ambiente no interior da célula ficassem em equilíbrio. O sensor, localizado na parte superior da célula, faz a leitura constante da HR, estabilizando quando a variação for inferior a 0,02% HR/min e 0,02 °C/min.

A atividade da água é um parâmetro que exprime a fração de água do alimento que está disponível para participar no metabolismo microbiano. É definida como o quociente entre a tensão de vapor de água de um alimento e a tensão de vapor da água pura. Os valores obtidos podem variar entre zero e um.

Determinação do teor de cloretos

Para a determinação do teor de cloretos foi seguido o procedimento interno em uso no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal da ESACB. Os cloretos, expressos em percentagem de cloreto de sódio, determinaram-se titulando o excesso de nitrato de prata, que não foi combinado com os cloretos existentes na amostra, com tiocianato de potássio, utilizando como indicador o sulfato de ferro e amónio. A destruição da matéria orgânica e a clarificação da solução é assegurada pelo permanganato de potássio e pelo calor. O nitrobenzeno destina-se a proteger o precipitado da reação com o tiocianato de potássio.

Cálculos:

Normalidade: $\text{NO}_3\text{Ag} - 0.1 \text{ (N)}$; $\text{KSCN} - 0.1 \text{ (N')}$

PM (NaCl) = 58,44

V - volume gasto de NO_3Ag (20)

V' - Volume gasto de KSCN

$\% \text{ NaCl} = [(2 - (V \times N')) \times \text{PM (NaCl)}] / \text{peso da amostra}$

3.3. Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado

3.3.1. Produção do lote de queijos artificialmente contaminados

No dia 21/03/2013 procedeu-se à laboração de 10 queijos, na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, com leite cru de ovelha proveniente de um dos produtores de queijo em estudo, o produtor Z. Os 30 litros de leite foram transportados numa bilha de inox, imediatamente após a ordenha.

À chegada à Escola Superior Agrária, foi efetuado o aquecimento do leite a 30°C (figura a) e, após colheita de uma amostra sem inóculo (figura b) para verificarmos se o leite cru usado no fabrico deste lote de queijos se encontrava naturalmente contaminado com *Staphylococcus* coagulase positiva, inoculou-se 10 µl de uma cultura jovem de *Staphylococcus aureus* CIP 5710 ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/ml de inóculo) (figura c), de forma a obter-se uma concentração final de aproximadamente $5,0 \times 10^1$ UFC/ml de leite.

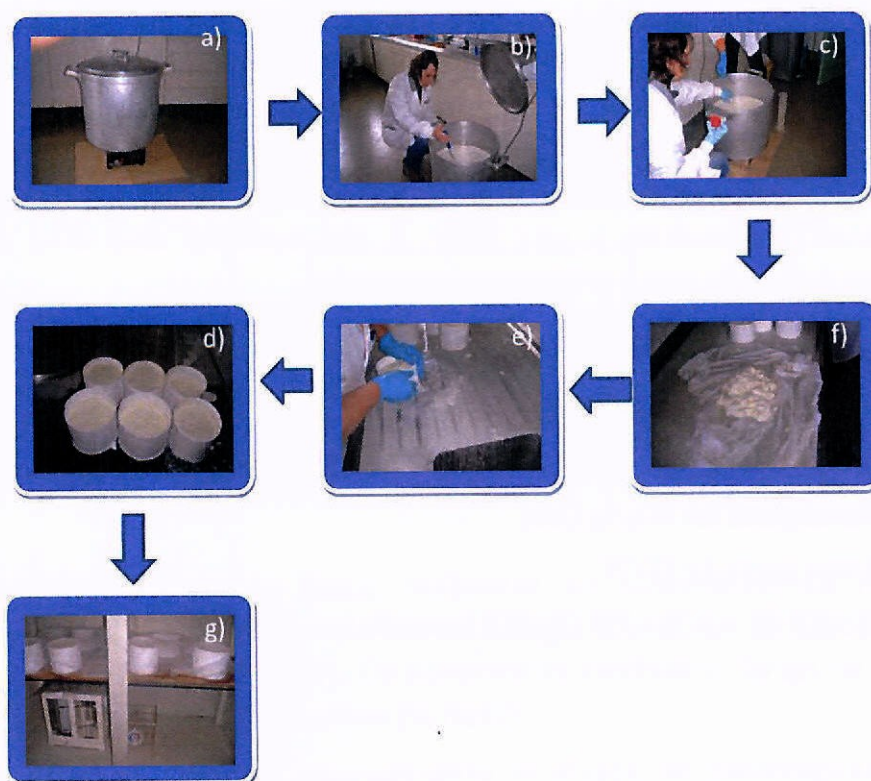


Figura 10 - Laboração dos queijos artificialmente contaminados.

Após a inoculação e homogeneização do leite, recolheu-se nova amostra de leite para o cálculo do número de *Staphylococcus coagulase positiva* no leite cru, após contaminação artificial do leite. Logo de seguida adicionou-se 0,617g de coalho em pó e deixou-se coagular a uma temperatura que variou entre 30°C e 38°C.

Coagulada a massa (figura f), esta foi espremida com um pano próprio para esse fim, para escorrimento do soro, sendo posteriormente distribuída em cinchos de PVC (figura e e d).

Por fim, os queijos foram colocados em tábuas de madeira (figura g), cedidas pelo produtor da queijaria Z, num compartimento com monitorização de temperatura e humidade relativa.

3.3.2. Colheita de amostras

Logo após o fabrico, e antes da salga, colheram-se três amostras de um queijo, com recurso a uma sonda, como descrito anteriormente no Capítulo 3.2.2. Este lote de queijos foi seguido ao longo de 14 dias de maturação, com colheitas de amostras nos seguintes tempos de maturação: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 e 14 dias.

3.3.3. Preparação da amostra e das diluições

Na preparação da suspensão-mãe e das diluições decimais foi seguido o mesmo procedimento já descrito no Capítulo 3.2.3.

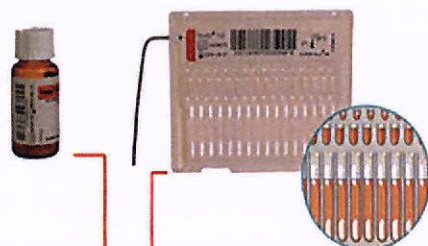
3.3.4. Procedimento para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* - TEMPO® STA

Esta análise foi efetuada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) de Castelo Branco. Após a colheita das amostras, estas eram de imediato transportadas em caixas isotérmicas para o CATAA para a realização da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, usando o método automatizado TEMPO® STA da BioMérieux.

O método automatizado TEMPO® STA permite a obtenção de resultados em 24 horas, ao passo que os métodos tradicionais demoram entre 48 horas a 4 dias. Para além desta vantagem, é um método que não necessita da confirmação de colónias. É um método que se encontra validado pela AFNOR de acordo com o método ISO 16140 vs. ISO 6888-2 para a contagem de *Staphylococcus aureus* em produtos alimentares.

Neste método é utilizado um frasco de meio de cultura e uma carta, específica de cada tipo de teste. O resultado da contagem dos microrganismos no sistema TEMPO® é obtido em 3 etapas, tal como esquematizado na figura 11: 1. Introdução do inoculo da amostra diluída e do meio nos poços da carta TEMPO® utilizando o TEMPO® Filler; 2. Incubação, em que a carta é inserida num suporte utilizado para a incubação; 3. A carta é lida pelo método óptico e interpretada estatisticamente. A leitura do resultado final é obtida no TEMPO® Reader.

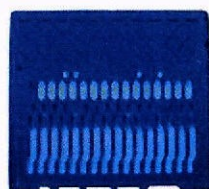
Cada meio contém um indicador fluorescente baseado na fórmula do meio de cultura tradicional e no conhecimento em Bacteriologia.



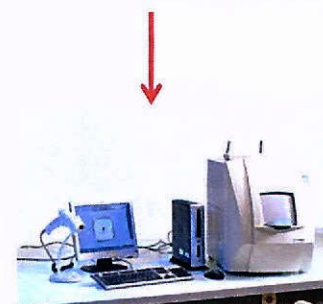
Após o enchimento da carta com a mistura meio de cultura-amostra, durante o tempo de incubação, a bactéria multiplica-se e metaboliza o meio de cultura.



Cada poço corresponde a um tubo de diluição e o tamanho de cada poço corresponde de 1 a 3 níveis de diluição.



De acordo com o número e o tamanho dos poços positivos (fluorescente ou não fluorescente), o sistema TEMPO usa métodos estatísticos para calcular o número de microrganismos presentes no início da amostra.



