



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Estudo dos defeitos de cor em queijos de ovelha e cabra laborados com leite cru

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Laura Varandas Morais

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Engenheiro Belmiro Abdul Satar Pereira

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado do Instituto Politécnico de Castelo Branco, da Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Engenheiro Belmiro Abdul Satar Pereira da Queijaria da Soalheira de João Duarte Alves e Filhos, Lda.

Julho 2018

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Na concretização deste trabalho contei com o apoio de várias pessoas e instituições às quais estou verdadeiramente grata.

À Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, minha orientadora, por todo o auxílio e toda a dedicação que teve para comigo, pois sem ela este trabalho não seria possível.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos pela total disponibilidade, apoio, paciência, conselhos e por todo o incentivo durante esta fase da minha vida.

Quero agradecer do fundo do coração à Engenheira Manuela Goulão, técnica superior do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelo apoio dado em toda a parte prática deste trabalho e também por todo o carinho durante esta fase.

A todos os professores, colegas e funcionários desta instituição que me acolheu durante este tempo todo, a Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Um obrigado gigante à Queijaria da Soalheira de João Duarte Alves e Filhos Lda, por esta oportunidade, pela cedência das amostras, por ter consentido a realização deste trabalho prático.

Ao meu orientador externo, ao Engenheiro Belmiro Abdul Satar Pereira, por todo o conhecimento transmitido durante o período de estágio, todo o apoio, paciência.

Muito obrigado a todos os meus amigos que me acompanharam e apoiaram nesta fase da minha vida (eles sabem quem são).

Um enorme obrigada ao meu namorado por ter caminhado ao meu lado, pela sua compreensão, paciência e ajuda durante a elaboração deste trabalho, especialmente por esboçar sempre um sorriso todos os dias. Agradeço toda a força, insistência, coragem e apoio que me deu durante este período.

Em especial e de uma importância maior, aos meus pais e irmão, pela sua paciência, compreensão, ajuda, carinho, princípios, conselhos e apoio incondicional transmitidos nesta que foi uma fase complicada e com muitos contratemplos.

A todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram neste trabalho,

A todos o meu sincero e profundo Muito Obrigado!

Resumo

A realização deste trabalho teve como principal objetivo o estudo dos defeitos de cor associados aos queijos laborados com leite cru, em particular o acastanhamento superficial.

Nos ensaios efetuados no âmbito deste trabalho foram usadas culturas de bactérias e de leveduras, previamente caracterizadas como promotoras de defeitos de cor em queijo e identificadas como pertencendo às espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida zeylanoides*.

O primeiro ensaio foi efetuado em leite de ovelha e visou estudar a evolução de diferentes grupos de microrganismos (*Pseudomonas* spp., mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras, mesófilos e bactérias lácticas) ao longo de um período de conservação de 4 dias no frio. Este ensaio foi efetuado em paralelo com amostras inoculadas e não inoculadas, bem como com amostras tratadas (leite fervido, leite adicionado de peróxido de hidrogénio e leite adicionado de culturas lácticas) e não tratadas (leite cru). Deste ensaio conclui-se que a utilização de peróxido de hidrogénio reduz inicialmente a carga microbiana de *Pseudomonas*, psicrotróficos e leveduras, no entanto no caso deste último grupo de microrganismos, este efeito é limitado já que se verifica um aumento do seu número após a adição do peróxido de hidrogénio, atingindo valores superiores aos iniciais ao fim dos 4 dias a 6°C.

O segundo ensaio foi desenhado para verificar se as culturas microbianas que apresentavam produção de pigmentos castanhos em meio de cultura de Agar-Queijo (ensaio *in vitro*) também o faziam em queijos inoculados. Todas as amostras de queijo foram analisadas no início do ensaio (no dia do fabrico) e no fim do período de cura, tendo em conta a contagem (UFC/g de queijo) de *Pseudomonas* spp., mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras. Foi ainda feito o registo do aparecimento de manchas na superfície dos queijos e uma análise por espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR). Concluiu-se que as culturas microbianas que produzem pigmentos castanhos também o fazem em queijos inoculados. Nos queijos não inoculados não houve acastanhamento. Este efeito não se diferenciou entre as diferentes culturas microbianas testadas.

Por último, avaliou-se o ambiente das câmaras de cura de uma queijaria da região, com o objetivo de conhecer a respetiva carga microbiana (ao nível de *Pseudomonas* spp., de bolores e leveduras e de psicrotróficos) e se esta poderia ter alguma influência no desenvolvimento do acastanhamento superficial dos queijos durante o período de cura. Verificou-se que as câmaras de cura são uma importante fonte de contaminação superficial dos queijos durante o tempo em que permanecem nas câmaras de cura, predominantemente por microrganismos psicrotróficos e bolores, mas também por *Pseudomonas* spp. Isolados destes grupos de microrganismos provaram produzir pigmentos castanhos *in vitro*.

Palavras chave

Leite cru, queijo, acastanhamento superficial, peróxido de hidrogénio, *Pseudomonas* spp., leveduras.

Abstract

The main objective of this work was the study of the color defects associated with cheeses processed with raw milk, in particular the surface browning.

In experiments carried out in this work were used cultures of bacteria and yeast previously characterized as promoters of color defects in cheese and identified as belonging to the species *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida zeylanoides*.

The first experiment was carried out in sheep's milk and aimed to study the evolution of different groups of microorganisms (*Pseudomonas* spp., Mesophiles, psychrotrophs, molds and yeasts, mesophiles and lactic acid bacteria) during a cold storage period of 4 days. This test was carried out in parallel with inoculated and uninoculated samples, as well as with treated samples (boiled milk, milk added with hydrogen peroxide and milk added from lactic cultures) and untreated (raw milk) samples. From this assay we conclude that the use of hydrogen peroxide initially reduces the microbial load of *Pseudomonas*, psychrotrophs and yeasts, however in the case of this last group of microorganisms, this effect is limited since there is an increase in its number after addition of hydrogen peroxide, reaching above initial values at the end of 4 days at 6 ° C.

The second assay was designed to verify if the microbial cultures that had brown pigment production in Agar-Cheese culture medium (in vitro assay) also did so on inoculated cheeses. All cheese samples were analyzed at the start of the test (on the day of manufacture) and at the end of the curing period, taking into account the count (UFC / g cheese) of *Pseudomonas* spp., Mesophiles, psychrotrophs and molds and yeasts. It was also recorded the appearance of spots on the cheeses surface and an analysis by Near Infrared Spectroscopy (NIR). It was concluded that microbial cultures that produce brown pigments also do so in inoculated cheeses. In uninoculated cheeses there was no browning. This effect did not differ between the different microbial cultures tested.

Finally, it was evaluated the environment of the curing chambers of a cheese factory in the region, in order to know the respective microbial load (at the level of *Pseudomonas* spp., Molds and yeasts and psychrotrophs) and if this could have any influence in the development of surface browning of the cheeses during the curing period. It has been found that curing chambers are an important source of surface contamination of cheeses during the time they remain in the healing chambers, predominantly by psychrotrophic microorganisms and molds, but also by *Pseudomonas* spp. Isolates from these groups of microorganisms have proven to produce brown pigments in vitro.

Keywords

Raw milk, cheese, surface browning, hydrogen peroxide, *Pseudomonas* spp., yeasts.

Índice geral

I.	Introdução	1
II.	Revisão Bibliográfica.....	2
1.	Microrganismos associados ao leite cru de ovelha	2
1.1	Considerações gerais	2
1.2	Microrganismos aeróbios totais a 30°C	3
1.3	Microrganismos psicotróficos.....	3
1.4	Bolores e leveduras	4
1.5	Bactérias lácticas	5
1.6	<i>Pseudomonas</i> spp. e outras bactérias Gram negativas e oxidase positiva	6
1.7	Bactérias coliformes.....	8
1.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.9	<i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.10	Enterococos.....	9
2.	Queijo	10
2.1	Considerações gerais	10
2.2	Tecnologia do fabrico do queijo	11
2.3	Produção de pigmentos e escurecimento da casca do queijo	12
III.	Material e Métodos	14
1.	Evolução da carga microbiana de leite de ovelha com diferentes tratamentos, ao longo de 4 dias de conservação no frio.....	14
1.1	Prévia caracterização microbiológica de leite cru de ovelha	14
1.2	Tratamentos efetuados ao leite de ovelha	14
1.3	Inoculação de leite de ovelha com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor	15
1.4	Análises microbiológicas.....	16
2.	Evolução do acastanhamento ao longo da maturação em queijos de ovelha inoculados com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor	18
2.1	Análises microbiológicas ao queijo no início do ensaio	18
2.2	Preparação e inoculação dos queijos para o ensaio de escurecimento	19
3.	Análise microbiológica ao ambiente das câmaras de cura da queijaria	21
4.	Caracterização das amostras por espectroscopia do infravermelho	24
5.	Análise estatística dos resultados.....	24
IV.	Resultados e Discussão	26

1. Estudo dos defeitos de cor em queijos	26
1.1 Prévia caracterização microbiológica de leite cru de ovelha	26
1.2 Evolução do número de <i>Pseudomonas</i> ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	27
1.3 Evolução do número de mesófilos ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	28
1.4 Evolução do número de leveduras ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	29
1.5 Evolução do número de psicrotróficos ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	30
1.6 Evolução do número de bactérias lácticas ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	32
1.7 Evolução do número de bolores ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C	33
1.8 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do leite cru	36
2. Estudo do acastanhamento em queijos de ovelha	36
2.1 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do queijo no t_0 e após os 40 dias de cura	43
3. Análise ao ambiente das câmaras de cura da queijaria	45
3.1 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do ambiente das câmaras de cura da queijaria.....	47
4. Caracterização das amostras por espectroscopia do infravermelho Espetros NIR e diferenciação das amostras	50
V. Considerações Finais e Conclusão	54
VI. Referências Bibliográficas.....	55

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema geral que representa o ensaio efetuado ao leite ao longo de 4 dias a 6°C.....	15
Figura 2 – Queijo de ovelha após colheita de uma amostra para análise do centro com uma sonda cilíndrica.....	18
Figura 3 – Queijo de ovelha Q1 cortado em fatias devidamente identificadas com o tratamento a que vão ser sujeitas (Q1-P1, Q1-P2, Q1-P3, Q1-L1, Q1-L2, Q1-PL, Q1-NI1, Q1-NI2).....	19
Figura 4- Esquema do ensaio da evolução do acastanhamento ao longo da maturação em queijos de ovelha inoculados com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor.....	21
Figura 5- Câmara de humidificação (C1) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C1, 2C1, 3C1, 4C1).....	23
Figura 6- Câmara de secagem (C2) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C2, 2C2, 3C2, 4C2).....	23
Figura 7- Câmara de conservação (C3) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C3, 2C3, 3C3, 4C3).....	23
Figura 8- Contagem de <i>Pseudomonas</i> (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.....	27
Figura 9- Contagem de mesófilos (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias. A linha a roxo é o limite de contagem de mesófilos segundo o Regulamento (CE) N° 853/2004 de 29 de Fevereiro.....	28
Figura 10- Contagem de leveduras (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.....	29
Figura 11- Contagem de psicrotróficos (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.....	31
Figura 12- Gráfico da média da contagem de leveduras (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.....	39
Figura 13- Gráfico da média da contagem de bolores (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.....	39
Figura 14- Gráfico da média da contagem de psicrotróficos (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.....	40
Figura 15- Gráfico da média da contagem de <i>Pseudomonas</i> (Log UFC/g) nos cinco queijos	

ao fim dos 40 dias de cura.....	41
Figura 16- Gráfico da média da contagem de mesófilos (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.....	41
Figura 17- Análise de componentes principais dos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.....	42
Figura 18 - Resultado em King B e Agar queijo com e sem tirosina de colónias características de <i>Pseudomonas</i> dos queijos no to.....	43
Figura 19 - Resultado Agar queijo com e sem tirosina e King B de colónias características de <i>Pseudomonas</i> dos queijos após 40 dias de cura.....	44
Figura 20 - Aspeto visual do queijo 5 após 40 dias de cura.....	45
Figura 21 - Contagem de bolores e leveduras do ambiente da câmara 1, câmara 2 e câmara 3 da queijaria.....	46
Figura 22 - Contagem de <i>Pseudomonas</i> do ambiente da câmara 1, câmara 2 e câmara 3 da queijaria.....	46
Figura 23 - Contagem de psicrotróficos do ambiente das três câmaras de cura da queijaria.....	46
Figura 24 - Resultado em King B e Agar queijo sem e com tirosina de colónias características de <i>pseudomonas</i> do ambiente das câmaras de cura da queijaria.....	48
Figura 25 - Espectro médio de uma amostra de queijo analisado junto à casca (12000 - 4000 cm^{-1}).....	50
Figura 26- Primeira e segunda derivada.....	51
Figura 27 - Análise de componentes principais (ACP) aos queijos cujo espectro foi adquirido na casca do queijo.....	52
Figura 28- Análise de componentes principais (ACP) aos queijos cujo espectro foi adquirido no interior do queijo.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação da consistência do queijo em função da percentagem de humidade.....	10
Tabela 2 – Classificação do queijo quanto à matéria gorda em função da percentagem no extrato.....	11
Tabela 3- Culturas microbianas inoculadas nas amostras de leite.....	16
Tabela 4 – Procedimentos das análises microbiológicas.....	17
Tabela 5 — Resultados da análise microbiológica efetuada ao leite cru de ovelha.....	26
Tabela 6- Contagem de bactérias lácticas (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.....	32
Tabela 7- Contagem de bolores (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.....	34
Tabela 8- Resultado dos API 20 NE no leite cru de ovelha com tratamentos.....	36
Tabela 9- Valores (média Log UFC/g ± desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos no t_0	37
Tabela 10- Valores (média Log UFC/g ± desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos com 40 dias de cura inoculados.....	38
Tabela 11- Valores (média UFC/g ± desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos com 40 dias de cura não inoculados.....	38
Tabela 12- Resultado dos API 20 NE nos queijos no t_0	43
Tabela 13- Resultado dos API 20 NE nos queijos aos 40 dias.....	44
Tabela 14 - Contagem (n° UFC) dos microrganismos do ambiente das câmaras de cura da queijaria.....	45
Tabela 15- Caracterização de isolados de psicrotróficos do ambiente das câmaras de cura (C1 e C2).....	47
Tabela 16- Resultados do teste de Hidróxido de Potássio (KOH 3%).....	48
Tabela 17- Caracterização de isolados de <i>Pseudomonas</i> do ambiente das câmaras de cura (C1 e C2).....	49
Tabela 18- Resultado dos API 20 NE do ambiente da queijaria.....	50

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ACP: Análise de componentes principais

ALOA: *Ottaviani and Agosti Agar*

AN: Agar nutritivo

BAL: Bactérias do ácido láctico

BHI Broth: *Brain Heart Infusion Broth*

BP: Baird- Parker Agar

DRBC Agar: *Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar*

L I: Leite cru de ovelha inoculado

L NI: Leite cru de ovelha não inoculado

L: Levedura

LAB I: Leite cru de ovelha com flora Danica + lisozima, inoculado

LAB NI: Leite cru de ovelha com flora Danica + lisozima, não inoculado

LF I: Leite de ovelha fervido inoculado

LF NI: Leite de ovelha fervido não inoculado

LP I: Leite cru de ovelha com peróxido de hidrogénio (H₂O₂), inoculado

LP NI: Leite cru de ovelha com peróxido de hidrogénio (H₂O₂), não inoculado

MRS: *Man Rogosa Sharpe Agar*

NI: Não inoculado

P: *Pseudomonas*

PAB: *Pseudomonas Agar Base*

PCA: *Plate Count Agar*

PDA: *Potato Dextrose agar*

PL: *Pseudomonas* + levedura

TSYEA: *Tryptone Soy Yeast Extract Agar*

VRBL Agar: *Violet Red Bile Lactose Agar*

I. Introdução

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial do seu fabrico. Os antigos gregos garantiam a descoberta do queijo a Aristeu, rei da Arcádia, filho de Apolo e Cirene. Uma lenda atribui-a a um nómade árabe que, numa das suas jornadas pelo deserto, teria levado como alimento tâmaras secas e um pouco de leite num cantil feito de estômago seco de carneiro. Depois de um certo tempo, quando foi beber o leite, descobriu que ele se tinha transformado num sólido de sabor agradável. Independente de como ele foi descoberto, porém, o que se sabe é que o queijo tem sido utilizado ao longo do tempo como uma forma de preservação do leite (Perry, 2004).

Os queijos portugueses mais apreciados são produzidos a partir de leite cru de ovelha e/ou cabra, estando por este motivo muito dependentes da qualidade da matéria-prima, nomeadamente da sua componente microbiológica. Quando a qualidade microbiológica do leite cru não é a adequada, surgem frequentemente defeitos do queijo os quais, juntamente com outros defeitos de origem não microbiana, alteram as propriedades comerciais e a tipicidade do produto e traduzem-se em graves prejuízos financeiros para os produtores. Um dos defeitos que aparece frequentemente em queijos tradicionais é o acastanhamento da superfície ao longo da etapa de maturação. O estudo deste problema torna-se importante e interessante de modo a delinear medidas para combater o problema indesejado ao longo do processo de produção do queijo.

O acastanhamento da superfície é um defeito comum nos queijos produzidos com leite cru. Acredita-se que a levedura *Yarrowia lipolytica* seja responsável por essa descoloração nos queijos de ovelha tradicionais portugueses (Carreira *et al.*, 2001), a par de bactérias do género *Pseudomonas* (Ferreira, 2017).

Assim, este estudo teve como principal objetivo o estudo dos defeitos de cor associados aos queijos laborados com leite cru, como é o caso do acastanhamento superficial no queijo, como forma de contribuir para a futura implementação de medidas que conduzam à sua eliminação.

II. Revisão Bibliográfica

1. Microrganismos associados ao leite cru de ovelha

1.1 Considerações gerais

O leite é um alimento altamente nutritivo que pode ser obtido de uma variedade de fontes animais para o consumo humano e para transformação. No entanto, o seu alto teor em nutrientes, que inclui proteínas, gorduras, hidratos de carbono, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais, bem como um pH quase neutro e uma atividade de água alta, fornece um ambiente ideal para o crescimento de muitos microrganismos (Quigley *et al.*, 2013).

A microflora natural do leite cru é um fator que expressa as suas características sensoriais. Assim, o sabor particular e as propriedades organolépticas típicas dos queijos de leite cru estão associados a atributos específicos do leite cru, associados à raça e à nutrição dos animais, ao processo tradicional de produção de queijos e à microbiota natural. A carga microbiana na glândula mamária de um animal saudável é baixa e a aplicação de boas práticas durante a ordenha e durante o processo de fabrico do queijo previne a contaminação, assim como mantém a microflora natural para conferir as características particulares do leite (Fotou *et al.*, 2011).

O microbiota natural benéfico do leite, que inclui maioritariamente *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, preserva o queijo e, em muitos casos, compete com as bactérias patogénicas. Apesar de o leite poder ser uma fonte de microrganismos indesejáveis do ponto de vista de segurança microbiológica, ele também é fonte de bactérias lácticas. Estas bactérias contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do produto. Elas fermentam hidratos de carbono produzindo ácido e são consideradas as principais responsáveis pela acidificação do queijo, favorecendo a sua conservação. Outras atividades metabólicas destes microrganismos também permitem aumentar a vida útil dos alimentos onde se encontram (Medici *et al.*, 2004, citados por Veiga, 2012).

O leite cru pode ser utilizado no fabrico de queijos curados desde que sejam respeitados os períodos de cura e utilizadas as boas práticas de fabrico, que incluem a exigência de só utilizar leite de alta qualidade e a rigorosa higiene no local de produção dos queijos (Perry, 2004).

A boa qualidade microbiológica do leite é fundamental para a preparação de bons queijos. Para que o leite mantenha a qualidade microbiológica durante 72h, é necessário que o gado seja saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios usados e o arrefecimento do leite a temperaturas entre 0-4°C, com início no máximo duas horas após a ordenha. Estas práticas não significam ausência de bactérias no leite, pois o leite é um ótimo meio para o crescimento destes microrganismos (Perry, 2004).

Em termos organolépticos, os queijos produzidos com leite cru possuem um intenso e forte sabor, por comparação com os queijos feitos com leite pasteurizado. As características referidas atrás devem-se à presença no queijo feito com leite cru de vários microrganismos: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* spp.,

Brevibacterium spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Acinetobacter* spp. (Masoud *et al.*, 2012).

Relativamente aos microrganismos dominantes no leite cru, estes geralmente incluem espécies de bactérias lácticas (particularmente dos géneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*), *Pseudomonas* spp., *Micrococcaceae* (*Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.) e leveduras. Outros grupos microbianos presentes no leite cru incluem os géneros *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria* e a família *Enterobacteriaceae* (Lafarge *et al.*, 2004). As bactérias mais comuns de provocar problemas na indústria dos produtos lácteos são *Streptococcus agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, bactérias coliformes, *Pseudomonas* spp. e *Corynebacterium pyogenes*. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni* são agentes patogénicos presentes no leite cru e produtos lácteos que causam uma maior preocupação (Bore e Langsrud, 2005).

O leite apresenta naturalmente compostos com atividade antimicrobiana, como é o caso da lactoferrina e da lactoperoxidase. Se em alguns casos a atividade antimicrobiana do leite é antagonizada por outros constituintes do leite, como o efeito do citrato e do bicarbonato sobre a atividade da lactoferrina, noutros casos verifica-se o contrário. É o caso da estimulação da atividade da lactoperoxidase através da adição de peróxido de hidrogénio exógeno. Esta propriedade foi investigada como um meio de preservar o leite cru em países em desenvolvimento onde a temperatura ambiente é elevada e a refrigeração não é frequentemente disponível (Adams e Moss, 2008).

1.2 Microrganismos aeróbios totais a 30 °C

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C, ou resumidamente contagem de mesófilos, é muito importante em Microbiologia Alimentar uma vez que pode ser utilizada para avaliar a qualidade higiénica de um modo geral.

Este grupo de bactérias tem grande importância por incluir a maioria dos contaminantes do leite, tanto microrganismos deteriorantes como patogénicos. Podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20 a 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40°C (Lorenzenti, 2006). A refrigeração do leite a uma temperatura inferior ou igual a 4°C tem como principal objetivo controlar a multiplicação destes microrganismos (Santana *et al.*, 2001).

1.3 Microrganismos psicrotróficos

Os microrganismos psicrotróficos, maioritariamente do grupo das bactérias, são os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e dos seus derivados. A ação de deterioração dos microrganismos psicrotróficos deve-se essencialmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam respetivamente a proteína e a gordura do leite. A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive à pasteurização, porém, muitas das suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir mesmo ao tratamento UHT (*Ultra High Temperature*) e permanecer ativas (Arcuri *et al.*, 2008).

