

Caracterização físico-química e microbiológica de leite e queijo durante os processos de produção e maturação

Ana Rita Cordeiro Proença

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Co-orientador: Prof. Doutor Maximiano José Prata Ribeiro
Co-orientador: Prof. Doutor Luís António Paulino Passarinha

junho de 2020

Aos meus pais, irmã, irmão e namorado.

Agradecimentos

Ao longo da minha vida muitos desafios surgiram, e escrever uma Tese foi um deles. Durante este desafio várias foram as pessoas que tornaram isto possível, a quem eu estou eternamente grata por isso.

Primeiramente quero agradecer à Doutora Susana Ferreira, pela oportunidade e confiança que me deu em ingressar no seu grupo de trabalho. Muito obrigada por ter sido professora e amiga, obrigada pelos seus conselhos, pelas palavras, pela dedicação e paciência, pela partilha de conhecimento e experiência durante este ano. Quero também agradecer ao meu coorientador, Professor Doutor Maximiano Ribeiro, pelas viagens até à cidade da Guarda, pela amizade, pelas palavras, pela partilha do seu conhecimento, pela sua dedicação e apoio demonstrado durante o realizar desta dissertação. Também agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Luís Passarinha, por toda a ajuda, disponibilidade e dedicação que teve sempre para comigo.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, em particular ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), por me ter cedido as suas instalações de forma a poder realizar a minha dissertação. Também quero agradecer ao Instituto Politécnico da Guarda, em particular ao Centro de Potencial e Inovação de Recursos Naturais (CPIRN) pela sua hospitalidade e colaboração na realização de algumas tarefas deste projeto.

O facto de ter trabalhado noutra centro de investigação, permitiu conhecer outras pessoas, adquirir novos conhecimentos e outras experiências. E desde já agradeço à Professora Doutora Paula Coutinho por me ter recebido e me ter feito sentir em “casa”. Quero agradecer também à Andreia Alves que me acompanhou sempre durante a minha passagem pelo CPIRN, por todo o apoio, disponibilidade, paciência e conhecimentos que a me transmitiu. Não esquecendo todos aqueles que com quem pude conviver durante a minha passagem pelo CPIRN, muito obrigado por terem sido sempre impecáveis comigo.

Um agradecimento especial às minhas colegas de laboratório, Alexandra e Cristiana que me acompanharam durante este período, estando sempre dispostas a ajudar sem pedir nada em troca. Obrigada pela vossa paciência, dedicação, disponibilidade e por todos os momentos alegres que passamos juntas. Agradeço também à Ana Rita Alves e Marina, ainda que fosse pouco o tempo, mas que foram fundamentais para a minha integração no grupo, obrigada pela partilha de conhecimento e experiências. Agradeço

também à Ana Nunes, Carolina, Rodrigo e Igor pela vossa amizade, apoio e pelos momentos de risadas. E quero também agradecer ao Doutor Ângelo Luís, pelas suas palavras e pelo seu otimismo, que sempre me transmitiu e agradeço também à Professora Doutora Eugénia Gallardo e à Margarida Grilo por toda a ajuda e disponibilidade que prestaram sempre que precisei.

Agradeço às minhas amigas Raquel, Adriana, Rita e Diana, pela partilha desta caminhada em conjunto. Obrigado pela vossa amizade, lealdade e companheirismo. Agradeço também à Rosa, Mariana Flor, Diana Gomes e Micas pela vossa amizade e por todos os momentos alegres que me proporcionaram.

Quero agradecer a toda a minha família e amigos que me acompanharam nesta longa caminha, que sempre acreditaram que seria capaz. Em especial à minha irmã Zélia que mesmo longe, esteve sempre presente transmitindo-me força e otimismo para alcançar este objetivo. Também agradeço ao meu irmão António pelo companheirismo e pela interajuda nesta longa escrita, dando-me sempre força. Obrigada por estarem sempre comigo.

Agradeço ao meu namorado Nuno por toda a paciência, compreensão, apoio e ajuda que teve sempre comigo. Obrigado por acreditares em mim, obrigado pela tua força, obrigado por tudo.

E porque os últimos são sempre os primeiros, agradeço aos meus pais Maria José e António, pelo apoio e sacrifício que fizeram e continuam a fazer, proporcionando-me uma formação, não só a mim, mas também aos meus irmãos. Obrigada por acreditarem em mim, a vocês eu devo tudo e estarei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim. MUITO OBRIGADO!

Esta longa e difícil caminhada só foi possível com a ajuda de todos vocês. Sem a partilha de sabedoria, sem as gargalhadas, sem as palavras certas nas horas certas, sem os desabafos, sem o amor e amizade nunca seria possível.