O resultado final é expresso em UFC/g

Figura 11 - Esquema relativo ao procedimento analítico para a contagem de *Staphylococcus caagulase* positiva usando o método TEMPO® STA (www.biomerieux.pt)

3.4. Análise Estatística dos Dados

Na análise estatística dos resultados, foi utilizado o programa informático Microsoft Office Excel 2007, com recurso ao suplemento *Análise de dados*, nomeadamente para efetuar regressões lineares entre as variáveis em estudo.

4. Apresentação e Discussão dos resultados

4.1. Análise de dados da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* em 31 produtores da região entre 2011 e 2013

Foi recolhido e analisado um total de 445 resultados da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos produzidos na região centro, produzidos a partir de leite cru de ovelha e/ou cabra.

Estes dados foram agrupados em seis classes (<10 UFC/g, ≥ 10 e $<10^2$ UFC/g, $\geq 10^2$ e $<10^3$ UFC/g, $\geq 10^3$ e $<10^4$ UFC/g, $\geq 10^4$ e $<10^5$ UFC/g, $\geq 10^5$ UFC/g) e posteriormente representados num histograma com a distribuição da frequência absoluta (Figura 12). A escolha da primeira classe teve em conta o limite mínimo de deteção do método usado na contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (<10 UFC/g) e a escolha das duas últimas classes teve em conta os limites legais constantes no Regulamento (CE) nº 1441/2007 ($m= 10^4$ UFC/g e $M=10^5$ UFC/g). Nesta representação apenas se teve em conta o número de UFC/g, independentemente do tempo de cura dos queijos analisados e da sua relação com a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*.

Analisando a figura 12, podemos concluir que no conjunto dos 445 queijos, produzidos na região entre 2011 e 2013, as classes mais representadas correspondem aos queijos com uma contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* $\geq 10^3$ e $<10^4$ UFC/g, não ultrapassando os limites legais, seguindo-se a classe correspondente aos queijos com uma contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* <10 UFC/g. A classe com valores $\geq 10^5$ UFC/g é a menos representada, com apenas 12 queijos.

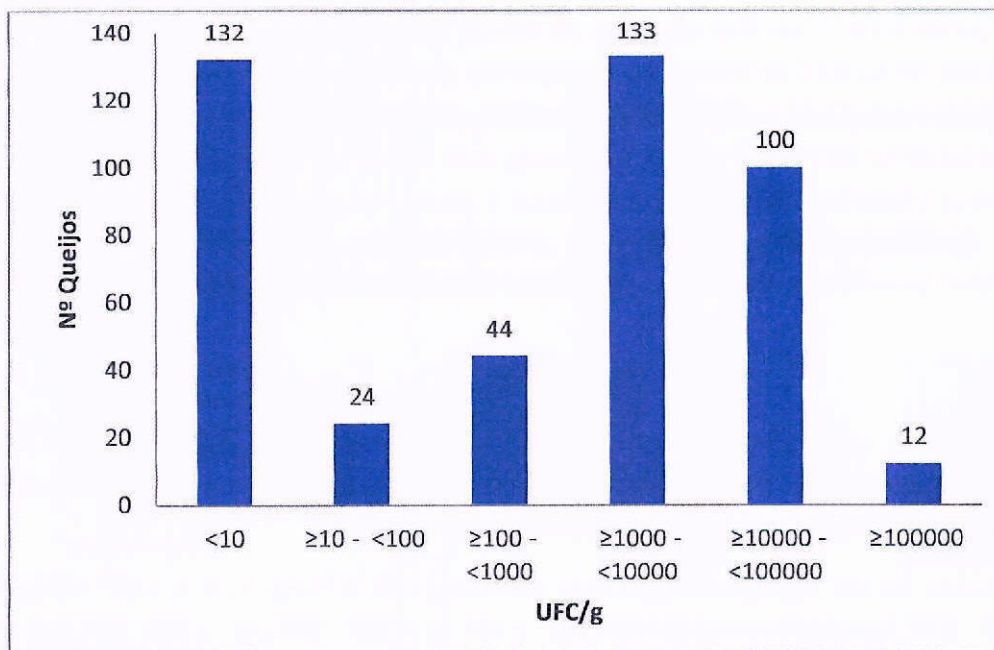


Figura 12 - Valores de *Staphylococcus coagulase* positiva em 445 amostras de queijo da região entre 2011 e 2013

Se olharmos agora para a figura 13, que representa a frequência relativa, verificamos que 75% das 445 amostras de queijo apresenta contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva inferiores a 10^4 UFC/g e, portanto, apresenta qualidade satisfatória. Este valor é inferior ao verificado no estudo levado a cabo por *Little et al.*, (2008), que observaram 96% de amostras de queijo com qualidade microbiológica satisfatória. Da observação da figura 13 verifica-se ainda que 25% das 445 amostras apresenta valores superiores aos limites legais constantes no Regulamento (CE) nº 1441/2007. De particular importância temos o facto de 3% dos queijos apresentarem valores $\geq 10^5$ UFC/g, ultrapassando o limite máximo legal. A presença de *Staphylococcus coagulase* positiva desta ordem de grandeza permite classificar o lote de queijos como tendo qualidade insatisfatória, devendo efetuar-se a deteção de enterotoxinas estafilocócicas. Sabe-se que quando as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, principal representante do grupo *Staphylococcus coagulase* positiva, atinge níveis da ordem de $\geq 10^5$ UFC/g são produzidas enterotoxinas estafilocócicas em quantidade suficiente para originar doença (Seo e Bohach, 2007).

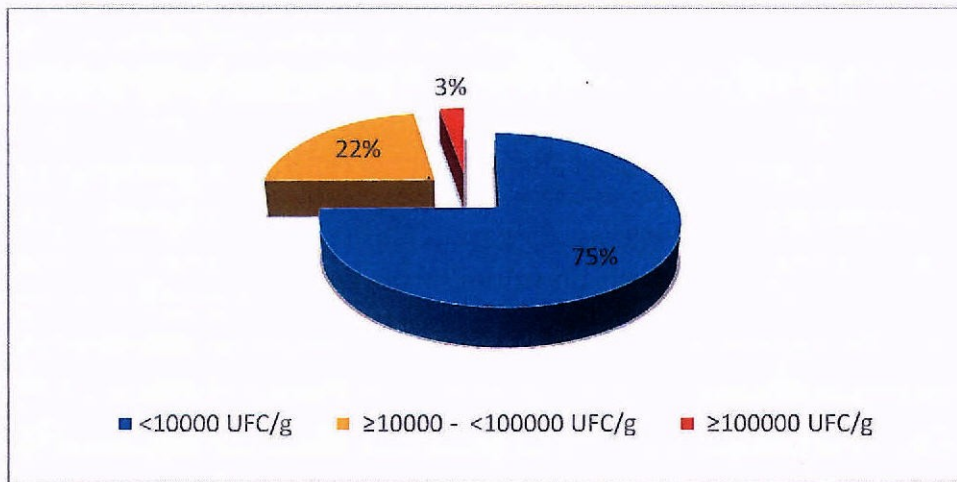


Figura 13 - Frequência relativa da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (UFC/g) em 445 amostras de queijo feito com leite cru da região, entre 2011 e 2013.

Considerando o principal objetivo deste trabalho, o de especificar a fase da maturação do queijo em que a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* é mais elevada, os dados dos 445 queijos foram organizados em função do tempo de maturação no momento em que foi efetuada a colheita de amostras, considerando os dados repartidos em dois grupos: queijos com valores $<10^4$ UFC/g e queijos com valores $\geq 10^4$ UFC/g. A distribuição das frequências relativas encontra-se na figura 14.