A deterioração do leite resultante da contaminação de produtos lácteos com microrganismos psicrotróficos resulta em perdas significativas para a indústria de alimentos e é uma preocupação particular da indústria de laticínios. O leite é geralmente armazenado a baixas temperaturas por 2 a 5 dias antes do tratamento térmico ou outro processamento (Meng *et al.*, 2017).

Os microrganismos psicrotróficos que são capazes de crescer no leite a temperaturas próximas de 0°C são representados por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Do grupo das bactérias Gram-negativas psicrotróficas fazem parte espécies dos géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium*, e do grupo das bactérias Gram-positivas psicrotróficas fazem parte espécies dos géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (Sorhaug e Stepaniak, 1997).

A microbiota do leite cru inclui microrganismos psicrotróficos, pertencentes principalmente ao género *Pseudomonas*, responsáveis pela deterioração do leite e produtos lácteos devido à sua capacidade para produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes ao calor (Ercolini *et al.*, 2009). *Pseudomonas* spp. geralmente não representam mais de 10% da totalidade dos microrganismos presentes no leite cru (Sorhaug e Stepaniak, 1997).

As espécies de *Pseudomonas* mais frequentemente detetadas no leite e nos produtos lácteos são *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* e *P. lundensis*. *Pseudomonas* spp. podem crescer num intervalo de temperatura de 4-42°C, com uma temperatura ótima de crescimento superior a 20°C (Meng *et al.*, 2017).

1.4 Bolores e leveduras

Os bolores são fungos multicelulares, cujas hifas proliferam em ambientes associados à superfície de alimentos e bebidas, multiplicando-se predominantemente através da reprodução vegetativa. Como resultado, estes microrganismos são mais visíveis do que as leveduras e as bactérias mais comuns que tendem a crescer dentro das matrizes alimentares. Os bolores são microrganismos aeróbios e não crescem em condições onde o oxigénio é limitado (Wilkins, 2014).

A sobrevivência e o crescimento dos fungos são afetados pelos mesmos fatores físicos e químicos que afetam as bactérias: atividade de água (a_w), pH, temperatura, tensão de oxigénio, presença de sal e inibidores ou conservantes. Os esporos de fungos podem sobreviver a condições ambientais adversas, como baixo a_w , que não suportam a multiplicação do fungo (Decker, 2014).

Os bolores têm a capacidade de se multiplicar numa vasta faixa de temperaturas, geralmente entre 5°C-35°C, mas algumas espécies podem crescer acima ou abaixo dessa faixa. *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Thamnidium* podem crescer em temperaturas de refrigeração. *Cladosporium herbarum* pode até desenvolver-se a temperaturas tão baixas quanto -8°C. Os fungos termotolerantes, como *Aspergillus flavus* e *A. niger*, podem crescer entre 8°C - 45°C e estão entre os bolores mais destrutivos conhecidos. Alguns bolores resistentes ao calor, como *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fisheri*, podem sobreviver ao processo de pasteurização (Decker, 2014).

Os bolores podem crescer bem nas superfícies dos queijos quando o oxigénio está presente, sendo o pH baixo seletivo para eles. Em queijos embalados, o crescimento de fungos é limitado pela disponibilidade de oxigénio, mas alguns bolores podem crescer sob baixa tensão de oxigénio. Bolores frequentemente encontrados em queijos embalados a vácuo incluem *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. *Penicillium* é o género de bolor que mais frequentemente ocorre em queijos (Ledenbach e Marshall, 2009).

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem frequentemente por um processo conhecido como gemulação. As leveduras tendem a multiplicar-se dentro das matrizes alimentares, quer em condições de aerobiose quer de anaerobiose (Wilkins 2014). Multiplicam-se a valores de pH baixo e podem produzir aromas anormais (Ledenbach e Marshall, 2009).

As leveduras são uma das principais causas da deterioração dos leites fermentados e iogurtes (Ledenbach e Marshall, 2009). O baixo pH e o perfil nutricional da maioria dos queijos são favoráveis à multiplicação de leveduras deteriorantes. As embalagens de queijo embalado em vácuo ou em atmosferas modificadas podem opar como resultado da grande quantidade de CO₂ produzida por leveduras. As leveduras contaminantes comuns dos queijos incluem *Candida* spp., *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* e *Pichia* spp. (Ledenbach e Marshall, 2009).

1.5 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas, também designadas bactérias do ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria*, LAB), encontram-se bastante distribuídas na natureza e ocorrendo naturalmente na microbiota nativa do leite cru (Guessas e Kihal, 2004). São bacilos ou cocos Gram-positivos, não esporulados. A maioria são anaeróbios aerotolerantes e não produzem catalase nem oxidase. Absorvem oxigénio através da intervenção das flavoproteínas e isso é usado para produzir peróxido de hidrogénio e/ou reoxidar o dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) produzido durante a desidrogenação dos açúcares. A energia celular é derivada da fermentação de hidratos de carbono para produzir principalmente ácido láctico (Adams e Moss, 2008). Este grupo é composto por 13 géneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Weissella* (Jay *et al.*, 2005).

As bactérias do ácido láctico contribuem para o aumento do volume de alimentos fermentados em todo o mundo, especialmente em alimentos contendo probióticos ou bactérias promotoras da saúde (Soomro *et al.*, 2002). As bactérias lácticas são usadas em vários alimentos fermentados desde a antiguidade (Naidu *et al.*, 1999).

As bactérias lácticas são muitas vezes inibidoras de outros microrganismos e esta é a base da sua capacidade para assegurar a manutenção da qualidade e segurança de muitos produtos alimentares fermentados. Os principais fatores que contribuem para essa inibição são: pH baixo, ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogénio, etanol, diacetil, esgotamento de nutrientes e potencial redox baixo. Do conjunto de fatores referidos atrás, os mais importantes são a produção de ácido láctico e ácido acético e a conseqüente diminuição do pH (Adams e Moss, 2008). De facto, a fermentação envolvendo bactérias lácticas resulta na acumulação de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, como um dos principais produtos finais do metabolismo de hidratos de carbono, produzido a partir do piruvato. A

acumulação de ácido láctico e a redução do pH do meio resultam numa atividade inibidora de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Naidu *et al.*, 1999).

Os *Lactobacillus* são subdivididos em três grupos: homofermentadores obrigatórios, heterofermentadores facultativos e heterofermentadores obrigatórios.

Os homofermentadores obrigatórios correspondem ao subgénero *Thermobacterium* e incluem as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*. Estas fermentam hexoses quase exclusivamente em lactato e são incapazes de fermentar pentoses. Os heterofermentadores facultativos incluem algumas espécies importantes na fermentação de alimentos, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus sake*. Os heterofermentadores obrigatórios incluem *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus kefir*. As bactérias lácticas heterofermentativas e homofermentativas podem ser facilmente distinguidas em laboratório pela capacidade das heterofermentadores produzirem dióxido de carbono em meios contendo glicose (Adams e Moss, 2008).

O peróxido de hidrogénio é conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas. Como as bactérias do ácido láctico possuem um número de flavoproteínas oxidases, mas não possuem a enzima catalase, elas produzem peróxido de hidrogénio na presença de oxigénio. Isto irá conferir alguma vantagem competitiva, uma vez que demonstraram ser menos sensíveis aos seus efeitos do que outras bactérias. A acumulação de peróxido de hidrogénio foi demonstrado em alguns alimentos fermentados, mas os seus efeitos são, em geral, provavelmente reduzidos. As fermentações lácticas são essencialmente processos anaeróbicos, pelo que a formação de peróxido de hidrogénio será limitada pela quantidade de oxigénio dissolvido no substrato no início da fermentação. No leite, o peróxido de hidrogénio também é conhecido por potencializar o sistema antimicrobiano da lactoperoxidase (Adams e Moss, 2008), como referido anteriormente.

1.6 *Pseudomonas* spp. e outras bactérias Gram negativas e oxidase positiva

O género *Pseudomonas* é o grupo mais heterogéneo e ecologicamente significativo de bactérias (Franzetti e Scarpellini, 2007). É um bacilo pequeno, aeróbio estrito, não esporulado, Gram-negativo, com flagelos polares (o que lhe permite ter mobilidade). São bactérias não fermentadoras da glucose, em geral são oxidase positiva e catalase positiva (Franzetti e Scarpellini, 2007). Este género pertence à família *Pseudomonadaceae* e a espécie mais patogénica deste género é *Pseudomonas aeruginosa*, a qual pode provocar infeções respiratórias e urinárias (Sharma *et al.*, 2014, citados por Ferreira, 2017).

As exigências nutricionais de *Pseudomonas* spp. são muito simples e o género é encontrado em habitats naturais como o solo, a água doce e ambientes marinhos, mas também já foi isolado de instrumentos clínicos, soluções assépticas, cosméticos e produtos médicos. Algumas espécies são importantes clinicamente porque são consideradas patogénicas oportunistas para humanos e animais, enquanto outras, como as fitopatogénicas, são muito importantes no setor agrícola (Franzetti e Scarpellini, 2007).

Pseudomonas spp são microrganismos predominantes que limitam a vida útil do leite processado. A sua capacidade para se multiplicarem e atingirem elevadas densidades celulares durante o armazenamento refrigerado de alimentos (Dogan e Boor, 2003) faz com que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* e *Pseudomonas putida* estejam associadas à deterioração de alimentos de origem vegetal e animal e causem odores desagradáveis quando atingem concentrações acima de 10^7 UFC/g (Martinez-Rios *et al.*, 2016, citados por Ferreira, 2017). A degradação dos componentes do leite através de várias atividades enzimáticas pode reduzir a vida útil do leite processado (Dogan e Boor, 2003). As células bacterianas são facilmente inativadas por altas temperaturas, mas as suas enzimas são estáveis ao calor e podem causar deterioração de alimentos mesmo após a morte celular. A produção de enzimas proteolíticas resistentes ao calor leva à hidrólise da caseína e, como consequência, a uma redução do prazo de validade e da qualidade sensorial dos produtos (Caldera *et al.*, 2015).

1.7 Bactérias coliformes

Os coliformes são um grande grupo de bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, em forma de bacilo (Paruch e Maehlum, 2012). Habitam o solo (coliformes ambientais) e o intestino do Homem e de outros animais de sangue quente (coliformes fecais) (Correia, 2014), pertencem à família *Enterobacteriaceae* e incluem espécies como *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Estas bactérias multiplicam-se rapidamente no leite, especialmente acima de 20°C, e metabolizam proteínas e lactose com produção de gás (CO₂ e H₂) e sabor desagradável (Walstra, 2006).

A produção lenta de ácido láctico favorece o crescimento e a produção de gás por parte de bactérias coliformes. Em queijos curados de pasta mole, onde o pH aumenta durante o processo de cura, observa-se um grande potencial de crescimento de bactérias coliformes (Ledenbach e Marshall, 2009).

1.8 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase positiva e produzem ácidos por degradação de glucose em aerobiose e em anaerobiose (Schleifer and Bell, 2009). Podem crescer numa gama de temperaturas entre 7 a 48°C e em concentrações de NaCl entre 10% a 20%. Todas as estirpes de *S. aureus* são oxidase negativa (European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, 2003).

Existem 35 espécies de *Staphylococcus* descritas de acordo com o seu potencial para a produção de coagulase. As bactérias deste género são ubíquas no ambiente e existem no ar, no esgoto, na água, superfícies ambientais, no Homem e outros animais (European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, 2003). As características culturais no meio de cultura Baird-Parker Agar fornecem a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*, que é frequentemente confirmado por testes para a produção de coagulase e nuclease termoestável. A coagulase é uma enzima extracelular que coagula plasma sanguíneo humano ou animal na ausência de cálcio. É produzida por *S. aureus* e por algumas estirpes de *S. intermedius* e *S. hyicus* (Adams e Moss, 2008).

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que *S. aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos (Santana, 2010).

Em alimentos, as espécies de maior importância são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius*, sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar (Santana, 2010).

A contaminação por *Staphylococcus* do leite cru pode ocorrer pelo próprio animal, pelas mãos do ordenhador, seja na ordenha manual quer na mecânica, e pelos equipamentos de ordenha e o próprio ambiente da sala de ordenha (Lucheis, 2012). A presença de *S. aureus* enterotoxigénico no leite cru representa um grande problema de saúde pública devido ao alto risco de transmissão destas toxinas para o consumidor, já que as mesmas são resistentes ao tratamento térmico e às enzimas proteolíticas (Lucheis, 2012).

1.9 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogénica, Gram-positiva, que pode causar uma doença rara (listeriose) mas grave em indivíduos suscetíveis, com uma taxa de mortalidade entre 20 a 30% (EFSA e ECDC, 2014). Em Portugal, a incidência estimada da doença foi de 1,4 e 2,3 casos por milhão de habitantes em 2003 e 2007 (Almeida *et al.*, 2013).

Pertence à família *Listeriaceae*, é anaeróbio facultativo, produz catalase mas não oxidase. É móvel a 25°C, com movimento característico, e é imóvel a 35°C (Ludwig *et al.*, 2009). A mobilidade de *L. monocytogenes* deve-se aos poucos flagelos peritricos, quando incubada a temperaturas de 20 a 25°C (Farber e Peterkin, 1991). As células são em forma de bacilo (0,4 a 0,5µm x 0,5 a 2,0µm). As colónias de *Listeria* em *Agar Triptose*, vistas sob uma iluminação oblíqua, têm um brilho azul-verde característico (Adams e Moss, 2008).

O crescimento de *Listeria* é inibido a valores de pH abaixo de 5,5 sendo que o pH mínimo de crescimento depende muito da espécie. Pode variar entre 5,6 a 4,4 (Adams e Moss, 2008).

O Leite e produtos lácteos podem ficar contaminados com *L. monocytogenes* em muitas etapas ao longo da cadeia alimentar, começando nas fezes dos animais de ordenha, do ambiente geral do fabrico de alimentos ou em casos raros por infeção do úbere (IDF, 2013; Pintado *et al.*, 2009).

L. monocytogenes pode estar associada a queijos moles devido ao processo de maturação do queijo. Esta sobrevive mal em queijos moles não curados. Durante o processo de maturação, a utilização microbiana de lactato e a libertação de aminas aumentam o pH da superfície, permitindo que *Listeria* se multiplique para níveis perigosos (Adams e Moss, 2008).

O consumo de leite cru ou produtos lácteos crus causou vários surtos de listeriose, resultando em centenas de casos. Numa análise de dados de surtos de origem alimentar anunciados internacionalmente entre 1988 e 2007, 337 dos 4093 estavam associados a produtos lácteos e 6,6% dos quais foram atribuídos a *L. monocytogenes*. O queijo tem sido associado a alguns dos principais surtos de listeriose relatados em todo o mundo. *Listeria monocytogenes* foi detetada em diferentes tipos de queijos portugueses com taxas de contaminação variando de 1,6% a 46% (Pintado *et al.*, 2005; Almeida, 2013).

Atualmente, o género *Listeria* é composto por dezassete espécies com nomes validamente publicados (Ferraz, 2017).

1.10 Enterococos

Enterococos, anteriormente classificados como estreptococos fecais, foram reconhecidos como sendo de origem fecal desde o início deste século (Manero e Blanch, 1999). No entanto, enterococos são omnipresentes e podem ser encontrados no solo, em plantas ou em produtos lácteos (Manero e Blanch, 1999). É uma bactéria Gram-positivas, com forma ovoide, sem associação ou então associadas aos pares ou em cadeias curtas, e frequentemente são alongadas na direção da cadeia. Algumas espécies podem ser móveis por flagelos escassos. Algumas espécies produzem pigmentos de cor amarela. São anaeróbios facultativos, algumas espécies são carboxifílicas (dependentes de CO₂). São catalase-negativas mas algumas espécies revelam atividade de uma pseudocatalase quando cultivadas no meio de cultura Agar Sangue (Ludwig *et al.*, 2009). Enterococos crescem em 6,5% de NaCl, 40% de sais

biliares, leite com 0,1% de azul de metileno e a valores de pH de 9,6. Eles crescem a 10 e 45°C e podem resistir durante 30 min. a 60°C (Manero e Blanch, 1999).

Anteriormente, estas bactérias eram consideradas de baixa virulência por infetarem apenas pacientes imunocomprometidos, no entanto, nos últimos anos, eles ganharam relevância como agentes causadores de infecções do trato urinário, endocardite e bacteremia (Caicedo-Ochoa *et al.*, 2017).

2. Queijo

2.1 Considerações gerais

De acordo com a Portaria nº 73/90 de 1 de fevereiro, o queijo consiste num “produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite ou do leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído, e também da nata, do leite, bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos incluindo o lactosoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios”.

Segundo esta portaria, o queijo pode ser classificado quanto à cura, composição, consistência e matéria gorda. Relativamente à cura, existem três tipos de queijo:

Queijo curado – produto que só se encontra pronto para consumo depois de mantido, durante um certo tempo, em condições determinadas de temperatura, humidade e ventilação que permitam modificações físicas e químicas características.

Queijo curado pela ação de bolores – o produto cujas características são devidas essencialmente à proliferação de bolores específicos no interior e ou à superfície do produto;

Queijo fresco – o produto obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação láctica, com ou sem adição de coalho e não submetido a um processo de cura.

Em relação à composição, existem queijos fundidos com e sem adição de géneros alimentícios. A consistência é classificada em função da percentagem de humidade para cada tipo de queijo isento de matéria gorda (Tabela 1). Quanto à matéria gorda, esta é dada em função da percentagem de matéria gorda no extrato seco (Tabela 2).

Tabela 1 - Classificação da consistência do queijo em função da percentagem de humidade (adaptado da Portaria nº 73/90 de 1 de fevereiro).

Classificação	Humidade no queijo isento de matéria gorda
Extraduro	Inferior a 51%
Pasta dura	49% a 56%
Pasta semidura	54% a 63%
Pasta semimole	61% a 69%
Pasta mole	Superior a 67%

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

Classificação	Matéria gorda no extrato seco
Muito gordo ou extragordo	Superior a 60%
Gordo	45% a 60%
Meio gordo	25% a 45%
Pouco gordo	10% a 25%
Magro	Inferior 10%

O queijo é um meio valioso de conservar muitos dos nutrientes do leite (Adams e Moss, 2008).

2.2 Tecnologia do fabrico do queijo

Os processos tecnológicos empregues no fabrico de queijo são extremamente diversos no que respeita ao tratamento térmico do leite, adição de culturas microbianas, método de produção da coalhada (precipitação, corte, drenagem do soro, aquecimento), salga, prensagem, moldagem e cura. Pequenas variações em qualquer destas fases têm consequências muito relevantes nas propriedades dos queijos. Para além das prescrições tecnológicas, os queijos estão sujeitos a um conjunto de requisitos de natureza sanitária e higiénica, havendo que respeitar um conjunto de “medidas e condições necessárias para controlar os riscos e assegurar que os géneros alimentícios sejam próprios para consumo humano tendo em conta a sua utilização” conforme descrito no Regulamento (CE) n.º 852/2004.

No processo de transformação do queijo, existem três etapas importantes para a definição das características e da qualidade do queijo: o tipo de matéria-prima, as fases de coagulação e dessoramento e a fase de maturação ou cura (Martins, 2006).

A principal matéria-prima na produção do queijo tradicional português é o leite cru. Este é definido no Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de Fevereiro como sendo um produto obtido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C nem submetido a um tratamento de efeito equivalente.

O fabrico do queijo é um processo complicado, pois envolve muitas etapas do processo e várias transformações bioquímicas. Todas estas variáveis afetam a composição, o rendimento e a qualidade do queijo (Walstra, 2006).

No fabrico tradicional de queijo, a gordura e a caseína no leite são concentradas pela remoção da humidade (Banks, 2007). Os outros componentes do leite, particularmente a água, são removidos principalmente com o soro do leite (Walstra, 2006). As proteínas do soro respondem aproximadamente 20% da proteína total do leite (Banks, 2007).

Para o fabrico de queijo de todos os tipos, a produção de ácido láctico é essencial, e o fermento láctico é utilizado para este fim. Os fermentos lácticos incluem sempre bactérias que convertem a lactose em ácido láctico (Jay *et al.*, 2005).

Na Queijaria da Soalheira a tecnologia do fabrico consiste na passagem do leite dos tanques de armazenagem através do permutador (aparelho de placas que vai aquecer o leite à temperatura de coagulação, que varia entre os 29°C e os 31°C). À medida que o leite vai caindo na cuba, adicionam-se diferentes produtos em função do tipo de queijo a produzir. Os produtos usados são a liozima, antibióticos, fermentos lácteos (flora Danica) e coalho (último a ser adicionado). Após a fase de coagulação, que demora 45 minutos, inicia-se o corte da coalhada, que consiste no esmiuçamento da coalhada em grãos de tamanho variado. Este processo decorre durante 10 a 15 minutos. Seguidamente, passa-se à fase de finalização de corte e agitação em simultâneo, durante mais 10 a 15 minutos. Após esta agitação, há um ligeiro repouso da coalhada durante cerca de 5 minutos, iniciando-se novamente a agitação a uma velocidade reduzida para manter o grão em movimento e não se depositar no fundo da cuba. Envia-se depois a coalhada para a enchedora através de uma bomba lobular, cuja característica é não desfazer o grão da coalhada. Esta vai para a prensa onde permanece aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Terminada esta fase, o queijo passa para a fase da salga feita manualmente. Por fim, o queijo é levado para a câmara de humidificação, onde fica cerca de quinze dias a uma humidade relativa de 95 a 97% e uma temperatura de 8°C a 9°C. Depois o queijo é transportado para a câmara de secagem onde fica também cerca de quinze dias a uma humidade relativa de 87-90% e a uma temperatura de 12°C a 14,5°C. Por fim, passa para a câmara de conservação, onde fica até ser vendido. Esta câmara tem uma humidade relativa de 91% e uma temperatura de 14°C.

2.3 Produção de pigmentos e escurecimento da casca do queijo

Segundo Kanner & Rosenthal (1992), a oxidação de lípidos ocorre em alimentos que contenham muita gordura (entre eles o leite). Este processo pode afetar praticamente todos os atributos de qualidade dos alimentos, como o aroma, a cor, o sabor e a textura. No caso da cor, verifica-se que muitas vezes o escurecimento dos alimentos resulta de reações de condensação entre produtos de oxidação e proteínas (Kanner & Rosenthal, 1992).

O leite pode sofrer várias alterações no odor, no sabor, na cor e na textura. Estas alterações determinam a qualidade do produto final caso o leite seja processado. No caso da cor do leite, esta está diretamente relacionada com as características físicas e a composição química do leite. Quando há alterações na cor dos produtos lácteos, estas podem ser provocadas por outras reações químicas ocorridas anteriormente ao processo ou podem ser o resultado da multiplicação de microrganismos produtores de pigmentos.