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

O queijo é um dos derivados de leite mais consumidos no mundo, sendo os queijos produzidos a partir de leite de cabra cru muito valorizados pelas suas características organoléticas e também pela sua melhor digestibilidade, alcalinidade e pelos seus efeitos benéficos na saúde. Durante a produção de queijo, o processo de maturação é dinâmico e complexo, envolvendo alterações nos níveis microbiológico e bioquímico que resultam em características organoléticas e físico-químicas únicas da variedade de queijo. Assim, este projeto teve como objetivo monitorizar a evolução do perfil físico-químico e microbiológico durante todo o processo de produção e de maturação de queijo de leite de cabra cru em três lotes, permitindo identificar as alterações mais significativas e as diferenças existentes entre os lotes. Durante a maturação ocorreram alterações físico-químicas as quais foram registadas para diferentes parâmetros, como pH, teor de humidade, perda de peso, teor de sal, proteólise, ácidos orgânicos, reologia do leite do queijo, cor do queijo. Entre os parâmetros analisados, a diminuição do pH foi influenciada essencialmente pela formação de ácido láctico, associado à prevalência das populações de bactérias ácido-lácticas encontradas durante a maturação dos queijos. Por conseguinte, estas bactérias produzem enzimas proteolíticas responsáveis pela proteólise do queijo, sendo que, este processo é crucial no desenvolvimento das propriedades texturais e sensoriais finais do queijo. Para além das bactérias ácido-lácticas, outros microrganismos foram determinados, como bactérias mesofílicas totais aeróbias, bactérias psicrotróficas aeróbias, lactobacilos, lactococos, enterococos, *Pseudomonas* spp., enterobactérias, estafilococos, e leveduras e bolores, observando-se uma dinâmica microbiana ao longo da maturação dos queijos dos vários lotes. Na análise sensorial destes queijos, os resultados obtidos foram satisfatórios, verificando-se a sua aceitabilidade pelos consumidores. Assim, foi observado que as reações bioquímicas e microbiológicas ocorridas durante o processo de maturação, assim como, as condições de produção e maturação interferem no perfil dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Em suma, a variabilidade observada entre lotes salienta a relevância da padronização do leite cru usado na produção de queijo, mas também dos processos aplicados durante a produção por forma a assegurar as propriedades físico-químicas e organoléticas mais apreciadas pelos consumidores.

Palavras-chave

Análise sensorial; diversidade microbiana; leite cru; maturação; queijo de cabra; parâmetros físico-químicos

Abstract

Cheese is one of the most consumed milk products in the world, being the cheeses made from raw goat milk highly appreciated for their organoleptic characteristics and also for their better digestibility, alkalinity and beneficial health effects. During cheese production, the maturation process is dynamic and complex, involving changes at the microbiological and biochemical levels that results in the unique organoleptic and physicochemical characteristics of this cheese variety. Thus, this project aimed to monitor the evolution of the physicochemical and microbiological profile of raw goat's milk cheese during the entire production and maturation processes. For that three batches were considered, allowing to identify the most significant changes and the differences among the batches. During maturation, physicochemical changes occur, such as those recorded for different parameters, such as pH, moisture content, weight loss, salt content, proteolysis, organic acids, rheology of milk and cheese, and cheese of colour. Amongst the parameters analysed, the decrease in pH was mainly influenced by the formation of lactic acid, associated with the prevalence of the lactic acid bacteria population found during cheese maturation. These bacteria produce proteolytic enzymes responsible for the proteolysis of cheese, with this process being crucial for the development of the final textural and sensory properties of the cheese. In addition to lactic acid bacteria, other microorganisms were determined, such as total aerobic mesophilic bacteria, aerobic psychrotrophic bacteria, lactobacilli, lactococci, enterococci, *Pseudomonas* spp., enterobacteria, staphylococci, and yeasts and molds, with a microbial dynamics being observed along the maturation of the cheeses from the different batches. In the sensory analysis of these cheeses, the results obtained were satisfactory, verifying their acceptability by consumers. Thus, it was observed that the biochemical and microbiological reactions that occurred during the maturation process, as well as, the conditions of production and maturation interfere in the profile of the physical-chemical and microbiological parameters. In sum, the variability observed between batches highlights the relevance of the standardization of raw milk used in cheese production, but also of the processes applied during production in order to ensure the physicochemical and organoleptic properties most appreciated by consumers.