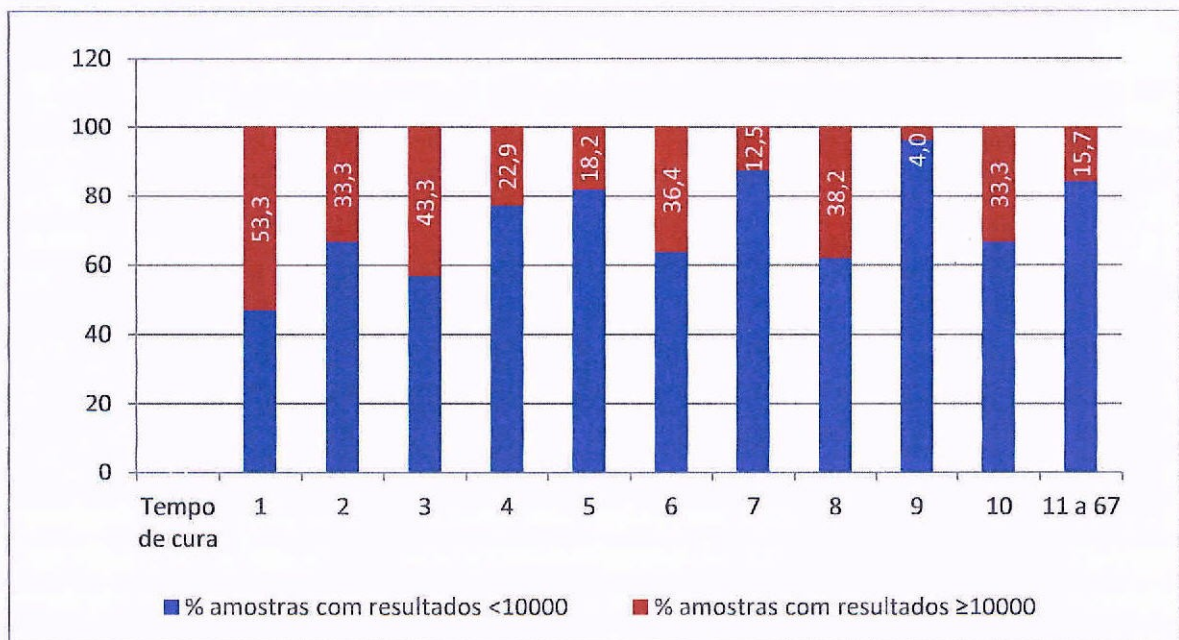


Figura 14 - Frequência relativa de contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* ($<10^4$ UFC/g e $\geq 10^4$ UFC/g) em queijos com diferentes tempos de cura.

Como se pode observar no gráfico da figura 14, a maior percentagem de amostras de queijo com resultados $\geq 10^4$ UFC/g de *Staphylococcus coagulase positiva*, encontra-se ao primeiro dia de cura, seguido do terceiro dia de cura. De facto, da totalidade dos queijos analisados com 1 e 3 dias de cura, 53,3% ($n=24/21$) e 43,3%, respetivamente,

apresentavam contagens superiores ao limite mínimo legal, $m=10^4$ UFC/g, ou ao limite máximo legal, $M=10^5$ UFC/g.

Os resultados observados para o grupo dos queijos com 1 dia de cura leva-nos a pensar que, muito provavelmente, o leite cru usado para o fabrico desse queijo já se apresentava contaminado. De acordo com Jakobsen *et al.* (2011), associado à contaminação inicial de leite cru usado para o fabrico de queijo está um aumento no número de *Staphylococcus aureus* no primeiro dia após o fabrico. Também Meyrand *et al.* (1998), concluíram que durante a preparação dos queijos existem condições para a multiplicação de *Staphylococcus aureus*, realçando a importância da utilização de leite cru com contagens deste grupo de microrganismos inferiores a 10^2 UFC/ml.

Para além da contaminação inicial da matéria-prima, contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase positiva têm como causa provável práticas incorretas de manipulação e de higienização dos utensílios, equipamentos e manipuladores. Uma vez que estamos a tratar de um processo de fabrico de queijo feito com leite cru, e não sofrendo um tratamento térmico que nos possa garantir a eliminação deste microrganismo patogénico, o cumprimento das boas práticas de produção e de higiene é fundamental.

4.2. Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva no Produtor S ao longo de 45 dias de maturação

Na tabela seguinte encontra-se o registo das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva efetuadas a um lote de queijos naturalmente contaminados, produzidos pelo produtor S ao longo de um período de maturação de 45 dias. Para cada tempo de cura foram sempre analisadas cinco amostras. De referir que o leite de ovelha usado para o fabrico deste lote de queijos foi igualmente analisado, tendo-se verificado uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva igual a $2,1 \times 10^2$ UFC/ml.

Considerando a tabela 5, de referir que a média foi obtida considerando o valor de $1,0 \times 10^2$ UFC/g (valor limite mínimo de deteção, tendo em conta o método de análise usado para estas amostras) nos casos em que o resultado obtido foi $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g.

Tabela 5 - Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos produzidos pelo produtor S, ao longo de um período de maturação de 45 dias

Tempo de cura	Número (UFC/g) de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> nas cinco amostras analisadas					Média (UFC/g)	Desvio-padrão
	S1	S2	S3	S4	S5		
0 dias	4,9x10 ⁵	2,8x10 ³	1,0x10 ⁴	1,2x10 ⁵	2,0x10 ⁴	1,2x10 ⁵	2,0x10 ⁵
1 dia	7,3x10 ³	1,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴	4,5x10 ³	1,6x10 ³	6,8x10 ³	3,8x10 ³
3 dias	1,0x10 ⁴	2,7x10 ³	5,0x10 ³	2,0x10 ³	1,3x10 ³	4,2x10 ³	3,5x10 ³
5 dias	3,0x10 ⁴	5,0x10 ³	1,1x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,4x10 ⁴	9,4x10 ³
7 dias	5,0x10 ³	1,0x10 ³	1,0x10 ²	<1,0x10 ²	1,0x10 ³	1,4x10 ³	2,0x10 ³
12 dias	<1,0x10 ²	6,5x10 ²	3,0x10 ³	1,0x10 ⁴	<1,0x10 ²	2,7x10 ³	4,2x10 ³
18 dias	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	1,0x10 ²	0
45 dias	<1,0x10 ²	1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	1,0x10 ²	0

Através da análise dos dados da tabela concluímos que neste produtor os valores máximos para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* se verifica logo nos primeiros dias de produção do queijo e vai descendo gradualmente ao longo do período de cura, mantendo no entanto contagens elevadas até ao dia 5 e dia 7.

A partir do 7º dia, o número de UFC vai diminuindo para valores da ordem de 10³ UFC/g e ao 18º dia todos os queijos analisados apresentavam contagens inferiores a 10² UFC/g, ou seja, inferiores ao número de *Staphylococcus coagulase positiva* inicialmente presente no leite.

Verifica-se que durante a maturação dos queijos o número de *Staphylococcus coagulase positiva* fica reduzido a valores satisfatórios, o que nos pode levar a pensar que as condições em que a maturação dos queijos ocorreu, numa sala com controlo de temperatura e humidade relativa, foram favoráveis à inibição destes microrganismos. De facto, verificou-se que na segunda fase de cura a temperatura da câmara aumentou (de um valor médio de 4,5°C, na primeira fase de cura, para um valor médio de 13°C) e a humidade relativa diminuiu (de um valor médio 83%, na primeira fase de cura, para um valor médio de 77%). O aumento da temperatura verificado é favorável à multiplicação das bactérias lácticas, as quais produzem compostos antimicrobianos, como por exemplo bacteriocinas, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e peróxido de hidrogénio (Medvedová e Valík, 2012).

No entanto, há que referir que o nível de contaminação por *Staphylococcus coagulase positiva* nos queijos com 0 dias, $\geq 10^5$ UFC/g (valor máximo legal, segundo o Regulamento (CE) nº 1447 de 2007), colocam em risco o consumo dos queijos com 45 dias de cura, uma vez que as enterotoxinas estafilocócicas, uma vez produzidas nos primeiros dias, mantêm-se até ao fim do período de maturação exigido, por questões de segurança, para o consumo deste tipo de queijo feito com leite cru. Assim,

e uma vez que vários estudos apontam para a elevada capacidade para este grupo de microrganismos se multiplicar nas primeiras horas de fabrico (Medvedóvá e Valík, 2012; Meyrand *et al.*, 1998), e sendo um queijo laborado com leite cru, não tratado termicamente, deverá haver o maior cuidado na seleção da matéria-prima, o leite cru de ovelha.

Comparando os resultados obtidos aos 45 dias de cura de queijo, com valores médios de 1,9 log₁₀ UFC/g, podemos dizer que, e não obstante ser um queijo com características diferentes, as contagens em Queijo Picante com 40 dias de cura, foram da ordem de 7 log₁₀ UFC/g (Reis e Malcata 2011), mais elevadas do que as obtidas no nosso estudo.

Margolles *et al.* (1996) analisaram várias amostras de queijo com meia cura produzidos por seis produtores, cinco pelo método tradicional e um pelo método industrial, e observaram valores elevados de *Staphylococcus* coagulase positiva com valores da ordem de 10⁶ UFC/g. Relativamente ao nosso produtor Z, os resultados de Margolles *et al.* (1996) são muito mais elevados, já que, considerando os queijos de meia cura os que apresentam 18 dias de cura, obtivemos valores de 1,0×10² UFC/g.