O género *Pseudomonas* produz uma variedade de pigmentos fluorescentes (pioverdina e derivados de pteridinas) e não fluorescentes (piocianina e pigmentos insolúveis – “carotenóides”). O pigmento piocianina (pigmento azul esverdeado hidrossolúvel) pode ser produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e por *Pseudomonas fluorescens*, sendo no entanto a produção deste pigmento uma característica mais significativa de *Pseudomonas aeruginosa* (El-Fouly *et al.*, 2014). Ao juntar os pigmentos piocianina e pioverdina é originado um pigmento de cor verde brilhante, o qual é característico de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria, para além de todos os pigmentos referidos, também pode produzir outros pigmentos hidrossolúveis, a piorrubina (pigmento vermelho) e a piomelanina (pigmento castanho a negro). Nos produtos lácteos, também se destacam as espécies *Pseudomonas synxantha* (que confere uma cor amarelada ao leite), *Pseudomonas syncyanea* (que no leite

refrigerado pode provocar uma pigmentação azul) e *Serratia marcescens* (que cria áreas vermelhas no queijo) (Cenci-Goga *et al.*, 2014).

III. Material e Métodos

1. Evolução da carga microbiana de leite de ovelha com diferentes tratamentos, ao longo de 4 dias de conservação no frio

O presente trabalho teve lugar na Queijaria da Soalheira em Castelo Branco e no Laboratório de Microbiologia situado na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

1.1 Prévia caracterização microbiológica de leite cru de ovelha

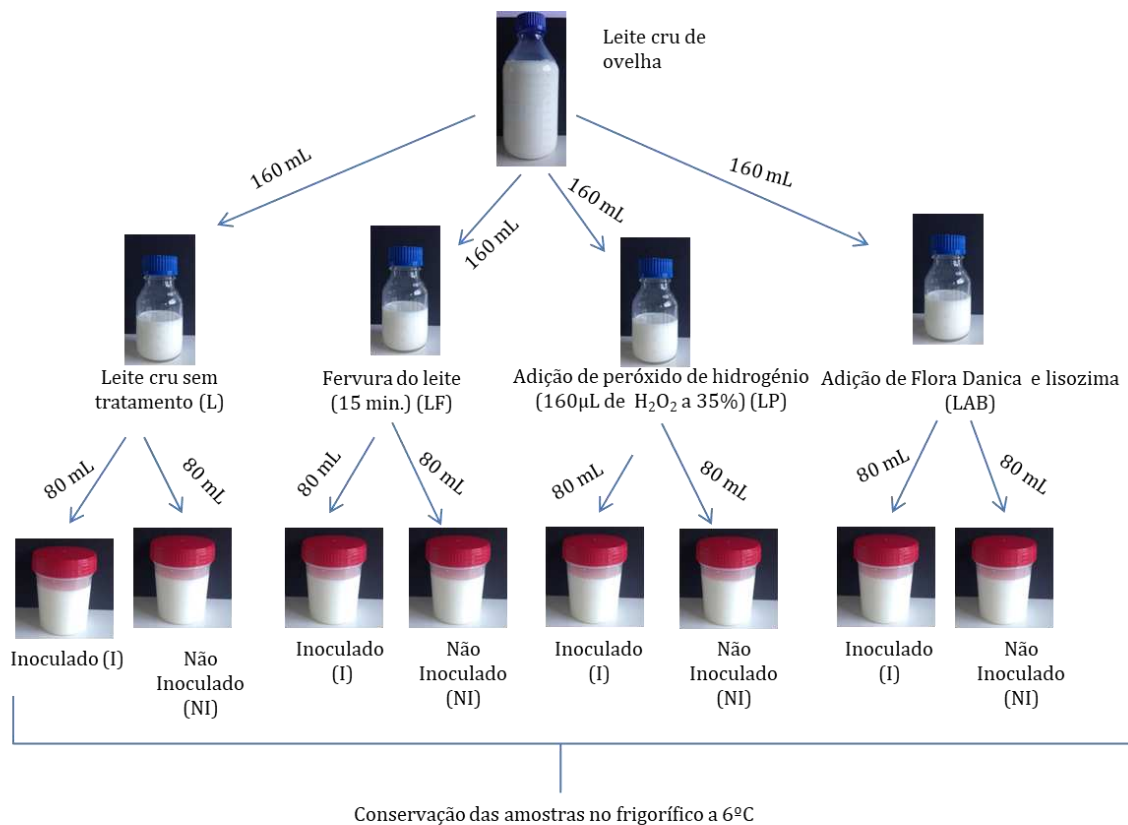
A amostra analisada neste ensaio foi leite de ovelha cru de duas colheitas (dia 28 e 29 de Maio) do mesmo produtor, com o objetivo de avaliar a qualidade deste leite e efetuar a sua caracterização microbiológica. Foi feita a contagem (UFC/mL) de *Pseudomonas*, mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras, bactérias lácticas, coliformes, enterococos e *Staphylococcus* coagulase positiva. Foi ainda efetuada a pesquisa (ausência/presença em 25 mL) de *Listeria monocytogenes*.

1.2 Tratamentos efetuados ao leite de ovelha

A partir de uma amostra de 1L de leite cru de ovelha (do mesmo produtor que forneceu o leite para a caracterização microbiológica prévia) foi efetuado o ensaio que visou estudar a evolução de diferentes grupos de microrganismos (*Pseudomonas* spp., mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras, mesófilos e bactérias lácticas) ao longo de um período de conservação de 4 dias no frio. Um esquema geral deste ensaio encontra-se representado na Figura 1.

Após homogeneização da amostra inicial de leite, distribuiu-se 160 mL em cada um de quatro frascos. A um dos frascos não foi efetuado qualquer tratamento (designado por L) e ao leite de cada um dos outros três frascos foi efetuado um tratamento diferente: fervura durante 15 minutos seguido de arrefecimento rápido (designado por LF); adição de peróxido de hidrogénio (160 µL de uma solução de H₂O₂ a 35%) (designado por LP); adição de 0,0032g de lisozima (Abiasa, 3100782/PO) e 0,02 unidades de flora Danica (CHR Hansen, ref. 713493) (designado por LAB).

O conteúdo de cada um dos quatro frascos foi, após uma perfeita homogeneização, dividido em dois frascos, com 80 mL cada. A um dos frascos de cada um dos tratamentos foi posteriormente adicionado um inóculo (I) constituído por culturas de microrganismos produtoras de pigmentos, como explicado no capítulo seguinte. O outro frasco de cada tratamento manteve-se não inoculado ao longo de todo o ensaio (NI).



Análises efetuadas no início (t_0): Contagem de *Pseudomonas*, bolores e leveduras, psicrotróficos, mesófilos e bactérias lácticas
 Análises efetuadas ao fim de 2 dias: Contagem de *Pseudomonas*, bolores e leveduras e psicrotróficos
 Análises efetuadas ao fim de 4 dias: Contagem de *Pseudomonas*, bolores e leveduras, psicrotróficos, mesófilos e bactérias lácticas

Figura 1 - Esquema geral que representa o ensaio efetuado ao leite ao longo de 4 dias a 6°C.

Após a preparação das amostras para análise microbiológica, congelou-se o leite cru de ovelha que sobrou para a realização posterior de análises físico químicas. Os parâmetros analisados foram a gordura, proteína, lactose e extrato seco isento de gordura. Estas análises foram realizadas no Milkoscan 133B no laboratório de Nutrição da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

1.3 Inoculação de leite de ovelha com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor

A inoculação das quatro amostras de leite (L, LF, LP e LAB) foi efetuada com um consórcio de quatro culturas microbianas, duas bactérias e duas leveduras (Tabela 3). Todas as culturas usadas mostraram ter potencial para promover defeitos de cor em queijo.

Tabela 3- Culturas microbianas inoculadas nas amostras de leite.

Cultura microbiana	Origem	Referência
<i>Pseudomonas putida</i> ref ^a 27	Queijo merendeira feito com leite cru	Ferreira (2017)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ref ^a 137	Zaragatoa a carrinho de inox da sala de lavagem de queijos	Ferreira (2017)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ISA 1668	Queijo de ovelha feito com leite cru	Carreira <i>et al.</i> (1998)
<i>Candida zeylanoides</i> ref ^a 7	Queijo feito com leite cru	(isolada no âmbito deste trabalho)

As suspensões bacterianas e de leveduras foram preparadas em soro fisiológico a partir de culturas puras e jovens. Foi usada a escala de McFarland para o acerto da densidade celular inicial. No caso das culturas bacterianas foi usada uma densidade celular de $5,0 \times 10^6$ UFC / mL de leite e no caso das culturas de leveduras foi usada uma densidade celular de $5,0 \times 10^4$ UFC / mL de leite.

Depois de preparados, todos os frascos, quer das quatro amostras inoculadas (L-I, LF-I, LP-I, LAB-I) quer das quatro amostras não inoculadas (L-NI, LF-NI, LP-NI, LAB-NI), foram para o frigorífico a uma temperatura de 6°C onde permaneceram durante 4 dias.

Ao longo dos 4 dias de conservação no frio todas as amostras foram analisadas no início do estudo (t_0 ; imediatamente após a preparação das amostras), ao fim de 2 dias e ao fim de 4 dias.

As análises microbiológicas efetuadas foram: contagem de *Pseudomonas*, bolores e leveduras, psicrotrofos, mesófilos e bactérias lácticas (no t_0 e no 4º dia); contagem de *Pseudomonas*, bolores e leveduras e psicrotrofos (no 2º dia).

1.4 Análises microbiológicas

O trabalho prático em que se baseou a realização deste relatório de estágio teve lugar no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

A tabela seguinte mostra de uma forma resumida, os procedimentos das análises microbiológicas efetuadas neste trabalho, incluindo a Norma utilizada em cada procedimento, a inoculação, os meios de cultura, a incubação (tempo e temperatura), as provas de confirmação e por último a expressão dos resultados.

Tabela 4- Procedimentos das análises microbiológicas.

Parâmetros	Norma	Inoculação	Meios de cultura	Incubação	Provas de confirmação	Expressão resultados
Preparação amostra	da ISO 6887-5 (2010)	-	Peptona Sal Citrato de trissódico dihidratado	-	-	-
Contagem mesófilos	de ISO 4833 (2003)	Incorporação 1 mL	<i>Plate Count Agar</i> (PCA)	72h± 3h 30°C±1 °C	-	Nº UFC/mL ou g
Contagem psicotróficos	de ISO 17410 (2010)	À superfície 0,1 mL	PCA	10 dias 6,5°C± 1°C	-	Nº UFC/mL ou g
Contagem bolores e leveduras	de NP 3277-1: (1987)	À superfície 0,1 mL	<i>Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar</i> (DRBC)	120h ± 2h 25°C ± 1°C	-	Nº UFC/mL ou g
Contagem bactérias lácticas	de NF ISO 15214: (1998)	Incorporação 1 mL	<i>Man Rogosa Sharpe Agar</i> (MRS)	72h 30°C	Exame microscópio; Esfregaço (1) Pesquisa de catalase (catalase negativa)	Nº UFC/mL ou g
Contagem Pseudomonas	de ISO/TS 11059: (2009)	À superfície 0,1 mL	<i>Pseudomonas Agar base</i> (PAB) (2) <i>Agar Nutritivo</i> (AN) <i>Glucose Agar</i> (3)	48h ± 2h 25°C±1 °C	Prova de oxidase (positiva); Glucose (negativa); Confirmação bioquímica (API 20 NE)	Nº UFC/mL ou g
Contagem coliformes	de NP-3788 (1990)	Incorporação 1 mL	<i>Violet Red Bile Lactose Agar</i> (VRBL Agar)	24h ± 2h 30°C	-	Nº UFC/mL ou g
Contagem Staphylococcus coagulase positiva	de NP 4400-1, (2002)	À superfície 0,1 mL	<i>Baird-Parker Agar</i> (BP); <i>Brain Heart Infusion Broth</i> (BHI)	48h ± 2h 37°C ± 1°C	Pesquisa da coagulase (positiva)	Nº UFC/mL ou g
Pesquisa de monocytogenes	L. ISO 11290-1, 1996) (ISO-11290-1 Amendment 1, 2004)	Incorporação de 25 mL	Fraser (4) <i>Oxford Selective Agar</i> <i>Ottaviani Agosti Agar</i> (ALOA)	24h ± 2h 30°C ± 1°C	Identificação do género e espécie <i>Listeria</i>	Ausente / Presente em 25 mL
Contagem enterococos	de NF EN ISO 7899-2: (2000)	Incorporação de 1 ml	Slanetz e Bartley Agar	44h ± 4 h 36°C± 2°C	Confirmação em bile esculina azida agar 2h a 44°C	Nº UFC/mL ou g

⁽¹⁾Esfregaço corado pelo método Gram (Gram positivas); ⁽²⁾Adicionado natamicina e penicilina G; ⁽³⁾Preparado com peptona, extrato de levedura, Glucose, NaCl, Agar e púrpura de bromocresol; ⁽⁴⁾Adicionado o suplemento seletivo e citrato de ferro (III) amoniacal

2. Evolução do acastanhamento ao longo da maturação em queijos de ovelha inoculados com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor

Este ensaio foi desenhado para verificar se as culturas microbianas que apresentavam produção de pigmentos castanhos em meio de cultura de Agar-Queijo (ensaio *in vitro*) também o faziam em queijos inoculados e colocados a curar em condições similares às verificadas nas queijarias, ao longo de 40 dias.

2.1 Análises microbiológicas ao queijo no início do ensaio

Foram usados cinco queijos de ovelha (Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5) de aproximadamente 900 gramas, produzidos na Queijaria da Soalheira e do mesmo fabrico de dia 28 de Novembro. Cada um destes cinco queijos foi analisado no próprio dia de fabrico, a partir de uma amostra representativa do interior e da superfície e colhida no centro de cada queijo com uma sonda cilíndrica (Figura 2). O corte dos queijos foi efetuado dentro de um tabuleiro de inox esterilizado.



Figura 2 - Queijo de ovelha após colheita de uma amostra para análise do centro com uma sonda cilíndrica (Fonte: autora)

As cinco amostras de queijo foram analisadas em relação à contagem (UFC/g de queijo) de mesófilos, psicrotóxicos, *Pseudomonas* spp. e bolores e leveduras. As análises foram efetuadas em duplicado.

O procedimento analítico foi o mesmo descrito anteriormente para a análise microbiológica das amostras de leite, excetuando a preparação da suspensão mãe. Pesou-se 10 g de amostra, com os devidos cuidados de assepsia, para sacos esterilizados próprios para *Stomacher*, devidamente identificados com a referência da amostra (Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5). Adicionou-se depois diluente estéril (90 ml citrato de trissódico dihidratado) e homogeneizou-se no *Stomacher* (*Stomacher 400 Circulator*, Seward Limited, London, UK), durante 1 minuto.

2.2 Preparação e inoculação dos queijos para o ensaio de escurecimento

Imediatamente após a colheita da amostra do centro dos queijos, estes foram cortados, num tabuleiro em inox esterilizado, em 8 fatias de tamanho similar. Cada uma das oito fatias de cada queijo foi depois identificada com uma etiqueta presa a um suporte de madeira previamente esterilizado (Figura 3) com as diferentes designações que a seguir se discriminam.

P1 – Queijo inoculado com a cultura bacteriana *Pseudomonas putida* ref^a 27

P2 – Queijo inoculado com a cultura bacteriana *Achromobacter xylosoxidans* ref^a 132

P3 – Queijo inoculado com a cultura bacteriana *Pseudomonas fluorescens* ref^a 137

L1 – Queijo inoculado com a cultura de leveduras *Yarrowia lipolytica* ISA 1668

L2 – Queijo inoculado com a cultura de leveduras *Candida zeylanoides* ref^a 7

PL – Queijo inoculado com uma cultura mista de bactérias (*P. putida* ref^a 27) e de leveduras (*Y. lipolytica* ISA 1668)

NI 1 – Não inoculado (fatia 1)

NI 2 – Não inoculado (fatia 2)

A utilização dos suportes de madeira foi essencial para que toda a manipulação fosse feita sem que houvesse necessidade de tocar nos queijos.



Figura 3 - Queijo de ovelha Q1 cortado em fatias devidamente identificadas com o tratamento a que vão ser sujeitas (Q1-P1, Q1-P2, Q1-P3, Q1-L1, Q1-L2, Q1-PL, Q1-NI1, Q1-NI2) (Fonte: autora)

Após o corte dos queijos e etiquetagem das diferentes fatias, procedeu-se à separação dos diferentes grupos colocando-os separados uns dos outros para não haver contaminações cruzadas durante e após a inoculação. Foram usadas redes fornecidas pela queijaria, previamente higienizadas (lavagem, colocação durante 30 minutos em lixívia, enxaguamento e secagem). Cada grupo de queijos foi depois inoculado com a respetiva cultura microbiana (Figura do esquema geral):

Grupo Q1-P1, Q2-P1, Q3-P1, Q4-P1, Q5-P1 - Inoculado com a cultura P1

Grupo Q1-P2, Q2-P2, Q3-P2, Q4-P2, Q5-P2 - Inoculado com a cultura P2

Grupo Q1-P3, Q2-P3, Q3-P3, Q4-P3, Q5-P3 - Inoculado com a cultura P3

Grupo Q1-L1, Q2-L1, Q3-L1, Q4-L1, Q5-L1 - Inoculado com a cultura L1

Grupo Q1-L2, Q2-L2, Q3-L2, Q4-L2, Q5-L2 - Inoculado com a cultura L2

Grupo Q1-PL, Q2-PL, Q3-PL, Q4-PL, Q5-PL - Inoculado com as culturas P1+ L1

Grupo Q1-NI1, Q2-NI1, Q3-NI1, Q4-NI1, Q5-NI1 - Não inoculado (fatia 1)

Grupo Q1-NI2, Q2-NI2, Q3-NI2, Q4-NI2, Q5-NI2 - Não inoculado (fatia 2)

As culturas microbianas usadas no ensaio do queijo foram as mesmas anteriormente usadas no ensaio do leite (Tabela 3), com exceção da cultura bacteriana *Achromobacterium xylooxidans* ref^a 132 (P3), isolada de uma zaragatoa efetuada à francela da sala de lavagem de queijos numa queijaria (Ferreira, 2017), que apenas foi usada no ensaio do queijo.

A partir de culturas puras e jovens foram preparadas as suspensões microbianas em soro fisiológico e de forma a obter-se uma densidade celular de $1,5 \times 10^8$ células/ mL para as bactérias (P1, P2, P3) e de $1,5 \times 10^7$ células/mL para as leveduras (L1, L2). As diferentes fatias de queijo foram depois inoculadas com aproximadamente 50 μ L da respetiva suspensão microbiana, à superfície de cada fatia.

Após inoculação de todas as amostras, estas foram colocadas numa câmara com condições de temperatura e humidade relativa similares às encontradas na queijaria, onde permaneceram durante 40 dias. Ao longo do tempo foi feita a observação regular da cor dos diferentes grupos de queijo, registando-se o momento a partir do qual era possível observar o aparecimento de manchas. Para além disso, todas as amostras foram analisadas ao fim dos 40 dias de maturação, para os mesmos parâmetros microbiológicos avaliados no início do ensaio.

Na figura seguinte pode-se observar o esquema seguido neste ensaio.

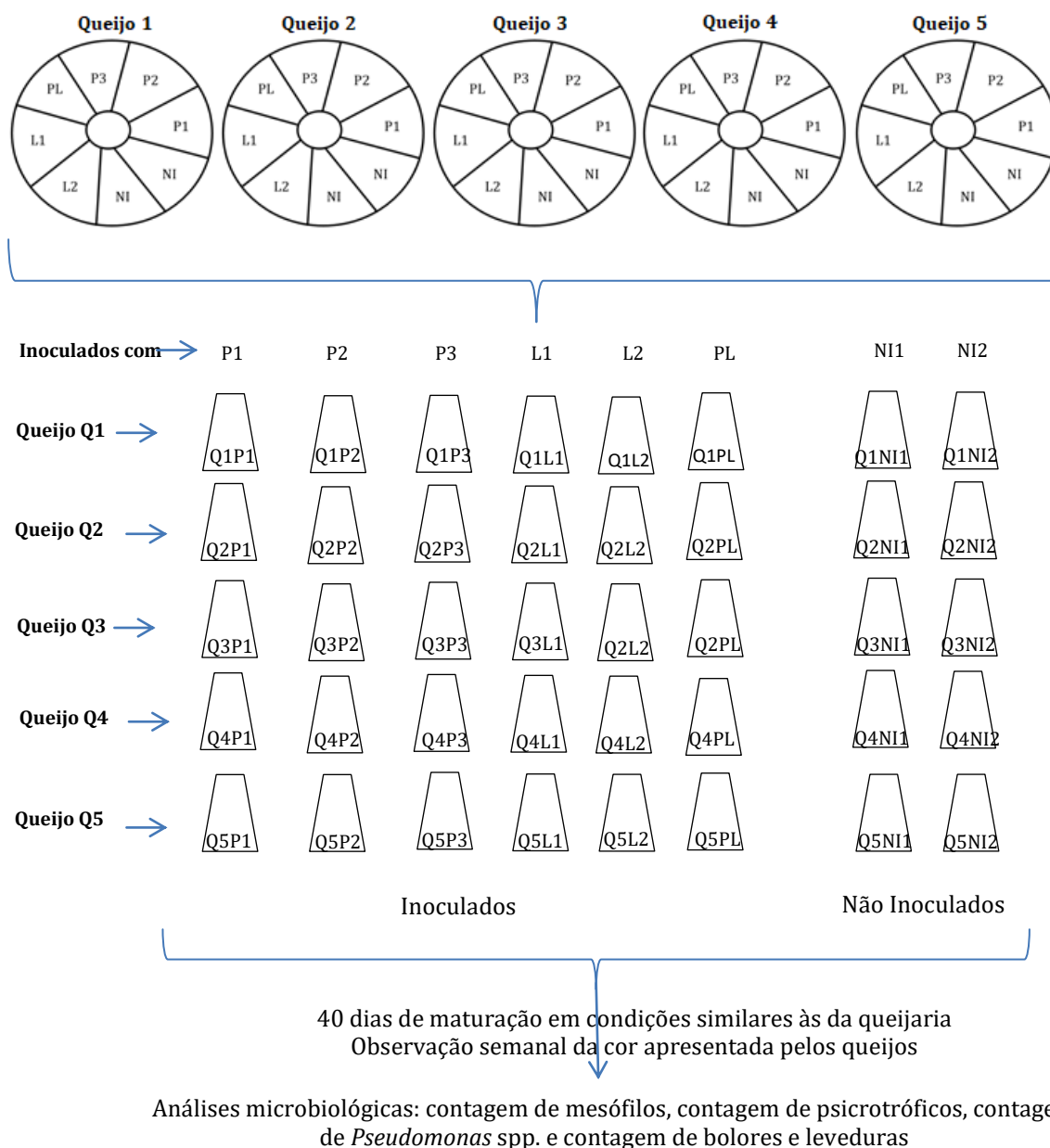


Figura 4- Esquema do ensaio da evolução do acastanhamento ao longo da maturação em queijos de ovelha inoculados com culturas microbianas promotoras de defeitos de cor.