Keywords

Sensory analysis; microbial diversity; raw milk; maturation; goat cheese; physicochemical parameters

Índice

Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos.....	xxi
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Leite de cabra	4
1.1.1 Composição.....	4
1.1.2 Qualidade e segurança do leite	6
1.2 Transformação do leite em queijo	7
1.3 Diversidade da flora microbiana do leite e do queijo	10
1.3.1 Fontes da diversidade microbiana	11
1.3.2 Composição da microbiota do leite cru e subsequentemente dos queijos de fabrico com leite cru.....	13
1.3.2.1 Microbiota tecnologicamente relevante.....	14
1.3.2.1.1 Lactobacilos	16
1.3.2.1.2 Lactococos	17
1.3.2.2 Microbiota deteriorante.....	18
1.3.2.2.1 Enterococos.....	18
1.3.2.2.6 Bactérias mesofílicas	19
1.3.2.2.2 Bactérias psicrotróficas	19
1.3.2.2.3 <i>Pseudomonas</i> spp.	20
1.3.2.2.4 <i>Enterobacteriaceae</i>	20
1.3.2.2.7 Estafilococos	21
1.3.2.2.5 Leveduras e bolores	22
1.3.2.3 Microrganismos patogénicos.....	23
1.3.2.4 Inibição de microrganismos patogénicos e deteriorantes.....	24
1.3.2.5 Dinâmica microbiana do núcleo e da superfície dos queijos.....	25
1.4 Bioquímica do queijo	26

1.4.1 Alterações microbiológicas	27
1.4.2 Alterações bioquímicas	28
1.4.2.1 Metabolismo da lactose e do ácido láctico.....	28
1.4.2.2 Metabolismo do ácido cítrico	30
1.4.2.3 Proteólise.....	30
1.4.2.3.1 Metabolismo de aminoácidos	31
1.4.2.4 Lipólise	34
1.4.2.4.1 Metabolismo dos ácidos gordos	35
1.5 Diversidade das características organolépticas dos queijos.....	37
Capítulo 2 – Objetivos.....	40
Capítulo 3 – Materiais e métodos	41
3.1 Origem das amostras.....	41
3.2 Recolha das amostras	41
3.3 Determinação do pH das amostras.....	41
3.4 Determinação do teor de humidade nos queijos	41
3.5 Perda de peso do queijo	42
3.6 Determinação do teor sal das amostras.....	42
3.7 Determinação da proteólise nas amostras alimentares.....	43
3.8 Determinação dos ácidos orgânicos nas amostras alimentares	44
3.9 Avaliação da reologia das amostras	44
3.9.1 Determinação da viscosidade do leite	45
3.9.2 Determinação da textura dos queijos	45
3.10 Medição da cor dos queijos	45
3.11 Análise microbiológica das amostras alimentares	46
3.12 Análise sensorial hedónica.....	49
Capítulo 4 – Resultados e discussão	50
4.1 Caracterização físico-química do leite cru e queijo de cabra	50
4.1.1 Avaliação do pH.....	50
4.1.2 Avaliação do teor de humidade e perda de peso do queijo	53

4.1.3 Avaliação do teor de sal	55
4.1.4 Determinação da concentração de grupos de aminos livres, para monitorização do processo de proteólise	58
4.1.5 Avaliação de ácidos orgânicos existentes no leite e no queijo	61
4.1.6 Análise reológica das amostras alimentares.....	66
4.1.6.1 Reologia do leite de cabra cru	66
4.1.6.2 Reologia do queijo de cabra cru	68
4.1.7 Avaliação da cor dos queijos	72
4.2 Avaliação da evolução das populações microbiológicas existentes no leite cru e no queijo durante o processo de maturação	77
4.3 Avaliação sensorial.....	99
Capítulo 5 – Conclusão e perspectivas futuras	104
Capítulo 6 – Referências bibliográficas.....	107
Anexo I	117

Lista de Figuras

Figura 1: Etapas gerais do processamento de queijos (Adaptado de Kongo and Malcata, 2016b).....	7
Figura 2: Caracterização dos microrganismos presentes no leite cru e a função que alguns microrganismos possuem quando presentes no leite (Adaptado de Quigley <i>et al.</i> , (2013)).....	11
Figura 3: Dinâmica geral da evolução do BAL iniciadoras (colunas brancas) e BAL não iniciadoras (colunas pretas) durante a maturação do queijo (exemplo queijo Puzzone di Moena) (Settanni and Moschetti, 2010).	15
Figura 4: Diferentes vias catalisadoras dos α -cetoácidos produzidos pela ação das aminotransferases, e os respectivos produtos formados (McSweeney, 2004).	32
Figura 5: Ácidos gordos livres, precursores de diversos compostos aromáticos do queijo, através de diversas reações. (Adaptado de Khattab <i>et al.</i> , (2019) e McSweeney, (2004)).....	36
Figura 6: Processos envolvidos no desenvolvimento de compostos aromáticos.	38
Figura 7: Coordenadas cartesianas do espaço de cores CIE (L^* , a^* , b^*).....	46
Figura 8: Valores percentuais do peso do queijo (linhas a cheio) e os valores do teor de humidade (linhas a tracejado) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.	55
Figura 9: Valores do teor de sal (%) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.	56
Figura 10: Quantificação da atividade proteolítica, representada pela concentração dos grupos α -amino livres, representados como equivalentes de glicina (mM), determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.	59
Figura 11: Cromatograma característico da mistura dos padrões de ácidos orgânicos a 2%. (1) ácido cítrico (7,3 min.); (2) ácido láctico (10,9 min.); (3) ácido fórmico (11,7 min.); (4) ácido acético (12,8 min.); (5) ácido propiónico (15,3 min.).	62