O número de *Staphylococcus* coagulase positiva que se encontra nos primeiros dias de produção neste produtor, juntamente com o facto do leite usado para o fabrico deste lote de queijos apresentar um número de 2,1×10² UFC/ml leva-nos a pensar que a principal causa para os resultados obtidos no queijo nos primeiros dias de cura estão relacionados com a deficiente qualidade do leite cru usado. Fotou *et al.* (2011) levaram a cabo um estudo que tinha como objetivo a caracterização microbiológica de leite cru de ovelha de algumas espécies, obtendo resultados para a contagem de *Staphylococcus aureus* entre 10 e 3,4×10². As principais vias de entrada de microrganismos no leite estão relacionadas quer com fatores externos aos animais (ambiente, água, pessoal encarregue da ordenha, equipamentos e utensílios que entram em contacto direto com o leite) quer com fatores relacionados diretamente com os animais onde se destaca o papel das infeções da glândula mamária (ASAE, 2009), por vezes de natureza subclínica. Segundo Britz e Robinson (2008) e Schimidt (2008), o tipo e quantidade de flora microbiana presente no leite cru pode ser elevada e variada, dependendo de diversos fatores tais como a saúde das fêmeas produtoras de leite (por exemplo mastites), a alimentação animal e as práticas de manejo, os procedimentos de ordenha, os equipamentos e utensílios utilizados na ordenha, os processos de higienização, a estação do ano, o clima, a conservação do leite e o tempo que medeia desde a ordenha até ao seu tratamento ou transformação.

No gráfico da figura 15, confirma-se que o pico máximo do número de *Staphylococcus* coagulase positiva está nos primeiros dias de produção, observando-se um decréscimo no decorrer do tempo de cura, o qual é gradual e constante.

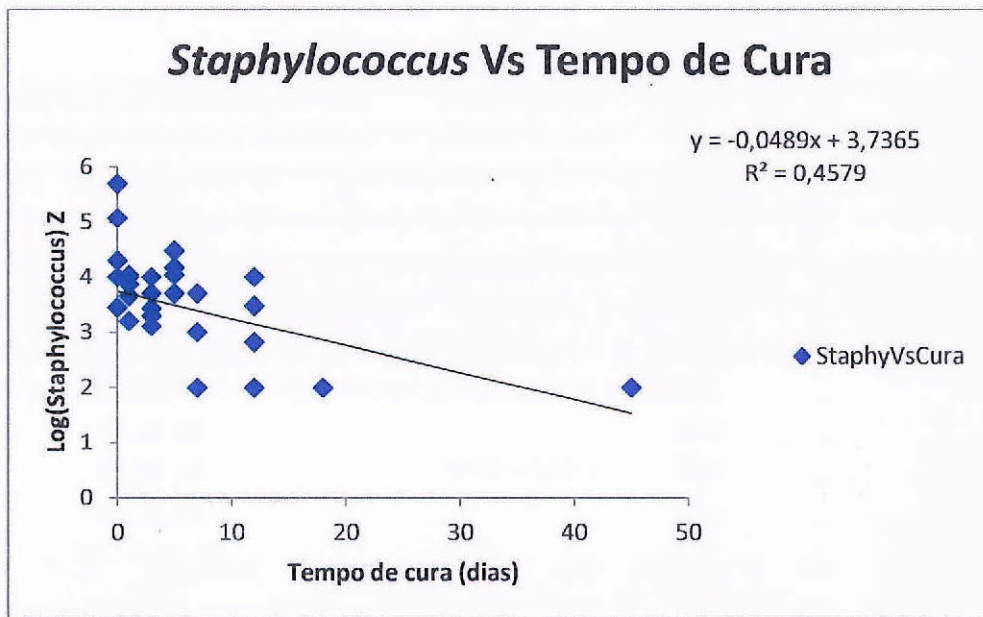


Tabela 6 - Valores de NaCl (%) e a_w e isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva criopreservados em queijos produzidos pelo produtor S

Amostra	Tempo de cura	a_w	NaCl (%)	Média NaCl \pm Desvio-padrão	Ref ^a dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva criopreservados
S1	0 dias	—	0,97	0,94 \pm 0,3113	95, 96, 100, 101
S2		—	1,32		106, 109
S3		—	0,60		113, 114
S4		—	1,16		119, 123, 124, 125, 126, 127
S5		—	0,66		129, 130, 131
S1	1 dias	—	1,51	1,486 \pm 0,677	46, 47
S2		—	0,44		50, 51, 52
S3		—	2,04		54, 55, 56
S4		—	2,12		60, 61, 64
S5		—	1,32		65, 66, 67, 68
S1	3 dias	—	---	2,38 \pm 0,468	3, 6
S2		—	---		8, 10
S3		—	0,36		13, 15, 17, 18, 19, 20
S4		—	2,65		22, 23
S5		—	1,84		29, 30, 31
S1	5 dias	—	1,68	1,216 \pm 0,602	197a, 197b
S2		—	1,51		181, 185
S3		—	0,45		216, 219
S4		—	0,54		221, 222, 223, 224, 225
S5		—	1,90		157, 159, 160a, 204a, 204b
S1	7 dias	—	1,61	0,794 \pm 0,472	178
S2		—	0,73		164
S3		—	0,43		167
S4		—	0,69		—
S5		—	0,51		173
S1	12 dias	—	0,66	0,56 \pm 0,092	—
S2		—	0,49		246, 247
S3		—	0,66		253
S4		—	0,48		262, 263
S5		—	0,51		—
S1	18 dias	—	1,02	0,928 \pm 4,81	—
S2		—	1,17		—
S3		—	1,21		—
S4		—	0,60		—
S5		—	0,64		—
S1	45 dias	84,1	1,18	1,034 \pm 0,117	—
S2		84,2	1,00		367
S3		83,5	1,06		—
S4		83,1	0,86		—
S5		83,1	1,07		—

Através da tabela 6 podemos verificar que a % de cloreto de sódio, que é um fator importante no controlo dos microrganismos, vai aumentando, de um modo geral, ao longo dos dias de cura. Paralelamente verifica-se uma diminuição gradual e constante dos valores de *Staphylococcus coagulase positiva*. Quanto maior for a percentagem de cloreto de sódio, menor a percentagem de humidade no queijo, fator que influencia a multiplicação de *Staphylococcus coagulase positiva*. Assim sendo, ao diminuir a quantidade de humidade no queijo, aumenta a concentração de cloreto de sódio e baixa a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*.

4.3. Estudo da evolução do número de *Staphylococcus coagulase positiva* no Produtor Z ao longo de 45 dias de maturação

Na tabela seguinte encontra-se o registo das contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* efetuadas a um lote de queijos naturalmente contaminados, produzidos pelo produtor Z ao longo de um período de maturação de 45 dias. Para cada tempo de cura foram sempre analisadas cinco amostras. De referir que o leite usado para o fabrico deste lote de queijos foi igualmente analisado, tendo-se verificado uma contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/ml.

Considerando a tabela 7, de referir que a média foi obtida considerando o valor de $1,0 \times 10^2$ UFC/g (valor limite mínimo de deteção, tendo em conta o método de análise usado para estas amostras) nos casos em que o resultado obtido foi $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g.

Tabela 7 - Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos produzidos pelo produtor Z, ao longo de um período de maturação de 45 dias

Tempo de cura	Número (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva nas cinco amostras analisadas					Média (UFC/g)	Desvio-padrão
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5		
0 dias	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	1,0x10 ²	0
1 dia	1,5x10 ⁴	1,0x10 ³	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	3,2x10 ³	6,5x10 ³
3 dias	4,0x10 ³	ND	6,0x10 ⁴	<1,0x10 ²	2,1x10 ⁴	1,7x10 ⁴	2,5x10 ⁴
5 dias	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	5,0x10 ²	1,0x10 ²	6,0x10 ⁴	1,2x10 ⁴	2,6x10 ⁴
7 dias	1,0x10 ⁴	1,0x10 ³	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	2,2x10 ³	4,3x10 ³
12 dias	<1,0x10 ²	5,5x10 ²	2,0x10 ⁴	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	4,1x10 ³	8,8x10 ³
18 dias	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	4,0x10 ³	8,8x10 ²	1,7x10 ³
45 dias	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	1,0x10 ²	0

ND - Não determinado.