3. Análise microbiológica ao ambiente das câmaras de cura da queijaria

Para avaliar o ambiente das câmaras de cura da queijaria como potencial fonte de contaminação microbiológica dos queijos ao longo da cura, foram feitas análises ao ar das câmaras da queijaria.

A Queijaria da Soalheira possui três câmaras de cura. A primeira câmara de cura (que passaremos a designar por C1) é a câmara de humidificação onde o queijo fica aproximadamente quinze dias. A câmara de humidificação tem de estar a 95-97% de humidade relativa e a uma temperatura de 8 a 9°C. A segunda câmara (que passaremos a designar por C2) é a câmara de secagem, onde o queijo acaba por completar os quarenta e

cinco dias de cura. Esta tem uma humidade relativa de 87- 90% e uma temperatura entre 12 e 14,5°C. Por último, a terceira é a câmara (que passaremos a designar por C3) é a câmara de conservação. Esta câmara é o local onde o queijo fica depois de ter completado os quarenta e cinco dias de cura até ser vendido. Esta câmara tem uma humidade relativa de 91% e uma temperatura de 14°C.

O ambiente das três câmaras de cura referidas anteriormente (C1, C2, C3) foi analisado em quatro pontos distintos e em cada ponto foram colocadas três placas de Petri abertas com os seguintes meios de cultura: Agar nutritivo (AN) para a contagem e isolamento de psicotróficos, *Potato Dextrose Agar* (PDA) para a contagem e isolamento de bolores e leveduras, *Pseudomonas agar base* (PAB) para a contagem e isolamento de *Pseudomonas* spp.

Após quatro horas de exposição ao ar das câmaras de cura, as placas de Petri foram fechadas (pela mesma ordem em que foram sendo abertas) e foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia onde foram colocadas a incubar (10 dias a 6,5°C no caso dos psicotróficos, 48 horas a 25°C no caso das *Pseudomonas* spp. e 5 a 7 dias a 25°C no caso dos bolores e leveduras).

Findo o período de incubação, foi feita a contagem de colónias características de cada grupo e foi efetuado o isolamento, purificação, crioconservação e caracterização de um conjunto de isolados com interesse pertencentes ao grupo dos psicotróficos, das *Pseudomonas* e dos bolores e leveduras.

Nas Figuras 5, 6 e 7 podem observar-se as três câmaras de cura da Queijaria da Soalheira com a localização das placas de Petri abertas para a análise do ar. De referir que em cada uma das quatro localizações eram sempre abertas três placas de Petri (uma com meio NA, outra com PDA e outra com PAB).



Figura 5- Câmara de humificação (C1) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C1, 2C1, 3C1, 4C1) (fonte: autora).



Figura 6- Câmara de secagem (C2) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C2, 2C2, 3C2, 4C2) (fonte: autora).



Figura 7- Câmara de conservação (C3) sinalizada com os quatro locais onde foram colocadas as placas de Petri (1C3, 2C3, 3C3, 4C3) (fonte: autora).

4. Caracterização das amostras por espectroscopia do infravermelho

A fim de perceber se as alterações impostas e previamente descritas seriam detetadas com recurso a métodos rápidos efetuou-se a caracterização, por espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR), das amostras de queijo com 40 dias de maturação resultantes do ensaio de acastanhamento.

A região do infravermelho encontra-se entre as gamas do visível e de micro-ondas, subdividindo-se em infravermelho próximo (NIR) (12 000 a 4000 cm^{-1}), infravermelho médio (MIR) (4000 a 400 cm^{-1}) e infravermelho longínquo (FIR) (400 a 5 cm^{-1}).

A espectroscopia do infravermelho próximo corresponde aos sobretons e combinações de banda das vibrações fundamentais que ocorrem no infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) das ligações C-H, O-H e N-H. As principais vibrações que ocorrem no MIR são o alongamento, a alteração da distância internuclear das ligações, e a deformação, alteração do ângulo das ligações.

Para extrair informação relevante desta técnica é necessário efetuar a interpretação da informação espectral resultante da absorção de energia por parte das ligações existentes nas moléculas de uma dada amostra, neste caso as amostras de queijo, que podem ser causadas por sobreposições de vibrações fundamentais e absorções eletrónicas na região de aquisição de espectros (Anjos *et al.*, 2015; 2016).

O equipamento utilizado foi um NIR (NIR-MPA, Bruker, Alemanha). Para a análise dos queijos não foi necessário efetuar qualquer preparação de amostra sendo que a medição foi efetuada colocando a amostra de queijo numa placa de Petri específica para o efeito e lida em absorvância. Efetuou-se a leitura colocando a casca virada para a zona de leitura e uma segunda aquisição no interior do queijo. Optou-se por esta metodologia dado que a inoculação foi efetuada na casca do queijo e o acastanhamento ocorre apenas na sua superfície.

As análises foram efetuadas à temperatura ambiente com uma resolução de 16 cm^{-1} e 32 *scans* (Anjos *et al.*, 2015; 2016).

5. Análise estatística dos resultados

Foi efetuado um teste de comparação de médias para as diferentes modalidades, L₁, L₂, P₁, P₂, P₃, PL, NI₁ e NI₂ com recurso ao teste de *Scheffé* a 95 % de confiança.

Foi ainda efetuada uma análise de componentes principais (ACP) de modo a perceber a interação entre os vários componentes e respetivas amostras. O tratamento de dados será efetuado com recurso aos softwares Statistic da StatSof.

Para extrair informação dos dados espectrais é necessário proceder à análise multivariada para a qualificação e quantificação dos resultados. Dado que não havia resultados analíticos nem calibrações previamente disponíveis apenas foi efetuada uma análise qualitativa com recurso à análise de componentes principais (ACP). Para esta análise foram testados igualmente vários pré-processamentos.

Devido à complexidade dos espectros, estes são geralmente transformados antes da análise multivariada. No processo de otimização dos modelos, pode ser utilizado como pré-

processamento dos espectros as seguintes metodologias: a correção multiplicativa de dispersão, a correção da linha de base, a normalização pelo mínimo e máximo, a normalização vetorial, a primeira derivada, a primeira derivada mais a correção multiplicativa de dispersão, a primeira derivada mais a correção da linha de base, a primeira derivada mais a normalização vetorial, e a segunda derivada (Anjos *et al.*, 2015; 2016).

As análises dos dados espectrais foram efetuadas com recurso ao software Unscrambler® X, version: 10.5.46461.632 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) e OPUS®, version: 7.5.18 (Bruker Optik, Germany).

IV. Resultados e Discussão

1. Estudo dos defeitos de cor em queijos

1.1 Prévia caracterização microbiológica de leite cru de ovelha

Na Tabela 5 encontram-se os resultados obtidos para a caracterização microbiológica prévia do leite cru de ovelha.

Tabela 5 – Resultados da análise microbiológica efetuada ao leite cru de ovelha.

Parâmetros	Resultados
Mesófilos	4,7x 10 ⁷ UFC/mL
Psicrotróficos	5,1 x 10 ⁶ UFC/mL
Bolores	3,0x10 UFC/mL
Leveduras	1,3 x 10 ³ UFC/mL
Bactérias lácticas	3,3 x 10 ⁷ UFC/mL
<i>Pseudomonas</i>	1,5 x 10 ⁶ UFC/mL
Coliformes	1,0 x 10 ⁷ UFC/mL
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	<1,0 x 10 ⁴ UFC/mL
Enterococos	1,9 x 10 ⁶ UFC/mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência de <i>L. monocytogenes</i> em 25mL

Pela análise destes resultados podemos concluir que este leite não revela a presença do microrganismo patogénico *L. monocytogenes* e apresenta uma contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* inferior a 1,0x10⁴. Revela, no entanto, uma contagem de mesófilos (4,7x10⁷ UFC/mL) que é superior ao referido no Regulamento (CE) nº 853/2004 de 29 de fevereiro para leites crus destinados ao fabrico de queijo feito com leite cru, e que é de 500 000, ou seja, 5,0x10⁵ UFC/mL. O elevado número de mesófilos é acompanhado de um elevado número de psicrotróficos, *Pseudomonas* e enterococos (todos com contagens da ordem de 10⁶ UFC/mL), bem como de coliformes (contagem da ordem de 10⁷ UFC/mL). Estes valores revelam muito provavelmente falhas na higienização da ordenha ou deficiente manutenção da cadeia de frio entre a ordenha e o local da transformação. As bactérias lácticas, grupo importante na tecnologia do fabrico do queijo, apresenta uma contagem elevada destes microrganismos, da ordem de 10⁷ UFC/mL. Por último, o grupo dos bolores e leveduras é o que se encontra menos representado, como era de esperar.

1.2 Evolução do número de *Pseudomonas* ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Figura 8 está representado o gráfico que regista a evolução do número de *Pseudomonas* em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C.

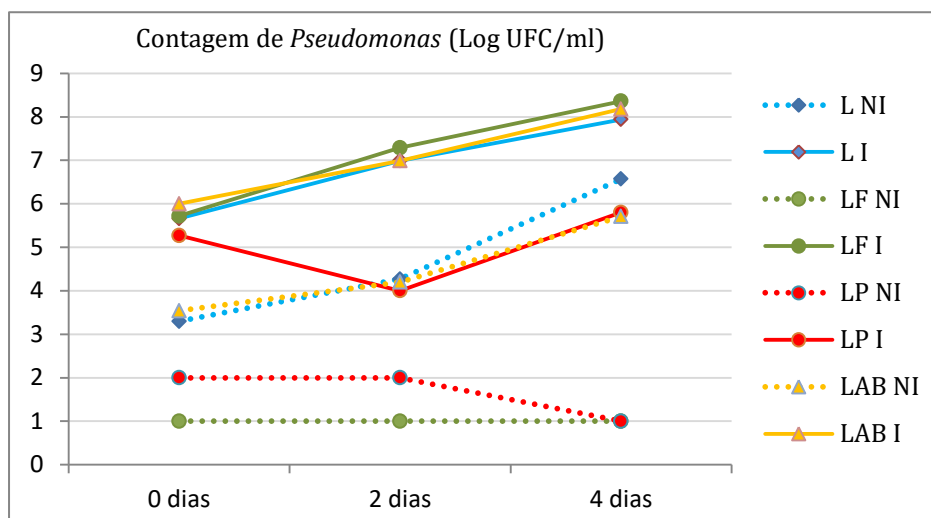


Figura 8- Contagem de *Pseudomonas* (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.

No caso do leite inoculado, verificou-se que a contagem inicial de *Pseudomonas* foi de $4,6 \times 10^5$ UFC/mL a $8,7 \times 10^7$ UFC/mL, valor este compatível com a carga microbiana inoculada ($5,0 \times 10^6$ UFC/mL).

Ao longo do tempo observou-se um aumento de dois logarítmicos para os casos do leite cru inoculado, leite fervido inoculado e leite cru inoculado com adição de flora Danica mais lisozima (LAB), o que mostra o carácter psicrotrófico ou psicrófilo destes microrganismos. De fato, verifica-se um contínuo aumento do número de *Pseudomonas* spp. ao longo dos 4 dias, mesmo com uma temperatura de conservação a 6°C.

No caso do leite cru inoculado e tratado com H_2O_2 verifica-se nos dois primeiros dias uma redução da carga microbiana, mas ao fim dos quatro dias esse número já ultrapassou o valor inicial. No caso do leite cru não inoculado e tratado com H_2O_2 verifica-se que nos dois primeiros dias mantém-se com a mesma carga microbiana e ao fim de quatro dias passa para $<1,0 \times 10^1$ UFC/mL Segundo o estudo de Bjorck *et al.* (1975) sobre o peróxido de hidrogénio, as *Pseudomonas* decresceram rapidamente nas primeiras 4 h de incubação e permaneceram quase estáticas nas 6 h seguintes, mas aumentou de 10 h. Abrantes *et al.* (2014) afirma que o peróxido de hidrogénio é utilizado em leite que visa paralisar a atividade microbiana.

Em quatro dias houve um aumento de 3 ciclos logarítmicos no caso da contagem de *Pseudomonas* em leite cru não inoculado ($1,9 \times 10^3$ UFC/mL para $3,7 \times 10^6$ UFC/mL) e leite cru

não inoculado com adição de flora Danica mais lisozima (LAB) ($3,5 \times 10^3$ UFC/mL para $5,1 \times 10^6$ UFC/mL).

No caso do leite fervido não inoculado a carga microbiana ao longo dos 4 dias é de $<1,0 \times 10^1$ que segundo Abrantes *et al*, (2014) a adição de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a fervura de leite cru promovem uma redução de dois ciclos logarítmicos (10^2) na contagem de *Pseudomonas*.

1.3 Evolução do número de mesófilos ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Figura 9 está representado o gráfico que regista a evolução do número de mesófilos em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C.

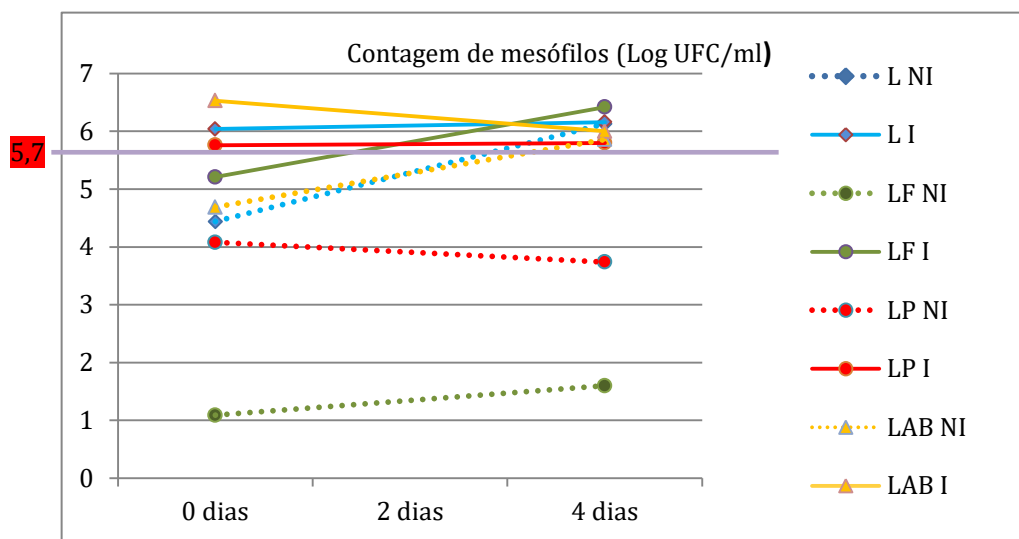


Figura 9- Contagem de mesófilos (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias. A linha a roxo é o limite de contagem de mesófilos segundo o Regulamento (CE) N° 853/2004 de 29 de Fevereiro.

No caso da contagem de mesófilos no leite cru não inoculado, verifica-se uma carga microbiana que aumenta de 10^4 no t_0 para 10^6 ao fim de 4 dias, no caso do leite cru inoculado, a contagem de mesófilos não sofre alteração, mantendo-se com contagens da ordem 10^6 UFC/mL.

A evolução do número de mesófilos no caso do leite cru não inoculado com adição de flora Danica mais lisozima (LAB) é similar à referida anteriormente para o leite cru. O mesmo não se verifica para o caso do leite cru inoculado adicionado com LAB, em que se observa uma redução do número de mesófilos ($3,4 \times 10^6$ UFC/mL para 1×10^6 UFC/mL). Esta redução deve-se, muito provavelmente, à produção de fatores antimicrobianos por parte das

bactérias lácticas (peróxido de hidrogénio, ácido láctico, bacteriocinas), que inibem a multiplicação de outros microrganismos, em especial de bactérias Gram positivas. No caso do leite fervido não inoculado verifica-se um aumento ligeiro no número de mesófilos, muito provavelmente devido à ativação e multiplicação de bactérias esporuladas que sobreviveram à fervura do leite. No caso do leite fervido inoculado verifica-se um aumento de aproximadamente 1,5 logarítmicos ($1,6 \times 10^5$ UFC/mL para $2,6 \times 10^6$ UFC/mL), o que se justifica pela caracterização psicrófila dos microrganismos inoculados e se encontra concordante com os resultados da figura 6.

Na figura 9 introduziu-se linha que representa o limite de contagem de mesófilos. Segundo o Regulamento (CE) N^o 853/2004 de 29 de Fevereiro, o leite cru de espécies diferentes da vaca usado no fabrico de produtos feitos com leite cru deve apresentar uma contagem em placas a 30°C (por mL) $\leq 500\,000$, cujo logaritmo de base 10 deste é 5,7.

Considerando o critério microbiológico referido no parágrafo anterior (5,7 Log), verifica-se pela leitura do gráfico que este valor só é ultrapassado ao fim de quatro dias de conservação a 6°C para o leite cru não tratado e não inoculado. Este leite apresentava uma contagem inicial, no t_0 , para este grupo de microrganismos de $2,7 \times 10^4$ UFC/mL, respeitando o critério microbiológico. Podemos assim concluir que para leites com este nível de carga microbiana, a conservação no frio durante 4 dias torna o leite inadequado para a produção de queijo feito com leite cru. No caso de a contagem inicial ser mais elevada, mais rapidamente seria atingido o valor limite.

1.4 Evolução do número de leveduras ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Figura 10 está representado o gráfico que regista a evolução do número de leveduras em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C.

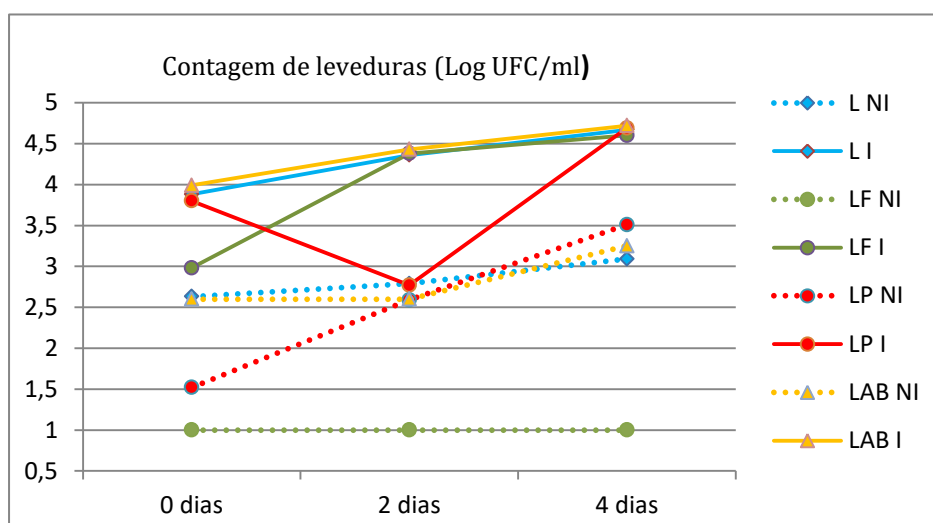


Figura 10- Contagem de leveduras (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lizozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.

No leite fervido inoculado verifica-se um aumento do número de leveduras ao longo da conservação a 6°C durante quatro dias, passando de uma carga microbiana de $9,7 \times 10^2$ UFC/mL para no segundo dia uma carga microbiana de $2,4 \times 10^4$ UFC/mL e por fim, no quarto dia uma carga microbiana de $3,9 \times 10^4$ UFC/mL. Este aumento é devido à multiplicação das leveduras que constituem o inóculo, uma vez que no leite fervido não inoculado o número de leveduras ao longo dos quatro dias mantém-se $< 1,0 \times 10^1$ UFC/mL. A fervura é um método eficaz na destruição deste tipo de microrganismos. Segundo Narvhus and Gadagab (2003) os produtos que sofreram uma temperatura alta podem conter contagens de leveduras até 6 UFC^{-1} .

No leite cru não inoculado adicionado com LAB, verifica-se que dos zero dias ao segundo dia, a carga microbiana manteve-se constante tendo um aumento de 1 ciclo logarítmico. No caso do leite cru inoculado adicionado com LAB, verifica-se um aumento do número de contagens de leveduras durante quatro dias, passando de uma carga microbiana de $9,8 \times 10^3$ para $2,7 \times 10^4$ UFC/mL ao fim de dois dias e para $5,3 \times 10^4$ UFC/mL no quarto dia. Narvhus and Gadagab (2003) afirma que os mecanismos de uma possível interação entre leveduras e a flora láctea não têm sido muito estudados. Tal interação pode ser estimulação ou inibição do crescimento de uma, ou ambas, das estirpes co-cultivadas. Os organismos co-cultivados podem competir por nutrientes de crescimento ou podem produzir produtos metabólicos que inibem o crescimento um do outro. As leveduras podem produzir vitaminas que aumentam o crescimento de LAB.

No caso do leite cru não inoculado adicionado com H_2O_2 , verifica-se um aumento de $3,3 \times 10^1$ UFC/mL para $3,9 \times 10^2$ UFC/mL ao fim de dois dias e para $3,2 \times 10^3$ UFC/mL no quarto dia. Quanto ao leite cru inoculado adicionado com H_2O_2 verifica-se uma redução nos dois primeiros dias de 1 ciclo logarítmico ($6,3 \times 10^3$), depois aumenta do segundo ($5,9 \times 10^2$ UFC/mL) para o quarto dia ($5,0 \times 10^4$ UFC/mL) aproximadamente 2 ciclos logarítmicos. Este resultado mostra que o peróxido de hidrogénio não afeta a multiplicação das leveduras naturalmente presentes no leite cru e usadas no inóculo. Segundo Bienert *et al.* (2006) células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) possuem um mecanismo para se adaptar ao stress oxidativo e para sobreviver em meios contendo concentrações tóxicas de H_2O_2 .

Por último, no caso do leite cru não inoculado verifica-se um ligeiro aumento no número de leveduras ao longo da conservação a 6°C durante quatro dias, passando de uma carga microbiana de $4,3 \times 10^2$ UFC/mL para no segundo dia uma carga microbiana de $6,1 \times 10^2$ UFC/mL e no quarto dia uma carga microbiana de $1,2 \times 10^3$ UFC/mL. Em relação ao leite cru inoculado também se verifica um aumento das contagens de leveduras, passando de uma carga microbiana de $7,6 \times 10^3$ UFC/mL para no segundo dia de $2,3 \times 10^4$ UFC/mL e no quarto dia de $4,7 \times 10^4$ UFC/mL.