Figura 12: Relação entre os valores de pH (linhas a cheio) e a produção de ácidos orgânicos (linhas a tracejado - (A) ácido láctico e (B) ácido acético) dos queijos ao longo do processo de maturação. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.	65
Figura 13: Comportamento da viscosidade dos leites de cabra cru, dos três lotes em estudo, após a aplicação de taxas crescentes de cisalhamento (entre 7,5 s ⁻¹ e 150 s ⁻¹). ..	67
Figura 14: Propriedades da textura do queijo de cabra, avaliados ao longo do processo de maturação em cada lote (1,2 e 3), sendo (A) Dureza externa, (B) Dureza interna, (C) Adesividade externa, (D) Adesividade interna). Resultados apresentados em valores médios ± desvio padrão.	69
Figura 15: Exemplo das alterações da cor do exterior no queijo de cabra.	72
Figura 16: Relação inversamente proporcional entre os valores de pH (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios ± desvio padrão.	97
Figura 17: Relação diretamente proporcional entre as concentrações de ácido láctico (A) e acético (B) (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios ± desvio padrão.	97
Figura 18: Relação diretamente proporcional entre a atividade proteolíticas (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios ± desvio padrão.	98
Figura 19: Avaliação dos queijos de cabra cru, dos três lotes em estudo. Resultados apresentados de acordo com as classificações atribuídas pelos consumidores, através de uma escala hedônica de 9 pontos para avaliação sensorial e através de uma escala de 5 pontos para a avaliação da intenção de compra, sendo (A) Aparência, (B) Odor, (C) Textura, (D) Sabor, (E) Teor de sal e (F) Intenção de compra.	102

Lista de Tabelas

Tabela 1: Variedades de queijo e sua classificação (Adams and Moss, 2008).	3
Tabela 2: Comparação dos constituintes do leite de cabra, vaca e humano (valores médios por 100 g) (Park <i>et al.</i> , 2017).	5
Tabela 3: Enzimas comerciais de coagulação do leite e suas fontes (Farkye, 2003; Farkye, 2004)	8
Tabela 4: Fontes diretas e indiretas da flora microbiana do leite e microflora predominante (Adams and Moss, 2008; Montel <i>et al.</i> , 2014).	12
Tabela 5: Bactérias ácido-lácticas iniciadoras e não iniciadoras, isoladas durante o fabrico de queijo (Settanni and Moschetti, 2010).	15
Tabela 6: Valores de pH determinados no leite e durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.....	51
Tabela 7: Valores do teor de humidade (%) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.	53
Tabela 8: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos determinados no leite de cabra cru e no queijo durante a maturação. Os resultados são expressos em % de ácido orgânico, apresentados como média \pm desvio padrão.....	63
Tabela 9: Parâmetros da cor relativos à superfície e ao interior do queijo de cabra cru, verificados durante o processo de maturação, dos três lotes em estudo. Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.	74
Tabela 10: Avaliação microbiológica do leite de cabra cru e do queijo de cabra, ao longo do processo de maturação, em três lotes (\log_{10} ufc/mL de leite ou \log_{10} ufc/g de queijo). Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.	79

Lista de Acrónimos

APPCC	Análise de Perigos e de Pontos Críticos de Controle
BAL	Bactérias ácido-lácticas
CFC	Cetrimida, ácido fusídico e Cefalosporina
CIE	Comissão Internacional de Iluminação
CTT	Cloreto de trifetil tetrazólio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LPL	Lipoproteína lípase
MGGL	Membrana do glóbulo da gordura do leite
PCA	<i>“Plate Count Agar”</i>
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
ufc	Unidades formadoras de colónias
UHT	Temperatura ultra alta
UV	Ultravioleta
YGCA	<i>“Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar”</i>
η	Viscosidade

Capítulo 1 – Introdução

No setor de laticínios, a produção de diversos produtos lácteos utilizando leite cru apresenta algumas preocupações ao nível da segurança alimentar. Isto pelo facto de o leite cru ser reconhecido como um dos principais responsáveis de doenças transmitidas por alimentos, seja pelo seu consumo direto ou através do consumo dos seus derivados, como queijos produzidos a partir de leite cru (Almeida *et al.*, 2007; Tirloni *et al.*, 2014).