Contrariamente ao verificado para o lote de queijos produzido no produtor S, o leite usado na produção do lote de queijos no produtor Z apresentava uma contagem de bactérias do grupo *Staphylococcus* coagulase positiva inferior a 1,0x10² UFC/ml. Este facto parece justificar os valores igualmente inferiores a 1,0x10² UFC/g em 26 das 39 amostras de queijo analisadas ao longo da cura, em particular no dia do fabrico, com todas as amostras com resultados inferiores a 1,0x10² UFC/g.

Podemos verificar que neste caso, em que o leite usado para o fabrico do lote de queijos apresentava uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva inferior a 1,0x10² UFC/ml, a contagem destes microrganismos nunca ultrapassou o limite máximo legal (M=10⁵ UFC/g), ao longo dos 45 dias de cura. O pico máximo de UFC/g no produtor Z ocorreu no 3^o dia, com uma contagem média de 1,7x10⁴ UFC/g, seguindo-se o 5^o dia com uma contagem média próxima, de valor igual a 1,2x10⁴ UFC/g. A partir do 3^o dia, verificou-se uma redução gradual e constante no número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo do tempo de cura, apresentando-se os queijos com 45 dias de cura com valores inferiores a 1,0x10² UFC/g.

O produtor em questão tem um processo tecnológico diferente do usado pelo produtor S, uma vez que a prensagem é feita manualmente e a cura é natural, em salas sem controlo da temperatura e da humidade relativa.

Apesar de, no caso do produtor Z, partirmos de um leite com valores de *Staphylococcus* coagulase positiva inferiores a 1,0x10² UFC/g, verifica-se que, pontualmente, entre o 1^o e o 18^o dia de cura, há queijos que apresentam contagens deste grupo de microrganismos entre 1,0x10² e 6,0x10⁴. Este facto pode justificar-se por uma possível falha na higienização das superfícies que contactam com o queijo e/ou devido à possível presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite a níveis

que, apesar de baixos e inferiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/ml, se podem multiplicar no queijo aumentando assim o seu número para valores superiores ao limite de deteção do método usado neste trabalho.

No caso do produtor Z, os dados não nos permitem estimar um modelo que explique a evolução do número de UFC/g ao longo do tempo de cura (Anexo II).

Na tabela 8 encontram-se os resultados das determinações de NaCl (%) e a_w efetuadas aos queijos do produtor Z, assim como a indicação das culturas crioconservadas.

Tabela 8 - Valores de NaCl (%) e a_w e isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva crioconservados em queijos produzidos pelo produtor Z

Amostra	Tempo de cura	a_w	NaCl (%)	Média NaCl \pm Desvio-padrão	Ref ^a dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva crioconservados
Z1		—	1,2		—
Z2		—	1,76		—
Z3	0 dias	—	2,09	1,926 \pm 0,602	—
Z4		—	2,84		—
Z5		—	1,74		—
Z1		—	1,47		70,71
Z2		—	2,03		—
Z3	1 dias	—	1,3	1,69 \pm 0,718	—
Z4		—	0,91		—
Z5		—	2,74		—
Z1		—	1,76		34
Z2		—	2,18		—
Z3	3 dias	—	0,96	1,602 \pm 0,506	37
Z4		—	1,2		—
Z5		—	1,91		45
Z1		—	1,83		—
Z2		—	1,34		—
Z3	5 dias	—	1,29	1,428 \pm 0,243	205a,205b
Z4		—	1,47		192,193
Z5		—	1,21		191
Z1		—	1,27		228
Z2		—	1,43		201
Z3	7 dias	—	1,45	1,404 \pm 0,169	—
Z4		—	1,22		—
Z5		—	1,65		—
Z1		—	1,45		—
Z2		—	1,39		273,276
Z3	12 dias	—	1,8	1,66 \pm 0,223	277,280,
Z4		—	1,78		—
Z5		—	1,88		—
Z1		—	1,56		—
Z2		—	1,79		—
Z3	18 dias	—	2,16	1,99 \pm 9,662	—
Z4		—	2,18		—
Z5		—	2,26		334
Z1		80,4	2,27		—
Z2		79,4	2,44		—
Z3	45 dias	79,1	2,54	2,492 \pm 0,166	—
Z4		77,6	2,73		—
Z5		—	2,48		—

Relativamente à % de cloreto de sódio nos queijos do produtor S e do produtor Z (Figura 16), verifica-se que, à exceção do 3º dia, os queijos do produtor S apresentam valores médios de NaCl (%) inferiores aos do produtor Z. Dado que ambos os produtores utilizam a salga a seco, estes resultados levam-nos a pensar que a dose de sal usada é superior no caso do produtor S.

Segundo Noronha (2003), o teor de NaCl é um parâmetro estatisticamente significativo para todas as características microbiológicas e físico-químicas devido à sua capacidade de reduzir a atividade da água, a qual afeta o desenvolvimento microbiano. De facto, verifica-se uma relação inversa entre os valores de NaCl e de a_w , para os queijos com 45 dias de cura. No caso do produtor S foi obtido um valor médio de a_w igual a 83,6 e um valor médio de NaCl (%) igual a 1,03 %, ao passo que para o produtor Z foram obtidos os valores médios de 79,13 para o a_w e 2,49% para o NaCl.

Analisando o gráfico, podemos concluir que no produtor S, com cura controlada, os queijos ao terceiro dia apresentam a maior percentagem de NaCl, descendo gradualmente até ao décimo segundo dia, tendo depois disso um ligeiro aumento até ao quadragésimo quinto dia. No caso do produtor Z, com cura natural, a variação de NaCl é pouco acentuada, apresentando sempre um ligeiro decréscimo desde o primeiro até ao sétimo dia, aumentando, a partir daí, até ao quadragésimo quinto dia.

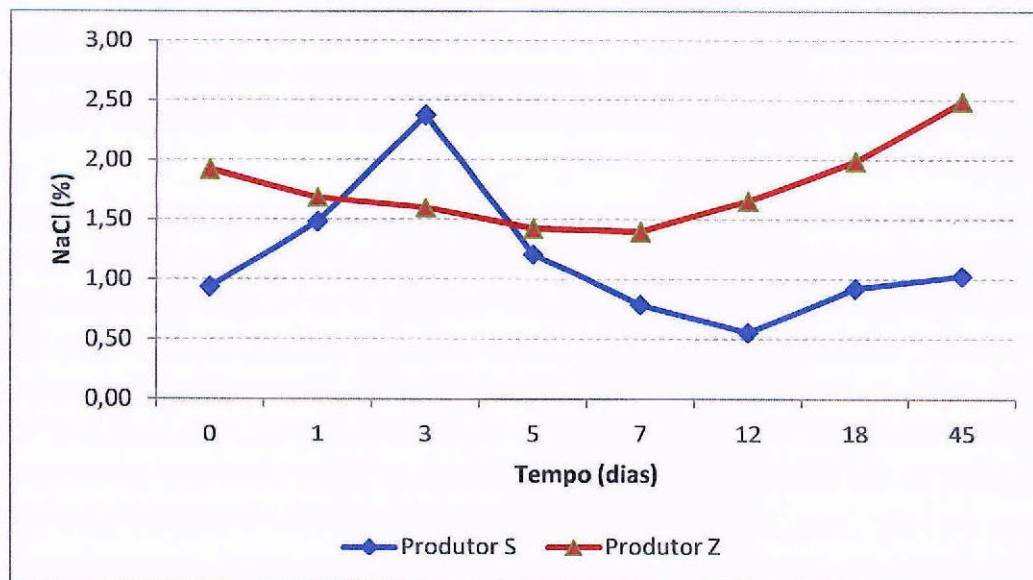


Figura 16 - Valores médios da percentagem de NaCl nos queijos dos produtores S e Z ao longo do tempo de maturação (45 dias).

4.4. Estudo da evolução do número de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo de 14 dias de maturação num lote de queijo artificialmente contaminado

Como referido anteriormente no capítulo “Material e Métodos”, nesta etapa do nosso trabalho foi produzido um lote de 10 queijos a partir de leite cru de ovelha, gentilmente fornecido pelo produtor Z, com o objetivo de estudar a evolução de *Staphylococcus* coagulase positiva num lote de queijos artificialmente contaminado com uma cultura de *Staphylococcus aureus* CIP 5710 ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/ml de inóculo), de forma a obter-se uma concentração final de aproximadamente $5,0 \times 10^1$ UFC/ml no leite. Para verificar se o leite usado no fabrico deste lote de queijo já se apresentava naturalmente contaminado, foi feita a sua análise, obtendo-se um valor de $2,1 \times 10^2$ UFC/ml.

Após a adição do inóculo o leite foi novamente analisado, obtendo-se um valor de *Staphylococcus aureus* igual a $4,1 \times 10^2$ UFC/ml.