1.5 Evolução do número de psicrotróficos ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Figura 11 está representado o gráfico que regista a evolução do número de psicrotróficos em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C.

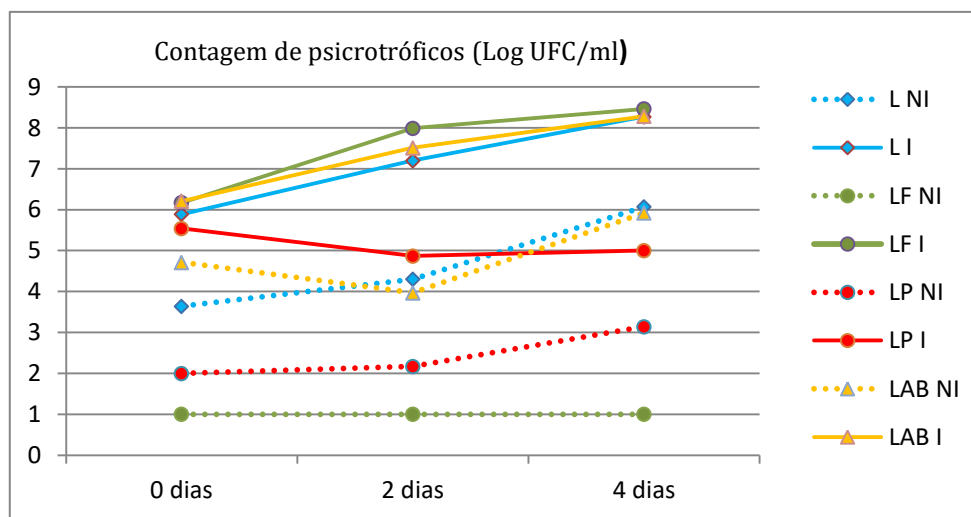


Figura 11- Contagem de psicotróficos (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.

No grupo dos leites não inoculados, à exceção do leite de ovelha fervido, verifica-se um aumento do número de psicotróficos ao longo dos quatro dias de conservação a 6°C. Além da capacidade de crescer e de se multiplicar a baixas temperaturas, as bactérias psicotróficas têm a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares e / ou intracelulares que são estáveis ao calor. Muitas dessas enzimas mantêm a sua atividade mesmo após o tratamento térmico convencional do leite. Além disso, as bactérias psicotróficas são os organismos mais comumente isolados que causaram a deterioração do leite tratado termicamente. Devido a estas propriedades dos psicotróficos, a deterioração e a qualidade reduzida do leite e dos produtos lácteos podem ser tanto consequência da presença de organismos vivos e / ou das suas enzimas termoestáveis (Samaržija *et al.*, 2012).

No grupo dos leites inoculados a contagem inicial de bactérias psicotróficas é semelhante (da ordem de 10^6 UFC/mL), aumentando para 10^8 ao fim de quatro dias (no caso do leite cru, do leite fervido e do leite adicionado com flora Danica mais lisozima) e diminuindo para 10^5 (no caso do leite tratado com peróxido de hidrogénio). Estes dados mostram que o peróxido de hidrogénio não contribui para uma redução significativa da carga microbiana do grupo de microrganismos psicotróficos, podendo mesmo na sua presença haver um aumento deste grupo de microrganismos.

A ocorrência de bactérias psicotróficas no leite cru é inferior a 10%. Na prática, isso significa que o leite produzido sob condições ótimas de ordenha contém entre 5.000-20.000 UFC/mL⁻¹ de bactérias psicotróficas. No entanto, o leite cru mantido por mais tempo no frio a aproximadamente 4°C antes do processamento, causam as mudanças na população microbiana. Sob essas condições, as bactérias Gram-positiva dominantes são substituídas por bactérias psicotróficas Gram-negativas e Gram-positivas. Essas bactérias, na maioria dos casos, têm efeitos negativos consideráveis sobre a qualidade do leite, bem como sobre os produtos lácteos (Samaržija *et al.*, 2012).

As consequências da atividade enzimática das bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado incluem alterações indesejáveis da gordura do leite, proteína e lecitina, que influenciam negativamente na qualidade e na capacidade de processamento. Além disso, a termoestabilidade dessas enzimas, incluindo algumas que são termoestáveis após o

aquecimento a uma temperatura de 100°C durante 30 minutos, pode ser uma razão para que o leite tratado termicamente seja inaceitável para consumo e/ou produção de produtos lácteos de alta qualidade (Samaržija *et al.*, 2012).

1.6 Evolução do número de bactérias lácticas ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Tabela 6 está representada a tabela que regista a evolução do número de bactérias lácticas em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C.

Tabela 6- Contagem de bactérias lácticas (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.

Contagens de bactérias lácticas	0 dias NºUFC/mL (Log UFC/mL)	4 dias NºUFC/mL (Log UFC/mL)	Média±desvio padrão
L NI	1,0x10 ⁴ (4)	1,1x10 ⁴ (4,04)	1,1 x10 ⁴ ± 7,1 x10 ²
L NI (D)	1,3x10 ⁴ (4,11)	1,2x10 ⁴ (4,08)	1,3 x10 ⁴ ± 7,1 x10 ²
Média ± desvio padrão	1,2x10 ⁴ ±2,1x10 ³	1,2 x10 ⁴ ± 7,1 x10 ²	1,2 X10 ⁴ ± 1,0 x10 ³
L I	2,3 x10 ⁴ (4,36)	2,6 x10 ⁴ (4,42)	2,5x10 ⁴ ±2,3 x10 ³
L I (D)	2,3 x10 ⁴ (4,36)	3,1 x10 ⁴ (4,49)	2,7x10 ⁴ ±5,6 x10 ³
Média ± desvio padrão	2,3 x10 ⁴ ± 0	2,9 x10 ⁴ ± 3,3x10 ³	2,6 x10 ⁴ ±2,3 x10 ³
LF NI	<1,0x10 ¹ (<1)	3,0x10 ¹ (1,48)	3,0x10 ¹
LF NI (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ¹	3,0x10 ¹	3,0x10 ¹
LF I	<1,0x10 ² (<2)	<1,0x10 ² (<2)	<1,0x10 ²
LF I (D)	<1,0x10 ² (<2)	<1,0x10 ² (<2)	<1,0x10 ²
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²
LP NI	7,3 x10 ³ (3,86)	1,9 x10 ³ (3,28)	4585 ± 3,8 x10 ³
LP NI (D)	5,5 x10 ³ (3,74)	1,7 x10 ³ (3,24)	3585 ± 2,6 x10 ³
Média ± desvio padrão	6,4x10 ³ ±1,3x10 ³	1,8 x10 ³ ±1,3 x10 ²	4085 ± 8,2 x10 ²
LP I	6,5 x10 ³ (3,81)	1,0 x10 ² (2)	3,3 x10 ³ ± 4,5 x10 ³
LP I (D)	6,2 x10 ³ (3,79)	1,2 x10 ² (2,08)	3,2 x10 ³ ± 4,3 x10 ³
Média ± desvio padrão	6,3x10 ³ ±1,9x10 ²	1,1 x10 ² ± 1,4 x10 ¹	3,2 x10 ³ ± 1,3 x10 ²
LAB NI	5,6 x10 ⁴ (4,75)	2,2 x10 ⁴ (4,34)	3,9 x10 ⁴ ± 2,4 x10 ⁴
LAB NI (D)	6,5 x10 ⁴ (4,81)	8,0 x10 ³ (3,90)	3,6 x10 ⁴ ± 4,0 x10 ⁴
Média ± desvio padrão	6,1x10 ⁴ ±6,4x10 ³	1,5 x10 ⁴ ± 9,9 x10 ³	3,7 x10 ⁴ ± 2,5 x10 ³
LAB I	1,7 x10 ⁴ (4,24)	2,7 x10 ⁵ (5,43)	1,4 x10 ⁵ ±1,8 x10 ⁵
LAB I (D)	1,6 x10 ⁴ (4,21)	2,1 x10 ⁵ (5,33)	1,1 x10 ⁵ ±1,4 x10 ⁵
Média ± desvio padrão	1,7x10 ⁴ ±4,1x10 ⁴	2,4x10 ⁵ ±1,7 x10 ⁹	1,3x10 ⁵ ±1,3 x10 ⁹

No caso do leite fervido não inoculado, verifica-se que a contagem inicial de bactérias lácticas foram de $<1,0 \times 10^1$ UFC/mL passando para $3,0 \times 10^1$ UFC/mL. Em relação ao leite fervido inoculado verifica-se que ao longo dos 4 dias de conservação a 6°C , o número de bactérias lácticas mantém-se $<1,0 \times 10^2$ UFC/mL. A fervura é um método eficaz na destruição deste tipo de microrganismos tal como acontece na contagem de leveduras em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C .

Em relação ao leite cru não inoculado e tratado com H_2O_2 verifica-se que tem uma contagem inicial de $7,2 \times 10^3$ UFC/mL e ao fim dos quatro dias teve uma redução da carga microbiana das bactérias lácticas para $1,9 \times 10^3$ UFC/mL, assim como no leite cru inoculado e tratado com H_2O_2 , verifica-se uma redução da carga microbiana ao longo dos quatro dias. A contagem inicial das bactérias lácticas é de $6,4 \times 10^3$ UFC/mL e ao fim dos quatro dias de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL.

O peróxido de hidrogénio, não é conhecido por ocorrer naturalmente no leite livre de bactérias. No entanto, as bactérias catalase negativas, por exemplo, bactérias de ácido láctico, geram peróxido metabolicamente e podem então ser inibidas pelo sistema completo no leite (Bjorck *et al.*, 1975). Na presença de oxigénio, o LAB produz peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Naidu *et al.*, 1999).

No caso do leite cru não inoculado adicionado com LAB, verifica-se uma redução na carga microbiana das bactérias lácticas ao longo dos quatro dias, passando de $5,6 \times 10^4$ UFC/mL para $2,2 \times 10^4$ UFC/mL. No leite cru inoculado adicionado com LAB, verifica-se um aumento no número de bactérias lácticas, no início de $1,7 \times 10^4$ UFC/mL para $2,7 \times 10^5$ UFC/mL. Estes valores elevados das contagens de bactérias lácticas são de esperar, pois foram adicionadas bactérias lácticas a este leite.

No grupo do leite cru não inoculado e inoculado, verifica-se que há um ligeiro aumento da carga microbiana de bactérias lácticas. No leite cru não inoculado, a contagem inicial é de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL e no quarto dia é de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL. No caso do leite cru inoculado, a contagem inicial é ligeiramente mais elevada do que no leite cru não inoculado ($2,3 \times 10^4$ UFC/mL) assim como no quarto dia ($2,6 \times 10^4$ UFC/mL). Estes resultados são de esperar pois as bactérias lácticas fazem parte da microbiota do leite.

1.7 Evolução do número de bolores ao longo de 4 dias de conservação de diferentes leites (tratados / não tratados; inoculados / não inoculados) a 6°C

Na Tabela 7 está representada a tabela que regista a evolução do número de bolores em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C .

Tabela 7- Contagem de bolores N° UFC/mL (Log UFC/mL) em amostras de leite com diferentes tratamentos (L- leite cru; LF- leite fervido; LP- leite cru com adição de peróxido de hidrogénio; LAB- leite cru com adição de flora Danica mais lisozima) conservado a 6°C, ao longo de 4 dias.

Contagens de bolores	0 dias	2 dias	4 dias	Média ± desvio padrão
	N°UFC/mL (Log UFC/mL)	N°UFC/mL (Log UFC/mL)	N°UFC/mL (Log UFC/mL)	
L NI	2,0x10 ¹ (1,30)	3,0x10 ¹ (1,48)	1,0 x10 ² (2)	5,0x10 ¹ ±4,4x10 ²
L NI (D)	1,0 x10 ¹ (1)	5,0x10 ¹ (1,70)	7,0x10 ² (2,85)	2,5x10 ² ±3,9x10 ²
Média ± desvio padrão	1,5x10 ¹ ±7,0x10 ⁰	4, x10 ¹ ±1,4 x10 ¹	4,0x10 ² ±4,2x10 ²	1,5x10 ² ±2,2 x10 ²
L I	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
L I (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
LF NI	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
LF NI (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
LF I	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
LF I (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
LP NI	2,0x10 ¹ (1,30)	4,0x10 ¹ (1,60)	1,0x10 ¹ (1)	2,3x10 ¹ ±1,5x10 ¹
LP NI (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	1,0x10 ¹ (1)	1,0x10 ¹ (1)	1,0x10 ¹ ±0
Média ± desvio padrão	2,0 x10 ¹	2,5 x10 ¹ ±2,1x10 ¹	22,5±0	2,3 x10 ¹ ±2 x10 ⁰
LP I	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
LP I (D)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹ (<1)	<1,0x10 ¹
Média ± desvio padrão	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
LAB NI	1,0x10 ¹ (1)	4,0 x10 ¹ (1,60)	1,0x10 ¹ (1)	2,0x10 ¹ ±1,7 x10 ¹
LAB NI (D)	2,0x10 ¹ (1,30)	2,0 x10 ¹ (1,30)	2,0x10 ¹ (1,30)	2,0 x10 ¹ ±0
Média ± desvio padrão	1,5 x10 ¹ ±7 x10 ⁰	3,0 x10 ¹ ±1,4 x10 ¹	1,5 x10 ¹ ±7 x10 ⁰	2,0 x10 ¹ ±9 x10 ⁰
LAB I	<1,0 x10 ² (<2)	1,0x10 ¹ (1)	<1,0 x10 ² (<2)	1,0x10 ¹ (1)
LAB I (D)	<1,0 x10 ² (<2)	<1,0 x10 ² (<2)	<1,0 x10 ² (<2)	<1,0 x10 ² (<2)
Média ± desvio padrão	<1,0 x10 ²	1,0x10 ¹	<1,0 x10 ²	1,0x10 ¹

Em relação à contagem de bolores, no caso do leite fervido não inoculado e inoculado, verifica-se que a contagem de bolores mantém-se <1,0 x10¹ UFC/mL. A fervura é um método eficaz na destruição deste tipo de microrganismos tal como acontece na contagem de leveduras e de bactérias lácticas em diferentes amostras de leite quando sujeitas a diferentes

tratamentos e ao longo de 4 dias de conservação a 6°C. Queijos mais amanteigados são suscetíveis à deterioração por bolores resistentes ao calor, como *Byssoschlamys nivea* (Ledenbach e Marshall, 2009).

No caso do leite cru não inoculado, verifica-se um aumento da contagem de bolores ao longo dos quatro dias, tendo como contagem inicial de $2,0 \times 10^1$ UFC/mL, no segundo dia de $3,0 \times 10^1$ UFC/mL e no quarto dia de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL. No leite cru inoculado, verifica-se que ao longo dos quatro dias mantém-se $<1,0 \times 10^1$ UFC/mL, este resultado poderá ser devido ao inóculo de bactérias, estas inibiram o crescimento de bolores. O que acontece também no caso do leite cru inoculado tratado com H_2O_2 mantém-se $<1,0 \times 10^1$ UFC/mL ao longo dos quatro dias. Este resultado mostra que o leite cru tratado com H_2O_2 em conjunto com os inóculos inibe o crescimento de bolores.

No leite cru não inoculado tratado com H_2O_2 , a contagem inicial é de $2,0 \times 10^1$ UFC/mL no segundo dia é de $4,0 \times 10^1$ UFC/mL, reduzindo a carga microbiana no quarto dia ($1,0 \times 10^1$ UFC/mL).

Por fim, o leite cru não inoculado adicionado com LAB teve uma contagem inicial de bolores de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL passando para $4,0 \times 10^1$ UFC/mL no segundo dia e no quarto dia obteve a mesma contagem que a inicial. No leite cru inoculado adicionado com LAB, a carga microbiana inicial é de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, aumentando para $1,0 \times 10^1$ UFC/mL no segundo dia e passando para a mesma carga microbiana inicial no quarto dia.

Tirando uma conclusão do ensaio do leite com diferentes tratamentos, verifica-se que o leite fervido não inoculado, nas contagens (contagens de *Pseudomonas*, mesófilos, leveduras, psicrotrofos, bactérias lácticas e bolores) que é o tratamento que tem uma carga microbiana mais baixa. Segundo Boor e Murphy (2002), quanto maior o tratamento térmico, maior a eficiência de destruição microbiana. Nos leites não inoculados, o tratamento mais eficaz contra a redução microbiana é o leite fervido. Em relação aos inoculados, o tratamento com menor carga microbiana em relação aos outros tratamentos é o leite cru tratado com H_2O_2 .

Quanto às análises físico químicas foram efetuadas em amostra de leite no Milkoscan 133B no laboratório de nutrição da Escola Superior Agrária. Relativamente às análises, o leite cru de ovelha tem uma percentagem de gordura de 7,96, uma percentagem de proteína de 4,94. A percentagem de lactose do leite cru de ovelha é 4,66 e por último a percentagem de extrato seco isento de gordura é de 10,32.

Segundo Park *et al.* (2007), o leite de ovelha contém maiores sólidos totais e gordura, proteína, lactose e minerais do que o leite de cabra e de vaca. A composição média de nutrientes no leite de ovelha segundo Balthazar *et al.* (2017), é percentagem de gordura de 5,9, uma percentagem de proteína de 5,5, uma percentagem de lactose de 4,8 e por fim, segundo Alichanidis & Polychroniadou (1997) citados por Barros (2012) uma percentagem de extrato seco isento de gordura de 12%.

Podemos concluir que as análises físico químicas efetuadas em amostra de leite cru de ovelha estão conforme a composição média de nutrientes do leite de ovelha acima descrito, à exceção da percentagem de gordura que obteve 7,9%, sendo um pouco elevado à % média.

1.8 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do leite cru

A tabela 8 mostra os resultados dos API 20 NE feitos no ensaio do estudo da inoculação de leite cru fervido, com peróxido de hidrogénio e com bactérias que promovem defeitos de cor. Nas duas colónias do leite cru adicionado com flora Danica mais lisozima (LAB), foi identificada a *P. putida*. Na colónia de leite cru não inoculado identificou-se a *P. fluorescens*.

Tabela 8- Resultado dos API 20 NE no leite cru de ovelha com tratamentos.

Ref ^a	Origem	Perfil numérico	Identificação
L-NI (10 ⁻³) Col.1	Leite cru de ovelha	1347415	<i>P. fluorescens</i>
L LAB I (10 ⁻³) Col.4	Leite cru de ovelha	0341455	<i>P. putida</i>
L LAB NI (10 ⁻²) Col.1	Leite cru de ovelha	0140457	<i>P. putida</i>

2. Estudo do acastanhamento em queijos de ovelha

Na Tabela 9 seguinte estão representados os valores (média Log UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos no t_0 . Verifica-se que a média das médias dos cinco queijos em relação à contagem de mesófilos é a mais alta em relação às outras contagens (contagens de *Pseudomonas*, psicrotróficos, bolores e leveduras). No t_0 , a média dos cinco queijos relativamente à contagem de *Pseudomonas* é de 5,33. A contagem de bolores foi muito reduzida.

Tabela 9- Valores (média Log UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos no t_0 .

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Média \pm desvio padrão
<i>Pseudomonas</i>	5,02	5,58	5,72	5,46	5,56	5,47 \pm 0,27
<i>Pseudomonas</i> (D)	5,13	5,50	5,03	5,12	5,19	5,19 \pm 0,18
Média \pm desvio padrão	5,07 \pm 0,07	5,54 \pm 0,06	5,38 \pm 0,49	5,29 \pm 0,24	5,38 \pm 0,26	5,33 \pm 0,17
Mesófilos	6,00	5,98	6,10	6,11	6,16	6,07 \pm 0,08
Mesófilos (D)	5,95	6,12	6,16	6,05	6,14	6,08 \pm 0,08
Média \pm desvio padrão	5,98 \pm 0,04	6,05 \pm 0,10	6,13 \pm 0,04	6,08 \pm 0,05	6,15 \pm 0,01	6,08 \pm 0,07
Psicrotróficos	5,56	5,73	5,61	5,74	5,94	5,72 \pm 0,15
Psicrotróficos (D)	5,74	5,67	5,74	5,94	5,88	5,79 \pm 0,11
Média \pm desvio padrão	5,65 \pm 0,13	5,70 \pm 0,04	5,67 \pm 0,09	5,84 \pm 0,14	5,91 \pm 0,04	5,75 \pm 0,11
Bolores	0,90	0,90	0,90	0,90	0,9	0,90 \pm 0,0
Bolores (D)	1,00	0,90	1,30	0,90	0,9	1,00 \pm 0,17
Média \pm desvio padrão	0,95 \pm 0,07	0,90 \pm 0,0	1,10 \pm 0,28	0,90 \pm 0,0	0,90 \pm 0,0	0,95 \pm 0,09
Leveduras	3,56	3,28	3,43	3,51	3,16	3,39 \pm 0,17
Leveduras (D)	3,53	2,30	3,30	3,40	2,04	2,91 \pm 0,69
Média \pm desvio padrão	3,54 \pm 0,02	2,79 \pm 0,69	3,37 \pm 0,09	3,46 \pm 0,08	2,60 \pm 0,79	3,15 \pm 0,43

(D) - duplicado

Na Tabela 10, verifica-se que nos cinco queijos a média das contagens de mesófilos relativamente aos inoculados, foram as contagens mais elevadas comparativamente às *Pseudomonas*, psicrotróficos, bolores e leveduras. Os bolores são os que têm menor contagem nos cinco queijos.

Tabela 10- Valores (média Log UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos com 40 dias de cura inoculados.

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Média \pm desvio padrão (σ)
<i>Pseudomonas</i>	6,07 \pm 0,4	5,70 \pm 0,4	5,78 \pm 0,6	5,63 \pm 0,7	6,93 \pm 0,6	6,02 \pm 2,9
Mesófilos	8,12 \pm 0,2	8,14 \pm 0,3	8,67 \pm 0,3	8,56 \pm 0,3	8,06 \pm 0,2	8,31 \pm 4,2
Psicrotróficos	7,37 \pm 0,4	7,21 \pm 0,2	7,84 \pm 0,4	7,37 \pm 0,2	7,71 \pm 0,3	7,50 \pm 3,8
Bolores	5,66 \pm 0,5	5,47 \pm 0,2	6,03 \pm 0,6	5,90 \pm 0,2	5,39 \pm 0,2	5,69 \pm 2,8
Leveduras	6,69 \pm 0,3	6,40 \pm 0,5	6,97 \pm 0,2	6,66 \pm 0,2	6,11 \pm 0,3	6,57 \pm 3,3

Em relação à Tabela 11, estão os valores (média Log UFC/g \pm desvio padrão (σ)) para os resultados dos não inoculados. Neste caso, verifica-se o mesmo que na tabela anterior, que a média das contagens de mesófilos relativamente aos inoculados, foram as contagens mais elevadas comparativamente às *Pseudomonas*, psicrotróficos, bolores e leveduras nos cinco queijos. Todos os valores do queijo 1, apresentavam contagens de mesófilos $>3,0 \times 10^6$.