O leite é um alimento extremamente nutritivo que pode ser obtido a partir de vários animais, como vacas, cabras, ovelhas e búfalos, além de humanos, para consumo humano (Quigley *et al.*, 2013). O leite cru é caracterizado por uma comunidade microbiana complexa (bactérias ácido-lácticas, bactérias de Gram negativo, de Gram positivo e catalase positiva, e ainda leveduras e bolores), é rico em nutrientes (proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais), apresenta elevada atividade da água e um pH próximo de 7,0 (D'amico, 2014; Montel *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013; Tirloni *et al.*, 2014). Estas características proporcionam um ótimo meio de crescimento de microrganismos com relevância tecnológica, como as bactérias ácido-lácticas (BAL), mas também de microrganismos contaminantes, associados à sua deterioração e à patogenicidade (Andretta *et al.*, 2019; Cancino-Padilla *et al.*, 2017; D'amico, 2014; Tirloni *et al.*, 2014).

Muitos dos microrganismos deteriorantes modificam as características organolépticas do queijo de forma negativa, através de alterações enzimáticas dos componentes do leite (D'amico, 2014). Os agentes patogénicos mais frequentemente associados ao leite cru e ao queijo produzido com leite cru, são: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter*, estando associados a diversos surtos alimentares (Andretta *et al.*, 2019; Cancino-Padilla *et al.*, 2017).

A contaminação do leite ocorre a partir de microrganismos presentes, em animais infetados, no ambiente agrícola, nas rações de animais, assim como nos equipamentos de ordenha e de processamento. Assim a saúde do animal, o manuseio inadequado do leite e uma má higienização, podem originar um baixo rendimento e má qualidade do produto, sendo ainda possíveis fontes de surtos alimentares (D'amico, 2014).

Por estas razões é essencial existirem sistemas de inspeção e certificação de alimentos, processos de análise de perigos e de pontos críticos de controle (APPCC), que haja a implementação de princípios de boas práticas de fabricação na produção de leite e queijo e existência de limites microbiológicos no produto final (Almeida *et al.*, 2007;

D'amico, 2014; Montel *et al.*, 2014). Assim, com a implementação destes sistemas pretende-se reduzir o risco associado ao consumo de produtos fabricados com leite cru bem como de outros produtos lácteos, mas também manter a sua qualidade (D'amico, 2014; Montel *et al.*, 2014).

O queijo é um dos derivados de leite mais consumido e apreciado em todo o mundo (Fernandes *et al.*, 2018). As características da sua estrutura são consideravelmente afetadas por muitos parâmetros, desde as características da matéria prima até aos fatores de processamento (Correia *et al.*, 2014). O queijo, é um produto lácteo rico em proteínas e gorduras, obtido pela coagulação do leite com expulsão do soro do leite, dando origem à coalhada, e após o seu processamento e a sua maturação é alcançado o produto final desejado (Cankurt, 2019). A produção de queijo com leite cru é um processo complexo e dinâmico, não só pelas diversas reações que ocorrem durante a maturação, mas também pela consistência das características de qualidade e segurança do queijo (D'amico, 2014; McSweeney, 2004).

Os queijos de leite cru apresentam características organoléticas únicas reconhecidas pelos consumidores como um sabor mais forte, rico e intenso, em relação aos queijos de leite pasteurizado (Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016). Estes atributos derivam dos microrganismos da microbiota nativa do leite cru, como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Enterococcus* spp. (Yoon *et al.*, 2016). Para além disso, estes queijos geralmente têm maiores quantidades de compostos aromáticos (ácidos, aldeídos, álcoois, ésteres e compostos de enxofre), com exceção de algumas cetonas (Montel *et al.*, 2014). A produção de queijo está dividida em vários processos, onde pequenas variações, como o uso de diferentes leites permitem originar múltiplas variedades de queijo (Adams and Moss, 2008). Assim a classificação dos queijos torna-se difícil, contudo a determinação do teor de humidade foi uma abordagem bem-sucedida para a classificação dos queijos (Tabela 1), uma vez que, a humidade determina o corpo, a consistência ou a compacidade do queijo, permitindo assim agrupar queijos semelhantes, com determinadas características (Adams and Moss, 2008; Farkye, 2004).

O leite de cabra cru como os seus derivados, iogurte e queijo, são importantes na nutrição humana, especialmente para pessoas alérgicas ao leite de vaca e com distúrbios gastrointestinais (Togay *et al.*, 2017). Os queijos produzidos a partir de leite de cabra são muito valorizados pelas suas características organoléticas e também pela sua melhor digestibilidade, alcalinidade e pelos seus efeitos benéficos na saúde (Fernandes *et al.*, 2018).

Tabela 1: Variedades de queijo e sua classificação (Adams and Moss, 2008).