Os dez queijos do mesmo lote foram estudados até ao 14^o dia de cura e em cada queijo colheram-se 3 amostras para determinação do número de UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva.

A figura 17 mostra os resultados médios (n=3) da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 e 14 dias de maturação. Nesta figura está assinalado a vermelho a linha que corresponde ao limite superior legal (10^5 UFC/g) e a amarelo a linha que corresponde ao limite inferior legal (10^4 UFC/g) segundo o Regulamento (CE) n^o1441 (2007).

Da análise da figura 17 podemos referir que o pico que corresponde à contagem mais elevada de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) se verifica ao 3^o dia de cura, com um valor de $5,0 \log_{10}$ UFC/g ($1,1 \times 10^5$ UFC/g). É de realçar que até atingir este valor máximo, o número de UFC/g sofreu um aumento gradual desde o dia 0 (dia do fabrico) até ao terceiro dia, passando de $3,9 \log_{10}$ UFC/g para $5,0 \log_{10}$ UFC/g. O maior aumento verifica-se na passagem do dia 0 para o dia 1, com um aumento em apenas 24 horas de 0,8 ciclos logarítmicos. No entanto, o maior aumento verificou-se na passagem do leite (com $2,6 \log_{10}$ UFC/g) para o queijo com 0 dias de cura ($3,9 \log_{10}$ UFC/g). Este aumento de 1,3 ciclos logarítmicos deve-se, muito provavelmente, ao efeito da concentração do número de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo e à multiplicação deste microrganismo nas primeiras horas de fabrico (Medvedová e Valík, 2012).

Podemos constatar que, partindo de um leite com um valor de *Staphylococcus aureus* igual a $4,1 \times 10^2$ UFC/ml, o número deste microrganismo no queijo ultrapassa rapidamente o limite $m=10^4$ UFC/g e o limite $M=10^5$ UFC/g, respetivamente no 1º e no 3º dia de cura. As contagens no 11º dia e no 14º dia mostram uma tendência para um decréscimo, apesar de pouco acentuado, no número de UFC/g.

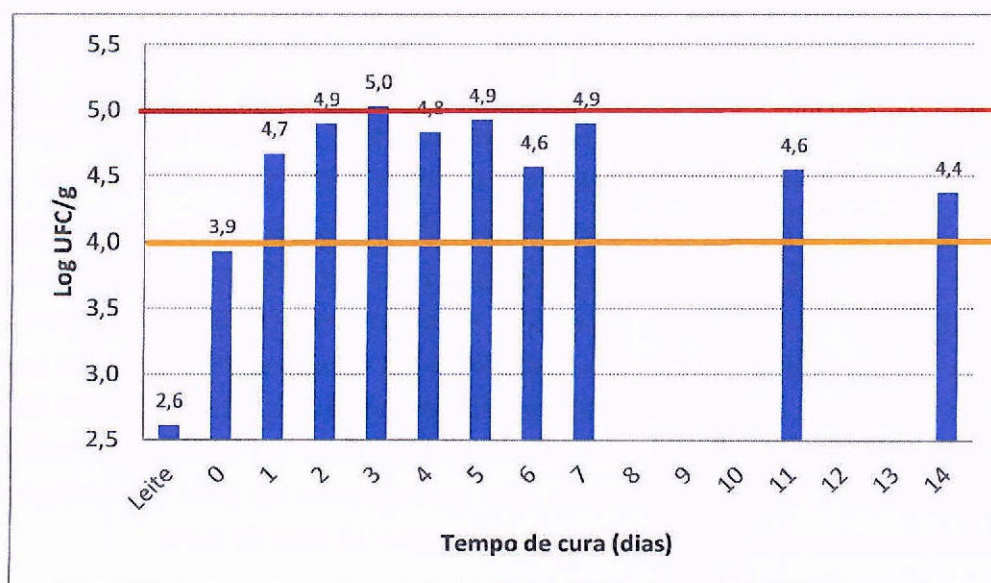


Figura 17 - Evolução do número médio ($n=3$) de UFC/g de *Staphylococcus coagulase* positiva ao longo dos primeiros 14 dias de cura num lote de queijos artificialmente contaminado. A linha vermelha corresponde ao limite superior legal (10^5 UFC/g) e a linha amarela corresponde ao limite inferior legal (10^4 UFC/g), segundo o Regulamento (CE) nº1441 (2007).

As determinações do pH, efetuadas aos queijos com 14 dias de cura, mostram que nesta fase o valor médio de pH da massa e da casca é de, respetivamente, 5,6 e 6,4, enquanto o pH do leite usado no fabrico deste lote era de 6,7. O valor obtido para o pH na massa aos 14 dias permite-nos afirmar que este não é um valor que, por si só, impeça a multiplicação desta bactéria, mesmo combinando o valor médio de pH obtido (5,6) com uma % de NaCl da ordem dos 2%, como pode ser constatado num estudo de regressão logística levado a cabo por Pereira (2013), usando uma estirpe isolada de queijo de ovelha feito com leite cru.

Para além do pH baixo e da elevada % NaCl, podemos considerar outros fatores que justificam uma redução no número de *Staphylococcus coagulase* positiva no queijo ao longo da maturação, como é o caso da produção de bacteriocinas, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e peróxido de hidrogénio pelas bactérias lácticas naturalmente presentes neste tipo de queijos (Medvedová e Valík, 2012).

5. Conclusão

De acordo com a legislação em vigor relativa a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios (Reg.(CE) N^o1441/2007), o queijo fabricado com leite cru deve ser analisado durante o processo de fabrico para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, no momento em que se prevê que o número destes microrganismos é mais elevado. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o momento em que o número de estafilococos é maior, ao longo do tempo de cura.

Para além da análise de 445 dados de 31 queijarias, foi possível estudar a evolução da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva durante 45 dias de cura em dois lotes de queijo feito com leite cru de ovelha naturalmente contaminados, em duas queijarias da região da Beira Baixa. Foi ainda feito um estudo com um lote de queijos produzido com leite cru de ovelha artificialmente contaminado (10 µl de uma cultura jovem de *Staphylococcus aureus*, numa concentração final de 5×10^1 UFC/ml) para determinar também a fase da maturação que corresponde ao pico de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva durante os primeiros 14 dias de cura.

Após a realização deste trabalho podemos concluir que:

- Relativamente às duas queijarias, o pico de maior incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva deu-se no dia 0 no produtor S e no dia 3 no produtor Z. O produtor S apresentou sempre contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva mais altas do que o produtor Z. Os valores mais altos verificaram-se sempre no início do tempo de cura, verificando-se uma redução ao longo do período de maturação, tanto no caso do produtor Z como do produtor S. Verificou-se ainda que a contaminação inicial do leite cru usado para o fabrico do queijo foi um fator determinante que condicionou o valor máximo de *Staphylococcus* coagulase positiva atingido nos primeiros dias de maturação, sendo essencial garantir que o leite cru apresente valores inferiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/ml.
- No caso do estudo do lote de queijos artificialmente contaminados, verificou-se que o 3^o dia de cura foi o que apresentou uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva mais alta. A partir desse dia os valores da contagem mantiveram-se elevados até ao 7^o dia e deste dia até ao 14^o dia sofreram uma ligeira redução.

Fabricar queijo com leite cru implica o assumir uma série de compromissos que visam assegurar um produto final seguro para o consumidor, sem perda das suas características organolépticas. Desde a receção do leite até à obtenção do produto final “queijo”, existem várias etapas que se devem ter em conta para evitar possíveis contaminações. Para isso, deve estar implementado um bom sistema de boas práticas

de higiene no fabrico e devem ser conhecidos todos os fatores microbiológicos e físico-químicos que envolvem a produção do queijo.

Como o *Staphylococcus coagulase positiva* é um microrganismo patogénico e as condições iniciais que envolvem a primeira fase de maturação do queijo são as mais propícias para o seu desenvolvimento (nomeadamente ao nível do pH, da temperatura e da atividade da água), e tratando-se de queijo feito com leite cru, temos que garantir essencialmente a qualidade da matéria-prima, neste caso o leite cru, o qual deverá ter baixas cargas de microrganismos indicadores de falta de higiene.