Tabela 11- Valores (média Log UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos com 40 dias de cura não inoculados.

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Média \pm desvio padrão (σ)
<i>Pseudomonas</i>	6,24 \pm 0,4	4,92 \pm 0,2	4,69 \pm 0,03	3,68 \pm 0,03	5,23 \pm 0,8	4,95 \pm 2,6
Mesófilos	-	7,75	8,01 \pm 0,3	7,81 \pm 0,2	7,42 \pm 0,09	7,75 \pm 3,9
Psicrotróficos	7,26	6,64 \pm 0,9	7,34 \pm 0,2	7,34 \pm 0,2	7,31 \pm 0,06	7,18 \pm 3,6
Bolores	3,96 \pm 1,2	4,76 \pm 0,01	5,31 \pm 0,1	5,31 \pm 0,8	4,70	4,81 \pm 2,3
Leveduras	6,43 \pm 0,5	5,70 \pm 0,8	6,18 \pm 0,08	5,88 \pm 1,0	4,91 \pm 0,05	5,88 \pm 2,8

(-) Todos os valores do queijo 1, apresentavam contagens de mesófilos $>3,0 \times 10^6$.

Comparando as duas tabelas, verifica-se que a média da contagem de *Pseudomonas*, mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras dos cinco queijos é menor nos não inoculados, o que é de esperar pois os não inoculados só contêm os microrganismos próprios do leite.

Comparando as três tabelas, nota-se que as contagens de *Pseudomonas* no t_0 foram mais elevadas que nos queijos não inoculados após os 40 dias de cura. Em relação às contagens de mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras foram mais baixas nos queijos no t_0 .

Segundo Skeie (2007), o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser produzido por animais saudáveis e com baixa contagem de células somáticas, preferencialmente $<100\ 000 /$

mL de leite. Este deve estar fresco e deve ter um baixo teor de microrganismos, preferivelmente $<10^4$ UFC / mL de leite.

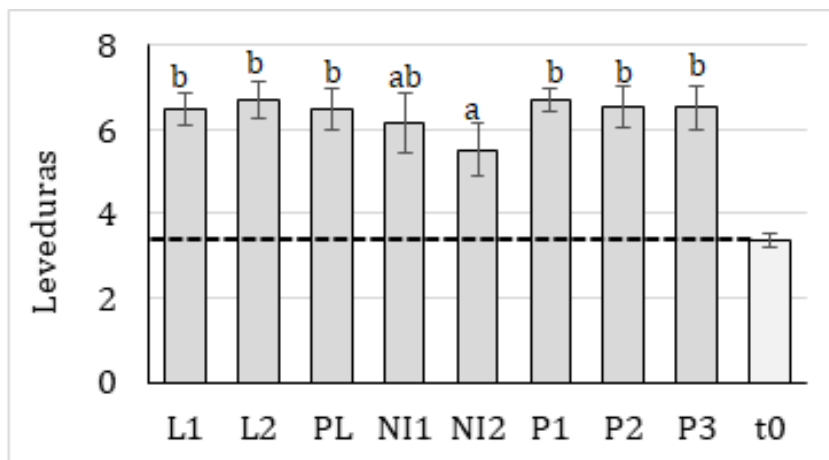


Figura 12- Gráfico da média da contagem de leveduras (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

O baixo pH e o perfil nutricional da maioria dos queijos são favoráveis ao crescimento de leveduras deteriorantes (Ledenbach e Marshall, 2009).

Por comparação com a contagem inicial de leveduras nos 5 queijos ($2,54 \times 10^3$ UFC/g), ao fim de 40 dias verificou-se um aumento do número destes microrganismos nos queijos inoculados (contagens de $5,2 \times 10^6$ UFC/g) e nos queijos não inoculados (contagens de $1,6 \times 10^6$ UFC/g). Curiosamente não se verificaram diferenças significativas nas contagens entre os queijos inoculados com leveduras e *Pseudomonas*.

Segundo Irlinger *et al.* (2015) a *Yarrowia lipolytica* é omnipresente e cresce espontaneamente nas superfícies dos queijos. Tem sido demonstrado que outras espécies de levedura de leite (incluindo *D. hansenii* e *G. candidum*) podem ser superadas por *Y. lipolytica*. Várias espécies de *Candida* e *Pichia* também são frequentemente encontradas na casca de queijos curados.

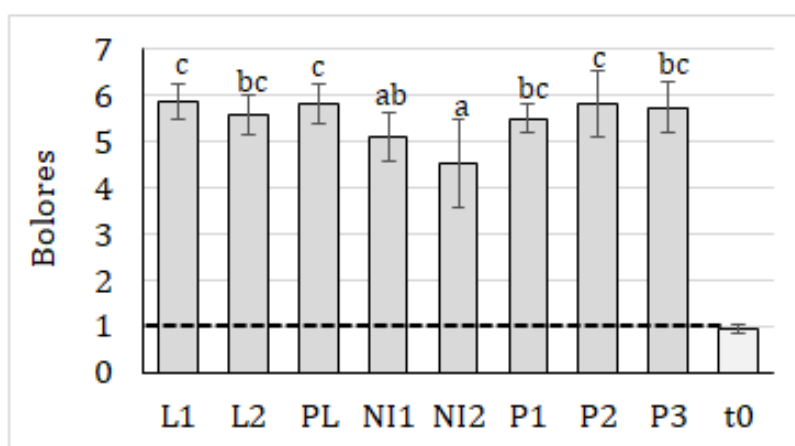


Figura 13- Gráfico da média da contagem de bolores (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

Os bolores podem crescer bem nas superfícies dos queijos quando o oxigénio está presente, sendo o pH baixo selectivo para eles. (Ledenbach e Marshall, 2009).

Os bolores aumentaram ao longo da maturação em todos os queijos, passando de $<1,0 \times 10^1$ para $9,0 \times 10^5$ UFC/g no caso dos queijos inoculados e para $1,7 \times 10^5$ UFC/g em queijos não inoculados. Em relação aos bolores notam-se algumas diferenças significativas, nos queijos não inoculado 2 (NI2) com os queijos não inoculado 1 (NI1) e queijos inoculados com leveduras e *Pseudomonas*. Verificou-se que não houveram diferenças significativas nas contagens entre os queijos inoculados com L1, PL e P2.

Em relação aos bolores, segundo Taniwaki e Dender (1992), o queijo é um excelente substrato para o crescimento de fungos. Pode conter bolor durante o processo de maturação, bem como durante o armazenamento refrigerado. Certos bolores produzem substâncias metabólicas tóxicas conhecidas como micotoxinas. A maioria dos bolores comumente encontrados em uma grande variedade de queijos pertence ao mesmo gênero *Penicillium*.

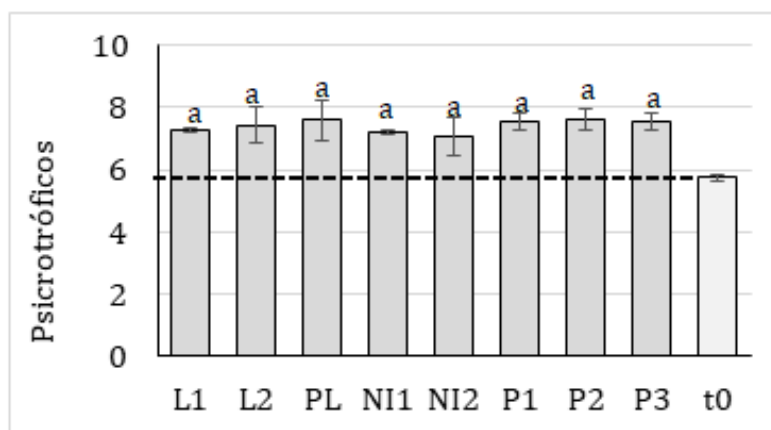


Figura 14- Gráfico da média da contagem de psicotróficos (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

Cada aumento no número de bactérias psicotróficas no leite para o fabrico de queijo aproximadamente acima de 10^3 UFC/mL⁻¹ tem sempre um maior ou menor impacto negativo sobre a qualidade global do queijo. A ocorrência de bactérias psicotróficas mesmo em números relativamente pequenos no leite cru aumentará rapidamente para os níveis de contaminação de 10^5 - 10^8 UFC/mL⁻¹ após apenas dois dias de armazenamento no frio. Este nível de contaminação bacteriana reduz significativamente a qualidade do leite para a produção de queijo (Samaržija *et al.*, 2012).

A contagem inicial de psicotróficos nos 5 queijos, antes do período de maturação, era de $5,9 \times 10^5$ UFC/g. Ao fim dos 40 dias de cura, a contagem de bactérias psicotróficas aumentou para valores de $4,5 \times 10^7$ UFC/g no caso dos queijos inoculados e a $1,7 \times 10^7$ UFC/g. É de notar que não há diferenças significativas nas contagens de psicotróficos nos queijos inoculados e nos queijos não inoculados.

Devido ao fato de existirem diferentes variedades de queijo, cada um significativamente diferente do outro, a ocorrência e a aparência de defeitos causados por psicotróficos não são uniformes para todos os queijos. No entanto, os defeitos comuns a todas as variedades de queijo são o tempo de coagulação inadequado e a redução da qualidade da coalhada de queijo (Samaržija *et al.*, 2012).

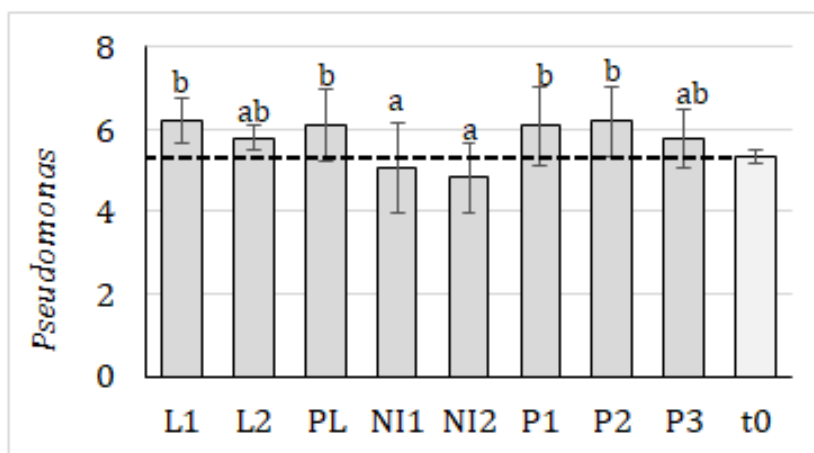


Figura 15- Gráfico da média da contagem de *Pseudomonas* (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

A contagem inicial de *Pseudomonas* nos 5 queijos, antes do período de maturação, era de $2,5 \times 10^5$ UFC/g.

Relativamente à contagem de *Pseudomonas*, verificou-se um ligeiro aumento nas contagens ($5,96 \times 10^5$ UFC/g para o t_0 e $3,6 \times 10^6$ UFC/g para os queijos inoculados e para $5,0 \times 10^5$ UFC/g para os queijos não inoculados) e verificou-se uma ligeira diminuição nos queijos não inoculados. Nas contagens de *Pseudomonas* dos queijos inoculados com a L1, PL, P1 e P2 não se verificaram diferenças significativas. Assim como nas contagens dos queijos não inoculados. É de esperar este aumento pois foram inoculadas *Pseudomonas*.

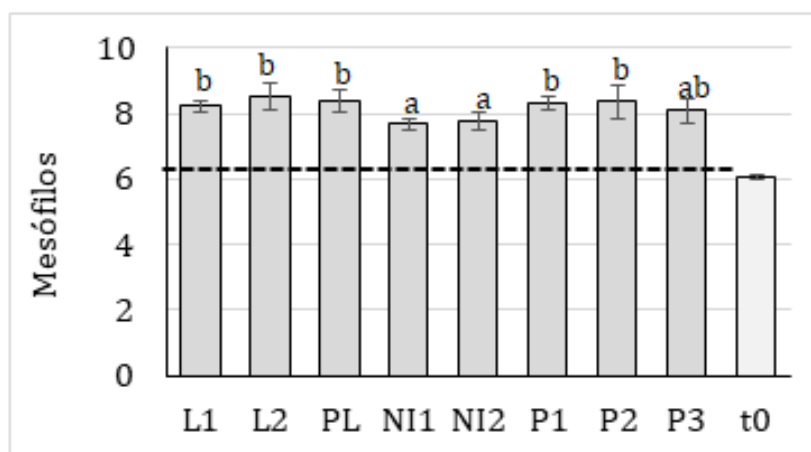


Figura 16- Gráfico da média da contagem de mesófilos (Log UFC/g) nos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

A contagem inicial de mesófilos nos 5 queijos, antes do período de maturação, era de $1,2 \times 10^6$ UFC/g.

A contagem de mesófilos aumentou em todas as situações, comparando com a contagem de mesófilos no t_0 . No caso dos não inoculados ($6,5 \times 10^7$ UFC/g) o aumento foi

significativamente menor que nos queijos inoculados ($2,9 \times 10^8$ UFC/g). Em relação à contagem inicial de mesófilos e no caso dos não inoculados houve um aumento de 1 ciclo logarítmico, já no caso dos inoculados houve um aumento de 2 ciclos logarítmicos. Curiosamente não se verificaram diferenças significativas nas contagens de mesófilos entre os queijos inoculados com leveduras e *Pseudomonas*.

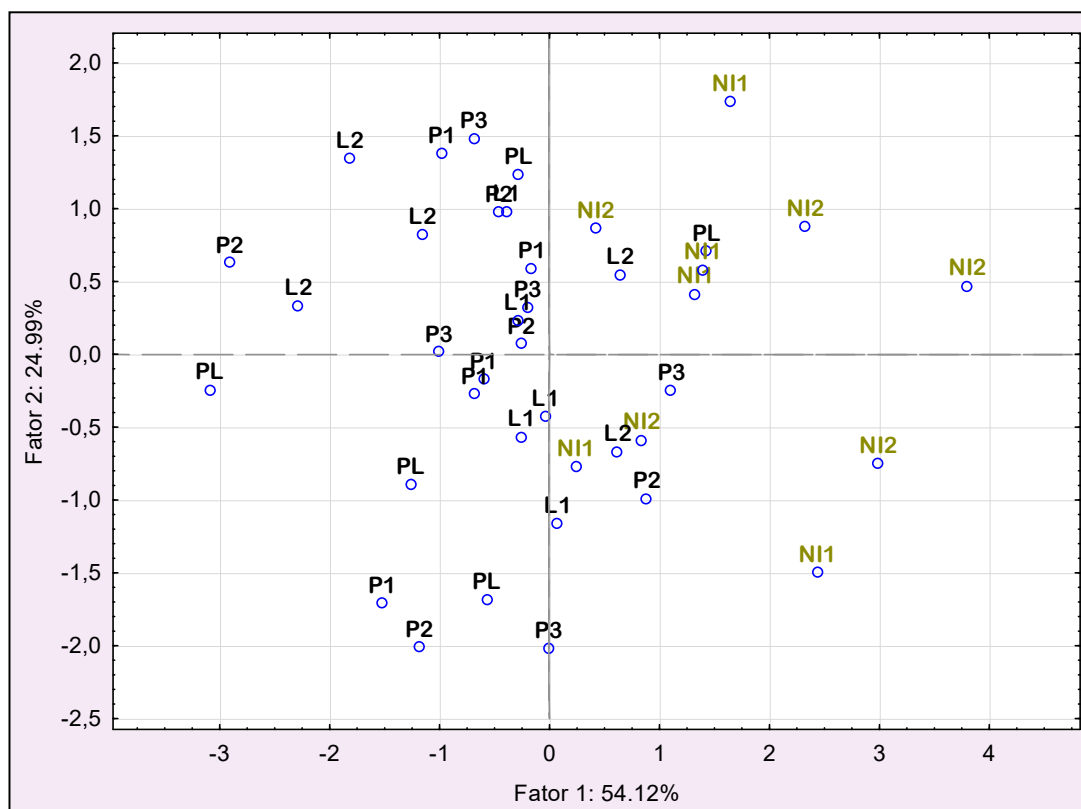


Figura 17- Análise de componentes principais dos cinco queijos ao fim dos 40 dias de cura.

A Figura 17 mostra a análise de componentes principais (ACP) realizada com as médias de todos os parâmetros analisados à exceção dos bolores, de amostras dos cinco queijos. O parâmetro dos bolores foi retirado pois é uma contaminação posterior.

Na análise de componentes principais, verifica-se que o gráfico explica 79,11% (fator 1= 54,12%, fator 2 =24,99%) da variância total.

Neste gráfico podemos observar que existe uma grande variabilidade entre os queijos. Verifica-se que os não inoculados encontram-se todos no quadrante positivo do fator 1. No caso dos não inoculados, encontram-se distribuídos principalmente pelo quadrante negativo e positivo do fator 2.

2.1 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do queijo no t_0 e após os 40 dias de cura

Foram isolados, purificados, crioconservados e indentificados recorrendo ao API 20 NE, 6 isolados de *Pseudomonas* de amostras de queijos no t_0 como está na tabela seguinte (Tabela 12).

Tabela 12- Resultado dos API 20 NE nos queijos no t_0 .

Refª	Origem	Perfil numérico	Identificação
Q1 (10^{-2}) Col. 4	Zero dias	0156555	<i>P. fluorescens</i>
Q1 (10^{-3}) Col. 4	Zero dias	0156565	<i>P. fluorescens</i>
Q2 (10^{-3}) Col. 1	Zero dias	0157571	<i>P. fluorescens</i>
Q3 (10^{-3}) Col. 4	Zero dias	0157775	<i>P. fluorescens</i>
Q4 (10^{-3}) Col. 1	Zero dias	0157575	<i>P. fluorescens</i>
Q5 (10^{-3}) Col. 1	Zero dias	0357555	<i>P. fluorescens</i>

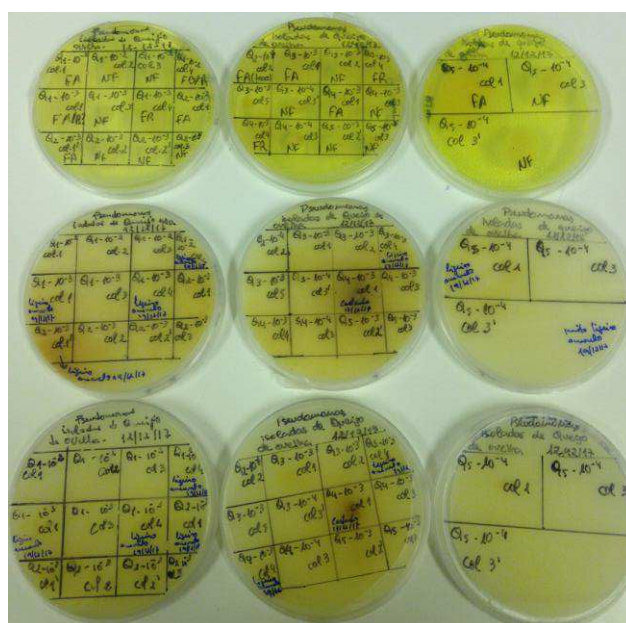


Figura 18- Resultado em King B e Agar queijo com e sem tirosina de colónias características de pseudomonas dos queijos no t_0 .

Foram isolados, purificados, crioconservados e indentificados recorrendo ao API 20 NE,

11 isolados de *Pseudomonas* de amostras dos queijos curados aos 40 dias como mostra a tabela seguinte (Tabela 13).

Tabela 13- Resultado dos API 20 NE nos queijos após 40 dias de cura.

Ref ^a	Origem	Perfil numérico	Identificação
Q ₂ - NI ₁ (10 ⁻²) Col.5	Queijo curado	0157575	<i>P.fluorescens</i> - Excelente identificação
Q ₂ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.1	Queijo curado	0147555	<i>P.fluorescens</i> - Excelente identificação
Q ₃ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.1	Queijo curado	0157775	<i>P.fluorescens</i> - Boa identificação
Q ₃ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.2	Queijo curado	0147757	<i>P.fluorescens</i> - Muito Boa identificação
Q ₃ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.4	Queijo curado	0157575	<i>P.fluorescens</i> - Excelente identificação
Q ₃ - NI ₂ (10 ⁻³) Col.1	Queijo curado	0157775	<i>P.fluorescens</i> - Boa identificação
Q ₄ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.2	Queijo curado	0157555	<i>P.fluorescens</i> - Excelente identificação
Q ₅ - NI ₁ (10 ⁻³) Col.2	Queijo curado	0140457	<i>P.putida</i> - Muito boa identificação
Q ₅ - NI ₁ (10 ⁻⁴) Col.1	Queijo curado	0140404	<i>P.alcaligenes</i> - Aceitável
Q ₅ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.3	Queijo curado	0157577/0157575	<i>P.fluorescens</i> - Fraca discriminação <i>P.fluorescens</i> - Boa identificação
Q ₅ - NI ₂ (10 ⁻²) Col.5	Queijo curado	0157775	<i>P.fluorescens</i> - Boa identificação

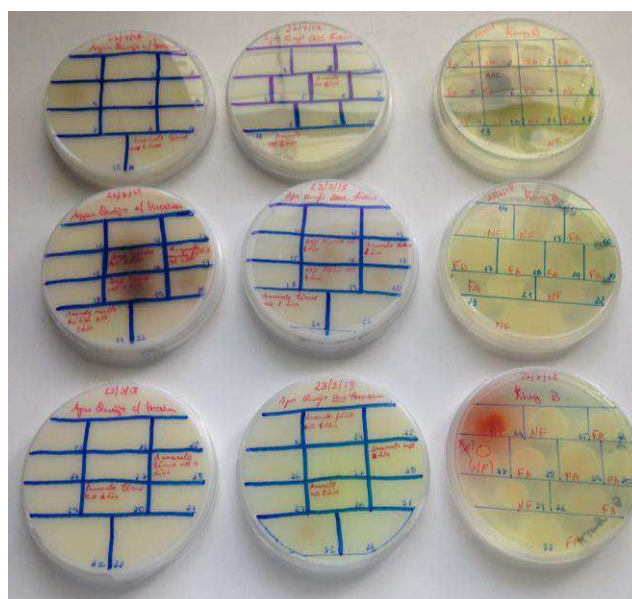


Figura 19- Resultado Agar queijo com e sem tirosina e King B de colônias características de *pseudomonas* dos queijos após 40 dias de cura.