Percentagem de humidade	Propriedades	Variedades de queijo
50–80 % Queijos Macios	Não maturados	Cottage, Quark, Cream, Mozzarella
	Maturados	Camembert, Brie, Neufchatel (fabricado na França), Caciotta, Cooked
	Curado em sal ou em conserva	Feta, Domiati
39–50 % Queijos Semi-Macios	Maturados principalmente pelo crescimento interno de fungos	Roquefort (leite de ovelha), Stilton, Gorgonzola, Danish Blue
	Maturado por bactérias e microrganismos de superfície	Limburger, Brick, Trappist, Port Salut
	Maturado principalmente por bactérias	Bel Paesa, Pasta Filata, Provolone, Brick, Gouda, Edam
<39 % Queijos Duros	Sem olhos, maturados por bactérias	Cheddar, Caciocavallo
	Com olhos, maturados por bactérias	Emmental, Gruyère
<34 % Queijos Muito Duros		Asiago old, Parmesan, Romano, Grana

Tipicamente, os queijos tradicionais portugueses são geralmente fabricados a partir de leite cru, sem a adição de nenhuma cultura iniciadora, utilizam apenas a microflora nativa do leite, composta principalmente por (BAL) (Pereira *et al.*, 2011). A fermentação destes queijos ocorre espontaneamente pela ação da microbiota natural, principalmente das BAL (Togay *et al.*, 2017). As interações que ocorrem entre a microflora nativa e a matriz do queijo, originam compostos de sabor particulares, resultando em características únicas, atribuídas aos queijos tradicionais (Pereira *et al.*, 2011).

Por conseguinte, o facto de não existir padronização da microflora nativa do leite e de não existir nenhum iniciador padronizado, é possível que seja encontrada variabilidade das características dentro de um determinado tipo de queijo (Montel *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011). As características finais do queijo podem variar entre os produtores ou mesmo lotes devido às diferenças na tecnologia de produção de queijo, na composição química e microbiana do leite (resultado das condições de produção, higiene, população microbiana existente no ambiente fabril, entre outros) (Gonçalves *et al.*, 2018).

O consumo direto de leite cru em Portugal é escasso, por outro lado a produção e o consumo de queijo produzido com leite cru é frequente, sendo que vários queijos de leite cru são exportados. De entre estes, o queijo de cabra produzido com leite cru tem uma procura elevada pelo consumidor sendo que, de acordo com o Instituto Nacional

de Estatística, a produção de queijo de cabra em 2018 apresentou um crescimento na produção em 3,8 mil toneladas (+ 29,7%) (Lima, F. 2019).

1.1 Leite de cabra

O leite de cabra, confere propriedades nutricionais aos seus derivados, devido às suas características composicionais, como teor de matéria orgânica e azotada (caseína e albumina), minerais, vitaminas, e fermentos lácticos, que melhoram o processo de digestão e defesa contra bactérias patogênicas intestinais (Gomes *et al.*, 2013). Especificamente, tem propriedades particulares que conferem vantagens em relação ao leite de vaca, como: tamanho inferior dos glóbulos de gordura, atribuindo uma textura mais suave aos produtos lácteos, menor quantidade de α_{s1} -caseína, resultando em produtos mais macios, maior capacidade de retenção de água, viscosidade mais baixa, fração proteica mais digerível e menos alergênica e fração lipídica também mais digerível. Para além disso possui um conteúdo mineral e uma disponibilidade nutricional com qualidades superiores ao leite de vaca (Gomes *et al.*, 2013; Picon *et al.*, 2019).

Assim, o leite de cabra é considerado uma matéria-prima de elevada qualidade na produção de alimentos para bebês, idosos e para humanos com necessidades específicas, nomeadamente para pessoas que tenham um sistema digestivo mais vulnerável, como, crianças, idosos, pessoas debilitadas ou pessoas intolerantes e alérgicas ao leite de vaca (Guo, 2003; Getaneh, *et al.*, 2016; Gabas *et al.*, 2012; Picon *et al.*, 2019). Contudo, o sabor do leite de cabra é mais intenso comparativamente ao leite de vaca, podendo limitar a aceitação dos seus produtos pelos consumidores (Gomes *et al.*, 2013).

1.1.1 Composição

O leite é um produto alimentar bastante nutritivo, tanto para os jovens mamíferos como para o ser humano (D'amico, 2014). Alguns animais são usados para produzir leite para consumo humano, no entanto, a vaca é o animal mais propício para esse fim comercial. Os principais constituintes do leite independente do animal que o fornece são água, gordura, proteína e lactose (Adams and Moss, 2008).

O leite de cabra, é caracterizado pela sua composição bruta, incluindo sólidos totais, gordura, proteína, lactose e cinzas (Guo, 2003). Como mostra a tabela 2, a composição do leite de cabra e de vaca apresentam algumas semelhanças. No entanto o leite de

cabra apresenta maior teor de gordura, de proteínas e cinzas, possuindo um teor de lactose menor, em relação ao leite de vaca (Park *et al.*, 2017).