6. Referências Bibliográficas

- Adams, M. R. & Moss, M. O. 2008. Food microbiology. (3th ed.): The royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, pp. 184-270.
- Alves, L.M.C., Amaral, L.A. Corrêa, M.R. Sales, S.S. 2009. Qualidade Microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - MA. Pesquisa em Foco, v. 17, n.2, p. 01-13, 2009. Disponível em www.repository.utl.pt/bistream/10400.5/2266/1/Evolucao%20. Acedido em Dezembro de 2012.
- André, M. C., M. R. Campos, L. J. Borges, A. Kipnis, F. C. Pimenta, Á. B. Serafini. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. Food Control. 19:200-207.
- ASAE. 2009. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal, pp 330.
- Assumpção, E. G., R. H. Piccoli-Valle, D. Hirsch, L. R. Abreu. 2003. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55(3):366-370. Disponível em www.scielo.br/scielo.php. Acedido em Maio 2013.
- Barros, J.J.C., Azevedo, A.C., Júnior, L.R.F., Taboga, S.R., Penna, A.L.B. 2011. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. Ciênc. Tecnol. Aliment. 31(2): 285-294. Disponível em www.scielo.br/pdf/cta/v31n2/v31n2a02.pdf. Acedido em Novembro 2012.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy Journal, 11:259-274
- Bhatia, A., S. Zahoor. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A review. J. Clin. Diagn. Res. 1(2):188-197.
- Blowey, R., P. Edmondson. 2010. Mastitis Control in Dairy Herds. 2nd ed. CAB International, UK.
- Borges, M.F., Nassu, R. T., Pereira, J.L., Andrade, A.P.C., Kuaye, A.Y. 2008. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, ago, 2008. Disponível em www.scielo.br/pdf/cr/v38n5/a37v38n5.pdf. Acedido em Setembro 2012.
- Britz, J. T., Robinson, K. R. 2008. Advance Dairy Science and Technology, 1ª Edição, Blackwell Publishing Ltd, 312 p.
- Canada, J. 2008. Boas práticas de higiene na produção e transformação de leite. Segurança e Qualidade Alimentar. 16-18. N.º4. Disponível em www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-04/N4-sequali-16.pdf. Acedido em Outubro de 2012.
- Costa, C.D.R.S. 2008. Importância de *Staphylococcus spp.* Produtores de enterotoxinas em alimentos. Disponível em microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/82.PDF. Acedido em Setembro de 2012.
- De Buyser M.-L., Dufour B., Maire M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Int J Food Microbiol. 67 (1-2), 1-17.

Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Diário da República, 1.ª série — N.º 164 — 27 de Agosto de 2007

Decreto-Lei n.º 560/99 de 18 de Dezembro. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Diário da República, 1.ª série A – N.º 293 – 18 de Dezembro de 1999

Dingues, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Minneapolis, 13: 16-34.

Donnelly, C. W.. 2004. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In: Fox, P.F.;McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Ed.). *Cheese chemistry, physics and microbiology*. (pp.541-558). London: Elsevier

Downes, F. P., Ito, K. 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). Washington: American Public Health Association.

Duquenne, M. 2010. Incidence de paramètres technologiques sur l'expression de gènes et la production d'enterotoxines de *Staphylococcus aureus* au cours des 72 h suivant l'emprésurage des laits en fabrication fromagère. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

EN 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*.

European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products, Particular Cheeses. (adopted on 26-27 March 2003)

Fagundes, H., C. A. Oliveira. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*. 34(4):1315-1320.

Fonte, A.I.E. 2012. Queijo de coalho do sertão Alagoano: Enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Biotecnologia Microbiana. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4164/1/dissertação... Acedido em Setembro de 2012.

Fotou, K., Tzora, A., Voidarou, Ch., Alexopoulos, A., Plessas S., Avgeris, I., Bezirtzoglou, E., Akrida-Demertzi, K., 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: 315-319.

Fox, P.; McSweeney, P.; Cogan, T.; Guinee, T. 2004. *Fundamentals of Cheese Science – 3rd edition*. Elsevier, Madison.

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

Fox, P.; Wallace, J. 1997. Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 45: 17 – 85.

Fuquay, J.; Fox, P.; McSweeney, P. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, Academic Press, United Kingdom.

Gabinete de Planeamento e Políticas. 2007. Leite e Lacticínios – Diagnóstico Sectorial. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa. Disponível em http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/diagnosticos/Leite_Diagnostico_Sectorial.pdf. Acedido em Março de 2013.

Kenny, K., R. F. Reiser, F. D. Bastida-Corcuera, N. L. Norcross. 1993. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31(3):706-707.

Jakobsen, R. A., Heggebo, R., Sunde, E. B., Skjervheim, M. 2011. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. Food Microbiology. 28 (2011) 492-496.

Little, A. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., Mclauchlin, J. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiology. 25, 304-312.

Lucheis, S.B. 2012. Vigilância para *staphylococcus aureus* produtores de toxinas em leite. Pesquisa & Tecnologia, vol 9, nº1..

Margolles, A., Rodriguez, A., De Los Reyes-Gavilan, C.G. 1996. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. Journal of Food Protection. 5: 448-561

McSweeney, P. 2007. Cheese problems solved; CRC Press, USA

Medvedová, A., Valík, L. 2012. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. Chapter 4.

Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspar, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Vernozy-Rozand, C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. Journal of Applied Microbiology. 85, 537-544.

Moreira, C.P.M. 2011. Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para queijos. Estudo de Caso: Queijos da Beira Interior. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em www.repository.utl/bistream/10400.5/4065/1/Tese%20. Acedido em Novembro de 2012.

NF EN ISSO 7218. 2007. Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations. AFNOR.

Noronha. 2003. Segurança Alimentar. Queijos tradicionais. Disponível em www.esac.pt/noronha/manuais/seguranca_alimentar_queijos.pdf. Acedido em Julho de 2012.

NP 4400-1. 2002. Microbiologia alimentar. Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (Método corrente).

NP 1598 1983. Queijo. Definição, classificação, acondicionamento e marcação. 2ª Edição, Instituto Português da Qualidade, Caparica.

Nugon-Baudon, L., Mollier, P. 2002. La sécurité alimentaire à l'INRA. Institut National de la Recherche Agronomique. <http://www.inra.fr/sia2002/secualim02.pdf>. Acedido em Julho de 2012.

- Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., Galvez, A. 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*. 2: 2117-2131.
- Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B. & Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 186-193.
- Pereira, A.I.A. 2013. Sobrevivência de *Staphylococcus coagulase positiva* em diferentes condições de temperatura, NaCl e pH. Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Escola Superior Agrária.
- Prodromou, K., Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetakis, E. 2001. Microbiology of "Orinotyri", a ewe's milk cheese from the greek mountains. *Food Micr.* 18:319-328.
- Reis, P.M., Domingos, T.D., Freitas, A.C., Macedo, A.C., Trigueiros, J.J.B.L., Malcata, F.X. 2003. Produção, por Tecnologias Otimizadas, de Laticínios Tradicionais certificados. PROTOLACTIS. Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia. Disponível em repositorio.ucp.pt/bistream/10400.14/6929/1/livro_%5b2001%5d_ESB... Acedido em Julho de 2012.
- Reis, P. J. M., Malcata, F. X. 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*. 101: 122 – 133.
- Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Regulamento (CE) nº 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Sá, F.V., Barbosa, M. (sd). O leite e os seus produtos. 5ª edição. 258-263.
- Sá, M., E., P. Cunha, M., L., R., S. Elias, A., O. Victória, C. Langoni, H. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*. V. 41. n. 5. Disponível em www.scielo.br/scielo.php. Acedido em Abril 2013.
- Schmidt, H. R. 2008. Microbial Considerations Related to Dairy Processing. *Dairy Processing & Quality Assurance* (1st. Edition), 585, pp105-144.
- Seo, K.S., Bohach, G.A. 2007. *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (eds). ASM Press. Washington, DC, 493-518.
- Silva, C.M.F. 2011. *Staphylococcus aureus* no Queijo São Jorge DOP – estudo da dinâmica do crescimento durante o fabrico e de possíveis fontes de contaminação. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores. Disponível em repositorio.uac.pt/.../DissertMestradoCeliaMariaFrutuosoSilva2012.pdf. Acedido em Outubro de 2012.
- Tavaria, F. K., Malcata, F.X. 2000. On the microbiology of Serra de Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Micr.* 17:293-304

www.biomerieux.pt Acedido em Dezembro de 2013

Walstra, P., Wouters, J., Geurts, T. 2006. Dairy Science and Technology. CRC, Second Edition, USA.

Wong, A. C., M. S. Bergdoll. 2002. Staphylococcal food poisoning. In: Foodborne Diseases. 2nd ed. Academic Press, Amsterdam. p.231-248.

Veiga, S.N.T. 2012. Qualidade microbiológica e físico-química de queijos comercializados em Portugal. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Disponível em www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4844/1/Qualidade%20... Acedido em Março de 2013.