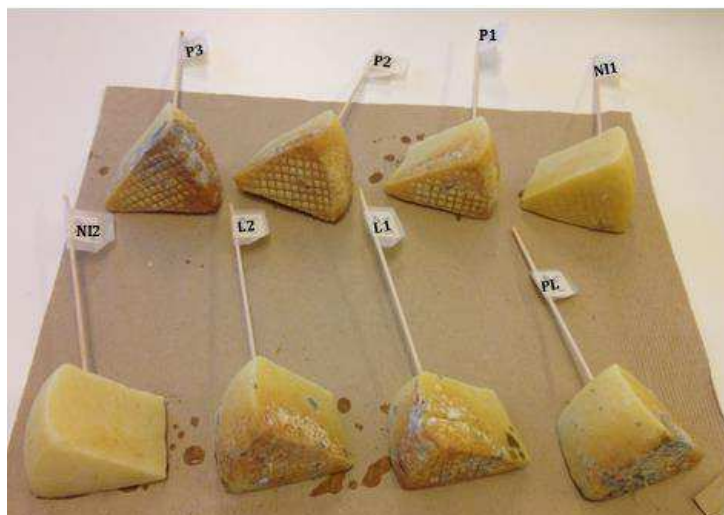


Figura 20- Aspeto visual do queijo 5 após 40 dias de cura.

3. Análise ao ambiente das câmaras de cura da queijaria

Na Tabela 14, encontram-se os resultados relativamente à contagem de *Pseudomonas*, psicrotróficos, bolores e leveduras (nº UFC) ao ambiente das câmaras de cura da queijaria.

Tabela 14 - Contagem (nº UFC) dos microrganismos do ambiente das câmaras de cura da queijaria.

	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras	
1C ₁	4; confirmadas	3	36	14	0
2C ₁	9	42	20	0	
3C ₁	11; confirmadas	7	53	17	0
4C ₁	6; confirmadas	3	54	21	0
1C ₂	2; 1 confirmada	27	17	0	
2C ₂	0	12	12	1	
3C ₂	0	12	5	0	
4C ₂	1	26	14	0	
1C ₃	14	INC.	INC.	0	
2C ₃	18	INC.	INC.	0	
3C ₃	20	INC.	INC.	0	
4C ₃	17	INC.	INC.	0	

Nota: INC. - Incontável

Verifica-se que na câmara 3 havia uma contagem de bolores e psicrotróficos incontável como se pode observar na Figura 21. A câmara 3 em relação à câmara 1 e à 2 é a que tem maiores contagens.

No caso da câmara 2, nota-se que tem menor contagem de *Pseudomonas*, psicrotróficos, bolores e leveduras relativamente às outras duas câmaras.

Nas Figuras 21,22 e 23 mostram as placas com a contagem de bolores e leveduras, *Pseudomonas* e psicrotróficos.

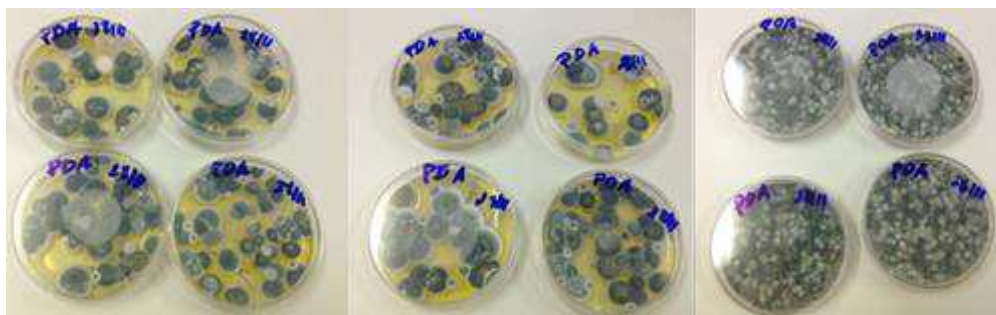


Figura 21 - Contagem de bolores e leveduras do ambiente da câmara 1, câmara 2 e câmara 3 da queijaria.

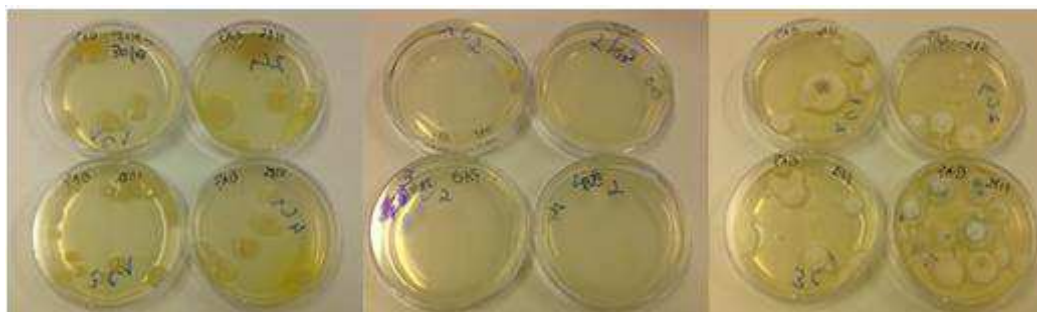


Figura 22 - Contagem de *Pseudomonas* do ambiente da câmara 1, câmara 2 e câmara 3 da queijaria.

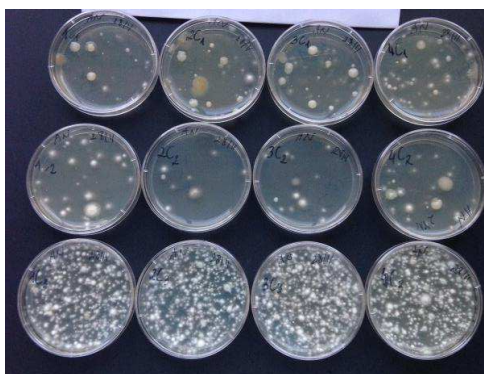


Figura 23 - Contagem de psicrotróficos do ambiente das três câmaras de cura da queijaria.

3.1 Isolamento, caracterização e identificação de isolados provenientes do ambiente das câmaras de cura da queijaria

Neste estudo, foi descoberta uma colónia (2C1, colónia 3) que provocava o escurecimento do agar que foi identificada como *Kytococos sedentarius* coagulase negativa, descrito na Tabela 15.

Tabela 15- Caracterização de isolados de psicrotróficos do ambiente das câmaras de cura (C1 e C2).

Ref ^a	Colónia	Oxidase	Glucose Agar	Coloração Gram
1C1	Colónia 1	Positiva		<i>Cocos</i> Gram positivo
1C1	Colónia 2	Negativa	-	<i>Cocos</i> Gram positivo
1C1	Colónia 3	Negativa	-	<i>Cocos</i> Gram positivo
2C1	Colónia 1	Positiva	Negativa	<i>Bacilos</i> curtos Gram negativo
2C1	Colónia 2	Positiva	Negativa	<i>Bacilos</i> curtos Gram negativo
2C1	Colónia 3	Positiva	Positiva	<i>Estafilococos</i> Gram positivo
3C1	Colónia 1	Positiva	Negativa	<i>Bacilos</i> médios Gram positivo; cadeias curtas de <i>Estreptococos</i>
3C1	Colónia 2	Positiva	Negativa	Algumas leveduras e <i>Bacilos</i> Gram negativo
3C1	Colónia 3	Positiva	Negativa	<i>Cocobacilos</i> Gram positivo e Gram negativo
4C1	Colónia 1	Negativa	-	<i>Cocobacilos</i> Gram positivo
4C1	Colónia 2	Positiva		<i>Cocobacilos</i> Gram positivo
1C2	Colónia 1	Negativa	-	<i>Estafilococos</i> Gram positivo
2C2	Colónia 1	Positiva		<i>Estafilococos</i> Gram positivo
2C2	Colónia 2	Negativa	-	<i>Estafilococos</i> Gram positivo
3C2	Colónia 1	Negativa	-	<i>Bacilos</i> curtos/ <i>Cocobacilos</i> Gram positivo
4C2	Colónia 1	Positiva	Negativa	<i>Bacilos</i> curtos Gram negativo
4C2	Colónia 2	Positiva	Negativa	Mistura de <i>Cocobacilos</i>
4C2	Colónia 3	Positiva		<i>Estafilococos</i> Gram positivo

Na Tabela 16 estão representados os resultados do teste de Hidróxido de Potássio (KOH 3%). Após a realização da coloração Gram, foi feito o teste do hidróxido de potássio para se confirmar se são Gram-positivo ou Gram-negativo. Caso seja Gram-positivo, após a repicagem da colónia característica e se colocar numa gota de hidróxido de potássio, não irá originar nada. No caso de ser Gram-negativo, formam um muco e um fio na gota de hidróxido de potássio, devido à grande quantidade de lípidos.

Em relação à contagem de psicrotróficos, todas as oxidases positivas e *Bacilos* Gram

negativo foram esgotadas em placas com meio de PCA com inibidores e incubadas a 25°C durante 4 dias e após a incubação foram purificadas.

A colônia 3 da 2C1 repicou-se para o meio de *Tryptone Soy Yeast Extract Agar* (TSYEA). Foi repicada uma colônia do crescimento no meio de TSYEA novamente para outra placa com o mesmo meio, incubou-se a 25°C até haver crescimento. Após o crescimento foi feito um esfregaço para se realizar coloração simples e observou-se ao microscópio tendo como resultado: cocos. Realizou-se um API 20 NE ao *Staphylococcus* e fez-se a coagulase.

Os fungos que se repicaram-se para placas de PDA e foram a incubar a 25°C até haver crescimento.

Tabela 16- Resultados do teste de Hidróxido de Potássio (KOH 3%).

Teste de Hidróxido de Potássio (KOH 3%)		
	Referência	Resultado
3C1	Colônia 1	Gram Negativo
	Colônia 2	Gram Negativo
	Colônia 3	Gram Negativo
4C2	Colônia 1	Gram Negativo
	Colônia 2	Gram Negativo
	Colônia 3	Gram Negativo

Na figura 24, estão representados os resultados de colônias características de pseudomonas do ambiente das câmaras de cura da queijaria em King B e agar queijo com e sem tirosina.

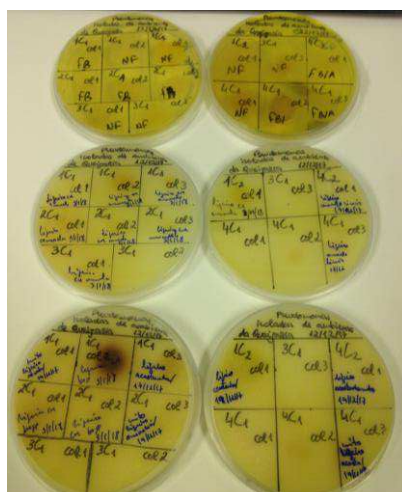


Figura 24 - Resultado em King B e Agar queijo sem e com tirosina de colônias características de pseudomonas do ambiente das câmaras de cura da queijaria.

Tabela 17- Caracterização de isolados de *Pseudomonas* do ambiente das câmaras de cura (C1 e C2).

	Ref ^a	Oxidase	Glucose Agar
1C₁	Colónia 1	Positiva	Negativa
1C₁	Colónia 2	Positiva	Negativa
1C₁	Colónia 3	Positiva	Negativa
1C₁	Colónia 4	Negativa	-
2C₁	Colónia 1	Positiva	Negativa
2C₁	Colónia 2	Positiva	Negativa
2C₁	Colónia 3	Positiva	Positiva
3C₁	Colónia 1	Negativa	-
3C₁	Colónia 2	Positiva	Negativa
3C₁	Colónia 3	Positiva	Negativa
4C₁	Colónia 1	Negativa	-
4C₁	Colónia 2	Positiva	Negativa
4C₁	Colónia 3	Positiva	Negativa
4C₁	Colónia 4	Negativa	-
1C₂	Colónia 1	Negativa	-
1C₂	Colónia 2	Negativa	-
4C₂	Colónia 1	Negativa	
4C₂	Colónia 2	Positiva	Negativa
4C₂	Colónia 3	Positiva	Negativa
4C₂	Colónia 4	Negativa	-

Foram isolados, purificados, crioconservados e indentificados recorrendo ao API 20 NE, 5 isolados de *Pseudomonas* e um isolado de *Estafilococos* de amostras do ambiente da queijaria como mostra a tabela seguinte (Tabela 18).

Tabela 18- Resultado dos API 20 NE do ambiente da queijaria.

Ref ^a	Origem	Perfil numérico	Identificação
2C ₁ Col.1	Ambiente da queijaria	0146457/0346457	<i>P. putida</i> <i>P. putida/P. fluorescens</i>
2C ₁ Col.2	Ambiente da queijaria	0146457/0346457	<i>P. putida</i> <i>P. fluorescens</i>
3C ₁ Col.1	Ambiente da queijaria	1146455/0146455	<i>P. fluorescens</i> <i>P. fluorescens /P. putida</i>
3C ₁ Col.3	Ambiente da queijaria	0143444	<i>P. putida</i>
4C ₂ Col.2	Ambiente da queijaria	0341455/0343455/ 4341455/4343455	<i>P. putida</i>
2C ₁ Col.3	Ambiente da queijaria	20052	<i>Kytococos sedentarius</i> coagulase negativa - Aceitável

4. Caracterização das amostras por espectroscopia do infravermelho Espetros NIR e diferenciação das amostras

Na Figura 25 encontra-se representado o espectro médio NIR obtido para as amostras de queijo em análise. Os espectros são similares aos obtidos por outros autores (Cevoli et al., 2013; González-Martín et al., 2011; Pillonel et al., 2003).

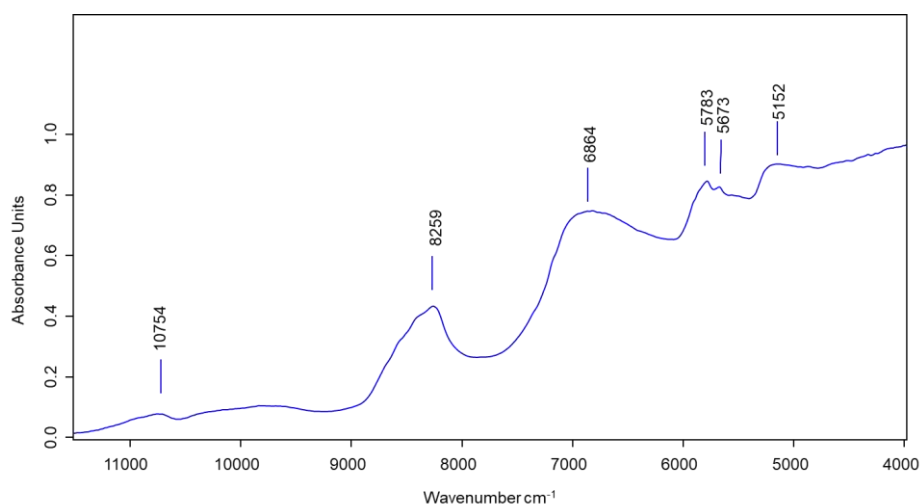


Figura 25- Espectro médio de uma amostra de queijo analisado junto à casca (12000 - 4000 cm^{-1}).

Dos vários pré processamentos testados, os que se mostraram mais adequados foram a primeira e segunda derivada usando o algoritmo de Savitzky-Golay (Figura 26).

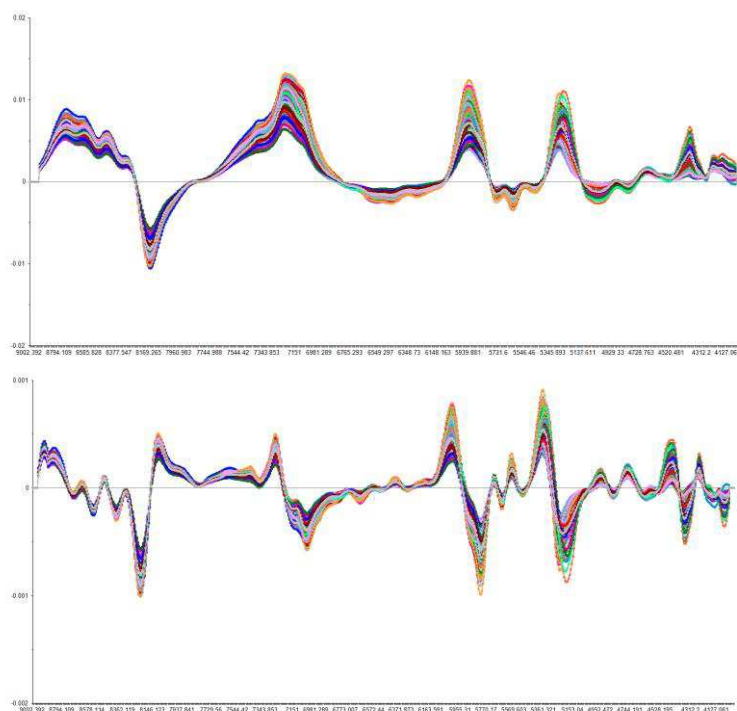


Figura 26 - Primeira e segunda derivada.

Os pré processamentos que se mostraram mais adequados para o tratamento dos dados foi a primeira derivada usando o algoritmo de Savitzky–Golay. No entanto, optou-se por utilizar a primeira derivada pelo facto de os dados serem mais consistentes e ser o mais utilizado na bibliografia (Cevoli *et al.* 2013; González-Martín *et al.*, 2011; Pillonel *et al.*, 2003).

A região espectral entre 4000 e 3050 cm^{-1} não foi usada porque não continha informação química relevante, tal como tinha sido anteriormente observado por Cevoli *et al.* (2013) e Pillonel *et al.* (2003). A primeira parte do espectro até 9000 cm^{-1} , foi igualmente removida antes de processada por não conter informação relevante e por apresentar algum ruído devido à própria metodologia de análise.

Numa fase inicial foi considerada a informação referente às vibrações de interesse na janela espectral dos 9000-4500 cm^{-1} .

O primeiro pico observado em 8259 cm^{-1} pode ser atribuído a um segundo sobreton de alongamento (Figura 25).

As bandas a 5783, 5673 e 5152 cm^{-1} estão relacionadas com o primeiro e segundo sobreton das ligações C-H e O-H. Os primeiros picos a 5783 e 5673 cm^{-1} estão normalmente relacionados com os lípidos presentes no queijo, e podem ser atribuídos ao primeiro índice de vibrações de alongamento C-H do grupo funcional- CH_2 , enquanto o pico observado a 5152 cm^{-1} pode ser atribuído aos segundos sobretons das vibrações de alongamento C=O. Os picos observados em 4661 e 4593 cm^{-1} que aparecem maioritariamente na análise efetuada na casca do queijo e são visíveis apenas nos espectros processados podem ser atribuídos às combinações de bandas de vibrações de alongamento = C-H e C = C dos grupos funcionais -HC = CH- e grupos -C-H₂.

É de referir no entanto que quando a análise é efetuada sobre a casca o feixe penetra numa pequena extensão na massa do queijo e o que se analisa efetivamente é a parte junto à casca no interior do queijo. Neste caso as alterações derivadas da inoculação podem ser detetadas junto à casca (onde foi efetuada a inoculação) ou eventualmente também na parte interior do queijo e por isso efetuou-se a análise e respetivas análises em componentes principais nas duas zonas do queijo.

A análise de componentes principais (ACP) possibilitou a diferenciação de algumas amostras (Figura 27 e 28).

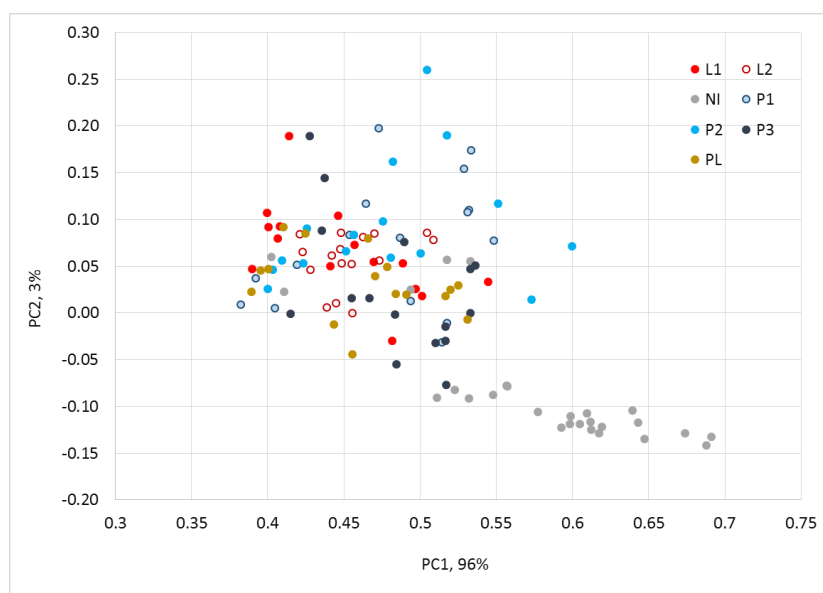


Figura 27 - Análise de componentes principais (ACP) aos queijos cujo espetro foi adquirido na casca do queijo.

Na figura 32 mostra a análise de componentes principais (ACP) aos queijos cujo espetro foi adquirido na casca do queijo. Nesta análise foi retirado o queijo 1 devido à falta de dados. Verifica-se na figura 30, que os grupos dos não inoculados se separam dos inoculados, o que é de esperar pois estes foram inoculados na casca. Pode-se concluir que os inoculados tiveram semelhanças na cor, assim como os não inoculados tiveram semelhanças na cor entre eles.

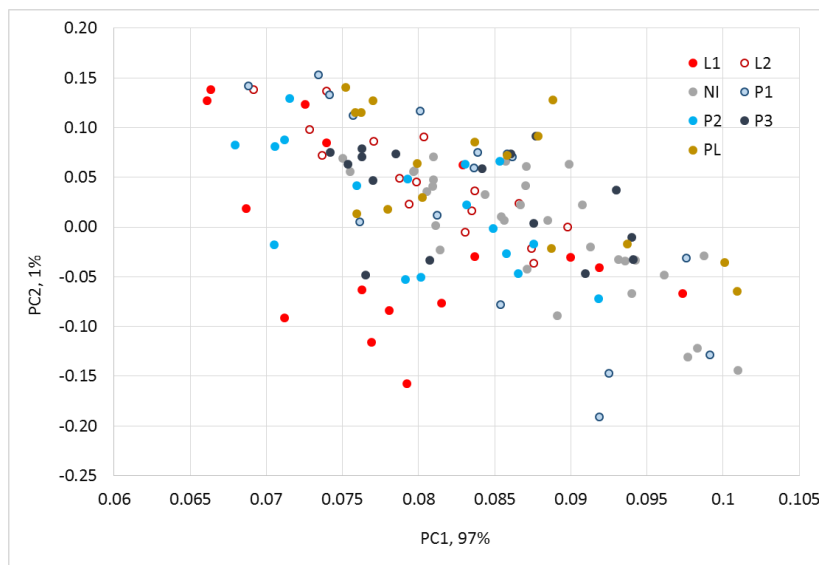


Figura 28- Análise de componentes principais (ACP) aos queijos cujo espectro foi adquirido no interior do queijo.