Comparativamente aos leites de vaca ou humano, o leite de cabra distingue-se pelo facto de apresentar melhor digestibilidade, maior alcalinidade, maior capacidade tampão e possui efeitos benéficos na saúde humana (Fernandes *et al.*, 2018; Gabas *et al.*, 2012).

Tabela 2: Comparação dos constituintes do leite de cabra, vaca e humano (valores médios por 100 g) (Park *et al.*, 2017).

Constituintes	Cabra	Vaca	Humano
Gordura (g)	3,8	3,6	4
Proteínas (g)	3,5	3,3	1,2
Lactose (g)	4,1	4,6	6,9
Cinza (g)	0,8	0,7	0,2
Sólidos totais (g)	12,2	12,3	12,3
Calorias (cal)	70	69	68

A composição do leite de cabra pode variar de cabra para cabra e diferir entre as suas espécies (Getaneh, *et al.*, 2016). Assim as alterações na sua composição podem ser afetadas por muitos fatores, incluindo alimentação, condições ambientais e de manuseio, estado nutricional e de saúde do animal, entre outros (Guo, 2003; Adams and Moss, 2008).

Relativamente à composição lipídica, o leite de cabra é composto maioritariamente por triglicerídeos (cerca de 98%), sendo também composto por fosfolípidos (1%); colesterol e seus ésteres (1%). O tamanho reduzido dos glóbulos de gordura, e a falta de aglutinina, um agente de aglomeração, no leite de cabra, faz com que o leite tenha uma fraca capacidade de desnatação a temperaturas mais baixas, sendo que a aglomeração dos glóbulos de gordura não acontece (Guo, 2003). Contudo estas moléculas de gordura mais pequenas proporcionam uma melhor dispersão e uma mistura mais homogénea da gordura no leite de cabra (Getaneh, *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017). O leite de cabra apresenta níveis mais altos de ácidos gordos de cadeia curta (C4-C10) em comparação com o leite de vaca (Guo, 2003; Farkye, 2003). Sendo, que os ácidos gordos livres de cadeia curta do leite de cabra, principalmente C6 e C8, são os responsáveis pelo sabor específico “de cabra” dos produtos lácteos de cabra (Guo, 2003).

Na composição do leite de cabra também fazem parte proteínas, sendo as principais a α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina, contendo também α_{s1} -caseína em níveis inferiores (Guo, 2003; Park *et al.*, 2017). Relativamente às

proteínas β -lactoglobulina e α -lactalbumina, estas são as principais proteínas do soro do leite de cabra (Guo, 2003). As diferenças estruturais da proteína lactalbumina anula as alergias existentes por esta proteína ao leite de vaca, quando se considera o leite de cabra (Getaneh, *et al.*, 2016).

Em relação ao principal carboidrato do leite de cabra, a lactose, a sua concentração é menor comparando com o leite de vaca. Além da lactose existem outros carboidratos em quantidades menores como o inositol e quantidades vestigiais de galactose e ácido siálico (Guo, 2003; Getaneh, *et al.*, 2016).

O conteúdo mineral do leite de cabra é composto principalmente por cálcio, sódio, magnésio, fósforo, potássio e zinco, sendo que existem outros minerais vestigiais, como, manganês, selênio, cobalto, cobre e ferro (Getaneh, *et al.*, 2016). Dos vários minerais que completam o leite, o leite de cabra é mais rico em cálcio, fósforo, potássio, magnésio e cloro (Guo, 2003).

A respeito dos níveis de vitamina do leite da cabra, este apresenta elevadas concentrações de vitamina A em relação ao leite de vaca. As cabras convertem todos os carotenos em vitamina A, conferindo ao leite uma cor mais esbranquiçada relativamente ao leite bovino. No entanto, o leite é deficiente em vitamina C e D, e em ácido fólico, contendo apenas 20% em relação ao leite de vaca (Guo, 2003).

1.1.2 Qualidade e segurança do leite

Os produtos lácteos devem ser seguros, livres de bactérias patogênicas, de bactérias deteriorantes, de antibióticos, de inseticidas e de herbicidas, além que devem apresentar um bom sabor e conter os limites mínimos legais para todos os nutrientes (Park *et al.*, 2017). Para que a produção e a comercialização dos produtos lácteos caprinos sejam bem-sucedidas, é essencial que a produção de leite cru ocorra com elevada qualidade. Na composição do leite existem vários componentes, como teor de gordura, proteína e lactose, sólidos totais e a contagem de células somáticas, que requerem uma atenção especial, uma vez que influenciam a qualidade e a produção dos queijos (Panikuttira *et al.*, 2018). Por conseguinte a qualidade e a composição do leite também terão influência na qualidade e rendimento dos queijos (Panikuttira *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2017). Para garantir a segurança e qualidade do leite também é realizada a análise microbiana e a análise dos possíveis adulterantes e contaminantes (Panikuttira *et al.*, 2018).