Anexos

Anexo I – Análise Estatística dos dados do produtor S

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,676659999
Quadrado de R	0,457868755
Quadrado de R ajustado	0,443602143
Erro-padrão	1,746224666
Observações	40

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	97,86342336	97,863423	32,09373	1,63963E-06
Residual	38	115,8734223	3,0493006		
Total	39	213,7368456			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	8,603618595	0,356946188	24,103405	1,25E-24	7,881018821	9,32621837	7,881018821	9,32621837
Dias	-0,112668008	0,019887974	-5,665133	1,64E-06	-0,152929105	-0,072406911	-0,152929105	-0,072406911

<i>Observação</i>	<i>Previsto Log(Staph.)</i>	<i>Residuais</i>
1	8,603618595	4,498542075
2	8,603618595	-0,666243899
3	8,603618595	0,606721777
4	8,603618595	3,091628427
5	8,603618595	1,299868957
6	8,490950587	0,40467904
7	8,490950587	0,719389785
8	8,490950587	0,814699965
9	8,490950587	-0,079117911
10	8,490950587	-1,113191679
11	8,265614571	0,944725801
12	8,265614571	-0,364607519
13	8,265614571	0,251578621
14	8,265614571	-0,664712111
15	8,265614571	-1,095495027
16	8,040278555	2,268674106
17	8,040278555	0,476914637
18	8,040278555	1,265371997
19	8,040278555	1,575526925
20	8,040278555	1,265371997
21	7,814942539	0,702250653
22	7,814942539	-0,90718726
23	7,814942539	-3,209772353
24	7,814942539	-3,219822688
25	7,814942539	-0,90718726
26	7,251602498	-2,656482648
27	7,251602498	-0,774630135
28	7,251602498	0,75476507

29	7,251602498	1,958737874
30	7,251602498	-2,656482648
31	6,57559445	-1,980474599
32	6,57559445	-1,980474599
33	6,57559445	-1,980474599
34	6,57559445	-1,980474599
35	6,57559445	-1,980474599
36	3,533558231	1,061561619
37	3,533558231	1,071611955
38	3,533558231	1,061561619
39	3,533558231	1,061561619
40	3,533558231	1,061561619

Anexo II - Análise Estatística dos dados do produtor Z

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,236576413
Quadrado de R	0,055968399
Quadrado de R ajustado	0,030454031
Erro-padrão	0,90138506
Observações	39

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	1,782291711	1,782291711	2,1936032	0,147051202
Residual	37	30,06231601	0,812495027		
Total	38	31,84460772			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	2,712575832	0,187410857	14,47395243	8,157E-17	2,332845369	3,092306296	2,332845369	3,092306296
Dias	-0,015276209	0,010314224	-1,48108177	0,1470512	-0,036174813	0,005622394	-0,036174813	0,005622394

<i>Observação</i>	<i>Previsto Log(Staph.)</i>	<i>Residuais</i>
1	2,712575832	0,716940638
2	2,712575832	0,716940638
3	2,712575832	0,716940638
4	2,712575832	0,716940638
5	2,712575832	0,716940638
6	2,697299623	1,478791636
7	2,697299623	0,302700377
8	2,697299623	0,701664428
9	2,697299623	0,701664428
10	2,697299623	0,701664428
11	2,666747204	0,935312787
12	2,666747204	2,111404046
13	2,666747204	0,671112009
14	2,666747204	1,655472091
15	2,636194785	-0,64055959
16	2,636194785	-0,64055959
17	2,636194785	0,062775219
18	2,636194785	0,636194785
19	2,636194785	2,141956465
20	2,605642366	1,394357634
21	2,605642366	0,394357634
22	2,605642366	0,610007172
23	2,605642366	0,610007172
24	2,605642366	0,610007172

25	2,529261319	0,533626124	-
26	2,529261319	0,211101371	-
27	2,529261319	1,771768677	-
28	2,529261319	0,533626124	-
29	2,529261319	0,533626124	-
30	2,437604062	0,441968867	-
31	2,437604062	0,441968867	-
32	2,437604062	0,441968867	-
33	2,437604062	0,441968867	-
34	2,437604062	1,164455929	-
35	2,025146407	0,029511212	-
36	2,025146407	0,029511212	-
37	2,025146407	0,029511212	-
38	2,025146407	0,029511212	-
39	2,025146407	0,029511212	-

Anexo III – Fluxograma de fabrico do produtor Z

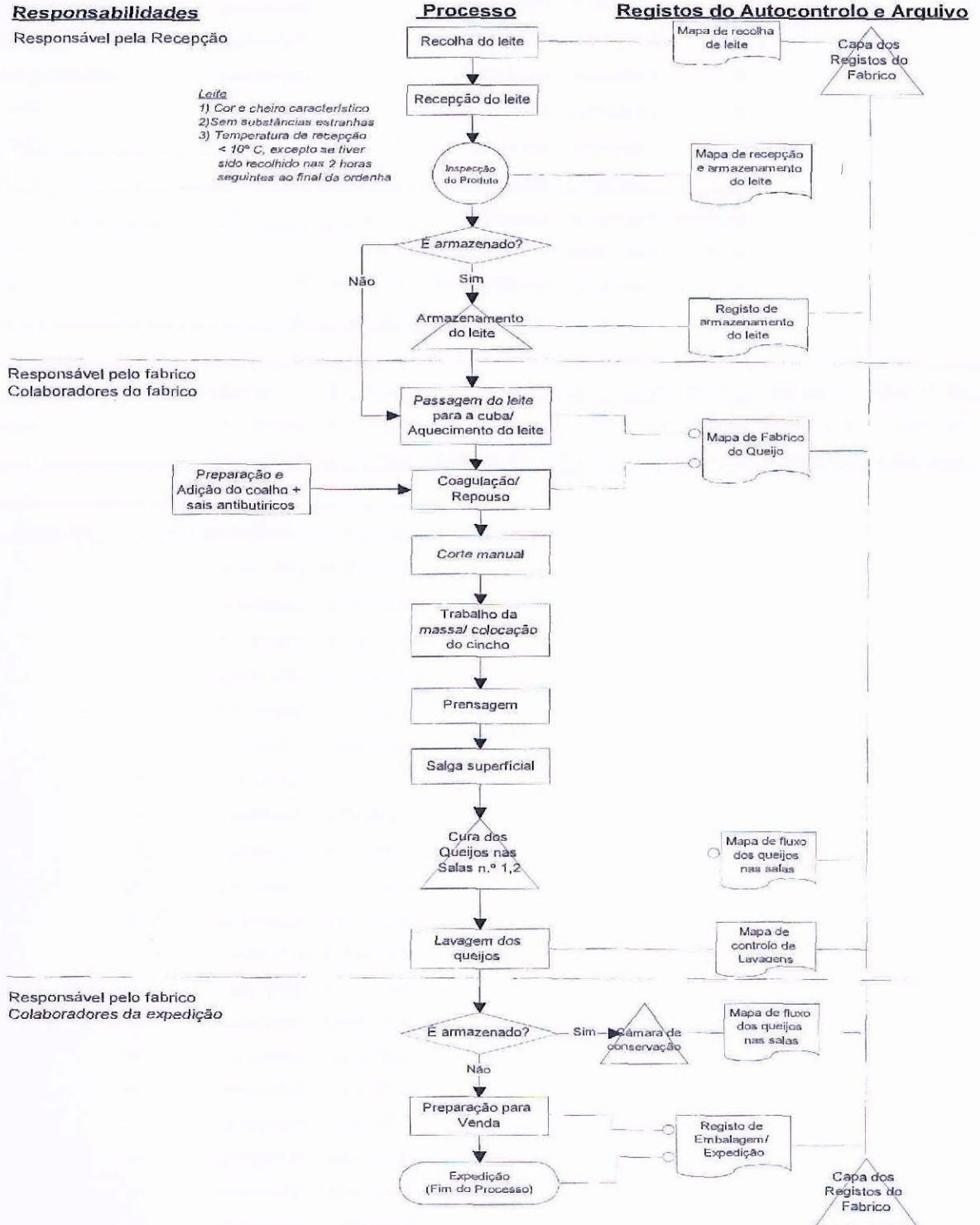
Responsabilidades

Responsável pela Recepção

Leite
 1) Cor e cheiro característico
 2) Sem substâncias estranhas
 3) Temperatura de recepção < 10° C, excepto se tiver sido recolhido nas 2 horas seguintes ao final da ordenha

Processo

Registos do Autocontrolo e Arquivo



Anexo IV - Fluxograma de fabrico do produtor S