Como é possível observar na Figura 28, não observa qualquer distinção entre as várias amostras de queijos quando a análise é efetuada no interior do queijo. Isto denota que as possíveis alterações físico-químicas resultantes dos vários inóculos adicionados se fez sentir apenas na camada junto à casca, local onde foi inoculado. Dado que os queijos foram todos processados do mesmo modo o que se observa é a variabilidade inerente à própria amostra.

Para a construção da ACP representada na Figura 27 e 28 foi igualmente utilizado o pré processamento primeira derivada usando o algoritmo de Savitzky–Golay.

V. Considerações Finais e Conclusão

O objetivo deste trabalho foi o estudo dos defeitos associados aos queijos laborados com leite cru, predominantemente em defeitos de cor como é o caso do acastanhamento superficial no queijo.

Após a realização deste estudo concluímos que se o queijo estiver contaminado com *Pseudomonas* spp. principalmente *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* e leveduras principalmente do tipo *Yarrowia lipolytica* e *Candida zeylanoides* é muito provável que o queijo desenvolva o acastanhamento superficial, pois neste estudo estas estirpes foram inoculados em queijos e concluiu-se/observou-se que desenvolveu acastanhamento à superfície, já os não inoculados não tiveram nenhuma alteração na sua cor.

Em relação ao ambiente das câmaras de cura da queijaria está contaminado com bolores, *Pseudomonas* e psicotróficos. Podendo levar ao acastanhamento superficial no queijo. Uma sugestão seria fazerem uma fumigação às 3 câmaras, principalmente à terceira câmara de cura, a câmara de conservação.

Em relação à caracterização das amostras por espectroscopia do infravermelho Espetros NIR e diferenciação das amostras, notou-se que os não inoculados mantiveram-se com a mesma cor ou seja não tiveram acastanhamento. Nas amostras sujeitas ao inóculo, mostra que estes tiveram acastanhamento semelhante. Este estudo foi um trabalho preliminar que futuramente pode resultar na continuidade deste estudo.

VI. Referências Bibliográficas

- Abrantes, M. R., C. S. Campêlo, J. B. A. Silva. 2014. Adulteration of milk: methods of detection and implications for consumer. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 73(3):244-51.
- Adams, M. R., M. O. Moss. 2008. *Microbiology of primary food commodities*. Food Microbiology 3th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry publishing, p. 119-157; 227-231; 252-257; 314-323.
- Almeida, G., R. Magalhães, L. Carneiro, I. Santos, J. Silva, V. Ferreira, T. Hogg, P. Teixeira. 2013. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167 (3), 303-9.
- Anjos, O. 2016. Desenvolvimento de metodologias de análise rápidas em alimentos por espectroscopia de infravermelho (NIR, FTIR, RAMAN). Livro de resumos do III Ciclo de Conferências do CTC do IPCB-ESA. p.33-38.
- Anjos, O., M. G. Campos, P. C. Ruiz, P. Antunes. 2015. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry* 169: 218–223. DOI: 10.1016/Journal Food Chemistry. 2014.07.138.
- Arcuri, E. F., P. D. L. Silva, M. A. V. P. Brito, J. R. F. Brito, C. C. Lange, M. M. A. Magalhães. 2008. Counting, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk. *Ciência Rural*, Santa Maria, vol.38, no.8.
- Balthazar, C. F., T. C. Pimentel, L. L. Ferrao, C. N. Almada, A. Santillo, M. Albenzio, N. Mollakhalili, A. M. Mortazavian, J. S. Nascimento, M. C. Silva, M. Q. Freitas, A. S. Sant'Ana, D. Granato, A. G. Cruz. 2017. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Institute of Food Technologists. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. vol.16.
- Banks, J. M. 2007. Why is ultrafiltration used for cheesemaking and how is it applied?. *Cheese problems resolved*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Barros, A. C. B. B. 2012. Avaliação da aptidão tecnológica do leite de ovelha para o fabrico de queijo de azeitão DOP. Dissertação do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Bienert, G. P., J. K. Schjoerring, T. P. Jahn. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 994–1003.
- Bjorck L., C. G. Rosen, V. Marshall, B. Reiter. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Applied Microbiology*, no.2 vol. 30 p. 199-204.
- Boor, K. J., S. C. Murphy. 2002. *Microbiology of market milks* cap.3. *Dairy Microbiology Handbook*, Third Edition. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bore, E., S. Langsrud. 2005. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkylamine and peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 96–105.
- Caicedo-Ochoa, E. Y., J. A. Urrutia-Gómez, D. S. Fernández-Niño, S. A. Guío-Guerra, Y. R. Méndez-Fandiño. 2017. Tratamiento de la bacteriemia por enterococo resistente a vancomicina con daptomicina versus linezolid: revisión sistemática y metanálisis. *IATREIA* vol. 30 (1).
- Caldera, L., S. Arioli, M. Stuknyte, M. Scarpellini, L. Franzetti. (2015). Setup of a rapid method to distinguish among dead, alive, and viable but not cultivable cells of *Pseudomonas* spp. in mozzarella cheese. *Journal Dairy Science*, 98 (12), 8368-8374.

Carreira, A., L. M. Ferreira, V. Loureiro. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3463–3468.

Carreira, A., A. Paloma, V. Loureiro. (1998). Pigment producing yeasts involved in a brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 41, p.223–230.

Cenci-Goga, B. T., M. Karama, P. Sechi, M. F. Iulietto, S. Novelli, S. Mattei. (2014). Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Dairy Science*, 97:6708 – 6718.

Cevoli, C., A. Gori, M. Nocetti, L. Cuibus, M. F. Caboni, A. Fabbri. 2013. FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated parmigiano reggiano cheese. *Food Research International* 52 p.214 –220.

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

Decker, S. 2014. Controlling mold contamination in the plant environment. Merieux NutriSciences. Available at: <http://foodsafety.merieuxnutrisciences.com/2014/03/13/controlling-mold-contamination-plant-environment/> Acedido em 28 de Julho, 2018.

Diário da República. Portaria nº 73/90. Ministérios do planeamento e da administração do território, da agricultura, pescas e alimentação e do comércio e turismo. 1 de Fevereiro de 1990, p. 436-438.

Dogan, B., K. J. Boor. 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), p.130-138.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European centre for disease prevention and control). 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*; 12(2):3547-4312.

El-Fouly, M. Z., A. M. Sharaf, A. A. M. Shanin, H. A. El-Bialy. 2014. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research Applied Sciences* 1-13.

Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino, F. Villani. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26 228–231.

European commission health and consumer protection directorate-general. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Staphylococcal* enterotoxins in milk products, particularly cheeses. (adopted on 26-27 March 2003). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scv_out61_en.pdf. Acedido em 23 de Maio, 2018.

Farber, J. M., P. I. Peterkin 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511.

Ferraz, A. R. S., 2017. Estudo das vias de contaminação de *Listeria monocytogenes* numa queijaria; PFGE, serotipagem, WGS e resistência a desinfetantes. Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Ferreira, A. R., 2017. Diversidade genética de isolados bacterianos de *Pseudomonas* e géneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo. Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

- Fotou, K., A. Tzora, C. Voidarou, A. Alexopoulos, S. Plessas, I. Avgeris, E. Bezirtzoglou, K. Akrida-Demertzi, P.G. Demertzis. 2011. Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe*, 17, p. 315-319.
- Franzetti, L., M. Scarpellini, 2007. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57 (1), p. 39-47.
- González-Martín, M. I., P. Severiano-Pérez, I. Revilla, A. M. Vivar-Quintana, J. M. Hernández-Hierro, C. González-Pérez, I. A. Lobos-Ortega. 2011. Prediction of sensory attributes of cheese by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, vol. 127, Issue 1, p. 256-263.
- Guessas, B., M. Kihal. 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology* vol. 3 (6), p. 339-342.
- Internacional Dairy Federation, 2013. *Listeria monocytogenes* – relevance to dairy products. Disponível em: <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/04/Factsheet-SCMH-Listeria-Monocytogenes.pdf>. Acedido em 13 de Junho, 2018.
- Irlinger, F., L. Séverine, S. Hélinck, E. Dugat-Bony. 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 362, Issue 2, 1 p. 1–11.
- Jay, J. M., M. J. Loessnet, D. A. Golden. 2005. *Modern food microbiology seventh edition*. Springer Science. p. 149-169.
- Kalina, A. P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* vol. 20, no. 2 p. 185-189.
- Kanner, J., I. Rosenthal. 1992. An assessment of lipid oxidation in foods. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 64, no. 12, p. 1959-1964.
- Lafarge, V., J. C. Ogier, V. Girard, V. Madalen, J. Y. Leveau, A. Gruss, A. D. Buchet. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9), p. 5644-5650.
- Ledenbach, L. H., R. T. Marshall. 2009. Microbiological spoilage of dairy products. compendium of the microbiological spoilage 41 of foods and beverages, food microbiology and food safety. Springer Science and Business Media, p. 44-45;
- Lorenzetti, D. K. 2006. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região Sul. 62 . Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Lucheis, S. B. 2012. Vigilância para *Staphylococcus aureus* produtores de toxinas em leite. *Pesquisa e Tecnologia*, vol. 9, no.1.
- Ludwig, W., K. H. Schleifer, B. Whitman. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. p. 244-268; 594-607.
- Manero, A., A. R. Blanch. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4425–4430 vol. 65, no. 10.
- Martins, A. P. L., 2006. O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo- Efeitos dos principais factores tecnológicos. <https://www.researchgate.net/publication/305032977>. Acedido em 28 de Maio, 2018.
- Masoud, W., F. K. Vogensen, S. Lillevang, W. A. Al-Soud, S. J. Sorensen, M. Jakobsen. 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (1-2), p.192-202.

Meng, L., Y. Zhang, H. Liu, S. Zhao, J. Wang, N. Zheng. 2017. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. *Journal Frontiers in Microbiology*. vol. 8, article 2158.

Naidu, A. S., W. R. Bidlack, R. A. Clemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(1), p.13–126.

Narvhus, J. A., T. H. Gadagab. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology* 86, p.51 – 60.

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). IPQ, Portugal

Park, Y. W., M. Juárez, M. Ramos, G. F. W. Haenlein. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, p.88–113.

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

Perry, K. S. P. 2004. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Serviço de Química e Radioquímica, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CP 941, 30123-970 Belo Horizonte – MG.

Pillonel, L., W. Luginbühl, D. Picque, E. Schaller, R. Tabacchi, J. O. Bosset. 2003. Analytical methods for the determination of the geographic origin of emmental cheese: Mid- and near-infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology*, 216, p.174–178.

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

Pintado, C. M. B. S., A. Oliveira, M. E. Pampulha, M. A. S. S. Ferreira, 2005. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22, p.79-85.

Quigley, L., O. Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, P. D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *Federation of European Microbiological Societies* 37 p.664–698.

Regulamento (CE) Nº 852 (2004) do parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. Obtido em Junho de 2018, de EUR-Lex: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:pt:PDF>

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. Obtido em Junho de 2018, de EUR-Lex: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:PT:PDF>

Samaržija, D., Š. Zamberlin, T. Pogačić. 2012. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo* 62 (2), p.77-95.

Santana, E. H. W., V. Beloti, L. C. Aragon-alegro, M. B. O. C. Mendonça. 2010. estafilococos em alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, vol.77, no.3, p.545-554.

Santana, E. H. W., V. Beloti, M. A. F. Barros, L. B. Moraes, V. V. Gusmão, M.S. Pereira. 2001. Milk contamination in different points of the process: I) aerobic mesophilics and psychrotrophics microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, vol. 22, no.2, p. 145-154.

Schleifer, K. H., J. A. Bell. 2009. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. In: Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F.A. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

Skeie, S. 2007. Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 16, Suppl. 1, p.130-142.

Soomro, A. H., T. Masud, K. Anwaar. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – a review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): p.20-24.

Sorhaug, T., L. Stepaniak. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* February, p. 35-41 vol.8.

Taniwaki, M. H., A. G. F. V. Dender. 1992. Occurrence of toxigenic molds in brazilian cheese. *Journal of Food Protection*, vol. 55, no.3, p. 187-191.

Veiga, S. N. T. 2012. Qualidade microbiológica e físico-química de queijos comercializados em portugal. Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária.

Walstra, P., J. T. M. Wouters, T. J. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology* Second Edition. Taylor and Francis Group, LLC. p. 195.

Wilkins, S. A. 2014. 10 key things you should know about yeast and mold. Merieux NutriSciences. Available at: <http://foodsafety.merieuxnutrisciences.com/2014/07/18/10-key-things-you-should-know-about-yeast-and-mold/> Acedido em 28 de Julho, 2018.

Anexos

Anexo A - Tabelas referente às contagens nos cinco queijos nos 40 dias de cura.

Tabela 1- Valores (UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas no queijo 1 com 40 dias de cura.

Queijo 1					
	<i>Pseudomonas</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras
L1	1,6x10 ⁶	1,4x10 ⁸	2,4x10 ⁷	1,1x10 ⁶	2,2x10 ⁶
L2	1,3x10 ⁶	1,9x10 ⁸	3,5x10 ⁶	9,0x10 ⁴	3,5x10 ⁶
PL	5,0x10 ⁶	1,8x10 ⁸	6,7x10 ⁷	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁶
NI1	3,1x10 ⁶	> 3,0x10 ⁶	1,8x10 ⁷	6,0x10 ⁴	5,6x10 ⁶
NI2	9,6x10 ⁵	> 3,0x10 ⁶	1,8x10 ⁷	1,4x10 ³	1,3x10 ⁶
P1	1,1x10 ⁶	1,0x10 ⁸	3,7x10 ⁷	1,9x10 ⁵	8,4x10 ⁶
P2	5,1x10 ⁵	1,5x10 ⁸	3,3x10 ⁷	4,4x10 ⁵	3,5x10 ⁶
P3	4,3x10 ⁵	7,5x10 ⁷	2,5x10 ⁷	2,4x10 ⁶	1,2x10 ⁷
Média$\pm\sigma$	1,8x10 ⁶ \pm 1,6x10 ⁶	1,4x10 ⁸ \pm 4,3x10 ⁷	2,8x10 ⁷ \pm 1,9x10 ⁷	5,9x10 ⁵ \pm 7,9x10 ⁵	5,2x10 ⁶ \pm 3,6x10 ⁶

Tabela 2- Valores (UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas no queijo 2 com 40 dias de cura.

Queijo 2					
	<i>Pseudomonas</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras
L1	7,6x10 ⁵	1,2x10 ⁸	2,0x10 ⁷	3,4x10 ⁵	8,1x10 ⁶
L2	5,2x10 ⁵	5,1x10 ⁸	2,7x10 ⁷	6,0x10 ⁵	6,7x10 ⁶
PL	1,3x10 ⁵	9,7x10 ⁷	6,6x10 ⁶	2,4x10 ⁵	1,5x10 ⁶
NI1	6,1x10 ⁴	> 3,0x 10 ⁷	1,9x10 ⁷	5,8x10 ⁴	1,9x10 ⁶
NI2	1,1x10 ⁵	5,6x10 ⁷	1,0x10 ⁶	5,6x10 ⁴	1,3x10 ⁵
P1	4,1x10 ⁵	2,1x10 ⁸	1,6x10 ⁷	4,0x10 ⁵	4,4x10 ⁶
P2	2,5x10 ⁶	9,1x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,5x10 ⁵	5,9x10 ⁵
P3	2,9x10 ⁵	5,7x10 ⁷	1,9x10 ⁷	2,5x10 ⁵	1,2x10 ⁶
Média$\pm\sigma$	6,0x10 ⁵ \pm 8,1x10 ⁵	1,6x10 ⁸ \pm 1,6x10 ⁸	1,6x10 ⁷ \pm 8,3x10 ⁶	2,6x10 ⁵ \pm 1,8x10 ⁵	3,1x10 ⁶ \pm 2,9x10 ⁶

Tabela 3- Valores (UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas no queijo 3 com 40 dias de cura.

Queijo 3					
	<i>Pseudomonas</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras
L1	2,8x10 ⁵	3,0x10 ⁸	1,6x10 ⁷	2,3x10 ⁶	5,9x10 ⁶
L2	7,5x10 ⁵	4,9x10 ⁸	1,3x10 ⁸	3,4x10 ⁵	1,3x10 ⁷
PL	2,8x10 ⁶	6,9x10 ⁸	2,5x10 ⁸	3,0x10 ⁶	1,3x10 ⁷
NI1	5,1x10 ⁴	6,5x10 ⁷	1,6x10 ⁷	1,6x10 ⁵	1,3x10 ⁶
NI2	4,6x10 ⁴	1,6x10 ⁸	3,0x10 ⁷	2,5x10 ⁵	1,7x10 ⁶
P1	8,0x10 ⁴	3,5x10 ⁸	3,9x10 ⁷	5,7x10 ⁵	1,0x10 ⁷
P2	1,7x10 ⁶	1,7x10 ⁹	8,6x10 ⁷	7,5x10 ⁶	1,2x10 ⁷
P3	5,8x10 ⁵	1,8x10 ⁸	6,7x10 ⁷	1,5x10 ⁵	5,7x10 ⁶
Média$\pm\sigma$	7,9x10 ⁵ \pm 9,9x10 ⁵	4,9x10 ⁸ \pm 5,1x10 ⁸	7,8x10 ⁷ \pm 7,7x10 ⁷	1,8x10 ⁶ \pm 2,6x10 ⁶	7,8x10 ⁶ \pm 4,8x10 ⁶

Tabela 4- Valores (UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas no queijo 4 com 40 dias de cura.

Queijo 4					
	<i>Pseudomonas</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras
L1	3,5x10 ⁶	1,7x10 ⁸	2,0x10 ⁷	1,0x10 ⁶	2,3x10 ⁶
L2	2,1x10 ⁵	9,0x10 ⁸	4,7x10 ⁷	1,2x10 ⁶	1,1x10 ⁷
PL	1,9x10 ⁵	4,6x10 ⁸	1,3x10 ⁷	9,5x10 ⁵	3,6x10 ⁶
NI1	4,5x10 ³	4,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	9,5x10 ⁵	3,7x10 ⁶
NI2	5,0x10 ³	8,6x10 ⁷	2,2x10 ⁷	6,4x10 ⁴	1,6x10 ⁵
P1	2,7x10 ⁶	2,6x10 ⁸	2,5x10 ⁷	6,0x10 ⁵	3,2x10 ⁶
P2	1,5x10 ⁵	2,7x10 ⁸	2,6x10 ⁷	3,7x10 ⁵	5,4x10 ⁶
P3	1,1x10 ⁵	4,8x10 ⁸	2,0x10 ⁷	1,0x10 ⁶	6,5x10 ⁶
Média$\pm\sigma$	8,6x10 ⁵ \pm 1,4x10 ⁶	3,3x10 ⁸ \pm 2,8x10 ⁸	2,3x10 ⁷ \pm 1,0x10 ⁷	7,7x10 ⁵ \pm 3,9x10 ⁵	4,4x10 ⁶ \pm 3,1x10 ⁶

Tabela 5- Valores (UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas no queijo 5 com 40 dias de cura.

Queijo 5					
	<i>Pseudomonas</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras
L1	7,2x10 ⁶	1,4x10 ⁸	2,1x10 ⁷	2,5x10 ⁵	9,9x10 ⁵
L2	8,5x10 ⁵	7,8x10 ⁷	2,7x10 ⁷	3,6x10 ⁵	1,0x10 ⁶
PL	1,0x10 ⁷	1,7x10 ⁸	6,4x10 ⁷	3,5x10 ⁵	7,2x10 ⁵
NI1	6,2x10 ⁵	3,0x10 ⁷	1,9x10 ⁷	5,0x10 ⁴	8,8x10 ⁴
NI2	4,8x10 ⁴	2,3x10 ⁷	2,3x10 ⁷	< 1,0 x10 ³	7,5x10 ⁴
P1	2,6x10 ⁷	2,0x10 ⁸	8,5x10 ⁷	1,2x10 ⁵	2,6x10 ⁶
P2	2,8x10 ⁷	9,3x10 ⁷	9,0x10 ⁷	< 1,0 x10 ⁴	3,2x10 ⁶
P3	8,9x10 ⁶	6,6x10 ⁷	6,4x10 ⁷	< 1,0 x10 ⁴	7,5x10 ⁵
Média$\pm\sigma$	1,0x10 ⁷ \pm 1,1x10 ⁷	1,0x10 ⁸ \pm 6,5x10 ⁷	4,9x10 ⁷ \pm 3,0x10 ⁷	2,2x10 ⁵ \pm 1,4x10 ⁵	1,2x10 ⁶ \pm 1,1x10 ⁶

Anexo B - Tabela referente dos valores (média UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos cinco queijos nos 40 dias de cura.

Tabela 6- Valores (média UFC/g \pm desvio padrão (σ)) relativos às análises microbiológicas efetuadas aos queijos com 40 dias de cura.

	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores	Leveduras	Mesófilos
Queijo 1	1,8x10 ⁶	1,4x10 ⁸	2,8x10 ⁷	5,9x10 ⁸	5,2x10 ⁶
Queijo 2	6,0x10 ⁵	1,6x10 ⁸	1,6x10 ⁷	2,6x10 ⁵	3,1x10 ⁶
Queijo 3	7,9x10 ⁵	4,9x10 ⁸	7,8x10 ⁷	1,8x10 ⁶	7,8x10 ⁶
Queijo 4	8,7x10 ⁵	3,3x10 ⁸	2,3x10 ⁷	7,7x10 ⁵	4,4x10 ⁶
Queijo 5	1,0x10 ⁷	1,0x10 ⁸	4,9x10 ⁷	2,2x10 ⁵	1,2x10 ⁶
Média$\pm\sigma$	2,9x10 ⁶ \pm 4,2x10 ⁶	2,4x10 ⁸ \pm 1,6x10 ⁸	3,9x10 ⁷ \pm 2,5x10 ⁷	7,3x10 ⁵ \pm 6,4x10 ⁵	4,3x10 ⁶ \pm 2,5x10 ⁶