1.2 Transformação do leite em queijo

O processo de transformação do leite em queijo ocorre através de quatro etapas principais (Figura 1), comuns para todos os queijos, por conseguinte durante o fabrico dos mesmos a tecnologia aplicada pode ser diferente, contribuindo dessa forma para as características únicas e distintas de cada qualidade de queijo. As diferenças podem estar associadas às características do leite, tipo de cultura inicial, tempo e temperatura de coagulação, procedimentos da drenagem do soro, tipo de salga e por fim às condições de maturação dos queijos (Kongo and Malcata, 2016b).



Figura 1: Etapas gerais do processamento de queijos (Adaptado de Kongo and Malcata, 2016b).

Para o fabrico de queijo é importante a recolha de leite bem como o seu armazenamento. O leite recolhido na ordenha é imediatamente refrigerado. Este é armazenado em tanques sujeitos a baixas temperaturas antes de ser transportado por um camião refrigerado, para a fábrica de lacticínios, sendo mantido em tanques refrigerados até à sua utilização (Adams and Moss, 2008).

A coagulação é a primeira etapa do processo de transformação do leite em queijo, sendo um processo relevante na etapa de maturação dos queijos (Farkye, 2003; Kongo and Malcata, 2016b; Panikuttira *et al.*, 2018). O processo de coagulação do leite permite transformar o leite em coágulo com propriedades viscoelásticas desejadas utilizando agentes coagulantes (Panikuttira *et al.*, 2018). Nesta etapa, o leite é dividido em coalhada (parte sólida) e soro (parte líquida) (Real *et al.*, 2018). A coalhada forma-se porque as proteínas do leite sofrem coagulação enzimática durante o fabrico de queijo, resultando numa proteína fragmentada que precipita (Kongo and Malcata, 2016a; Park *et al.*, 2017). Por conseguinte a firmeza da coalhada, está fortemente relacionada com o teor de α_{s1} -caseína do leite de cabra (Park *et al.*, 2017). Para além disso, as características reológicas do coágulo e o tempo em que este é cortado, contribuem para a qualidade e produção de queijos (Panikuttira *et al.*, 2018).

A coagulação do leite ocorre assim através dos agentes coagulantes, designados por enzimas de coagulação do leite, sendo mais conhecidos por coalho (Farkye, 2003; Panikuttira *et al.*, 2018). A reação principal da coagulação é a clivagem da proteína do leite, a κ -caseína, proteína responsável pela estabilidade da micela da caseína, entre a ligação fenilalanina 105 e a metionina 106 (Adams and Moss, 2008; Farkye, 2003;

Farkye, 2004). Durante este processo, cerca de 0 a 30 % do coalho utilizado é retido no queijo. A retenção das enzimas de coagulação (quimosina, pepsina bovina ou suína) no queijo aumenta quando o coalho é adicionado e o pH do leite se encontra baixo. Contudo para as restantes enzimas (Tabela 3), o pH do leite não afeta a retenção das mesmas na coalhada do queijo (Farkye, 2003). Existem várias enzimas de coagulação de índole comercial, como apresentado na tabela 3. Dependendo do tipo de coalho utilizado, o nível de proteólise é diferente. Em geral, queijos feitos com pepsina suína, os níveis de proteólise são mais baixos, enquanto que com coalho microbiano os níveis de proteólise são mais elevados (Farkye, 2003).

Tabela 3: Enzimas comerciais de coagulação do leite e suas fontes (Farkye, 2003; Farkye, 2004)

Nome comercial	Nome sistemático	Fonte
Coalho de bezerros	Quimosina	Estômago de bezerro
Coalho bovino	Pepsina A	Estômago bovino adulto
Pepsina suína	Pepsina A	Estômago de porco
Coalho microbiano	Mucorpepsina	<i>Mucor pusillus</i> Lindt
	Mucorpepsina	<i>Mucor miehei</i>
	Endotiapepsina	<i>Cryphonectria parasitica</i>
Coalho produzido por fermentação	Quimosina	<i>Escherichia coli</i> K12
		<i>Kluyveromyces lactis</i>
		<i>Aspergillus niger</i>

Após a coagulação e o corte da coalhada, esta é cozida ou escaldada para expulsar o soro na etapa seguinte da sua drenagem, denominada de sinérese (Farkye, 2004). A sinérese ocorre quando o soro é expelido das partículas da coalhada, que ocorre durante o corte do coágulo. Este processo é bastante importante na maturação do queijo uma vez que a sinérese é capaz de influenciar a acidez, a humidade, o conteúdo mineral e o teor de lactose antes da maturação do queijo (Panikuttira *et al.*, 2018).

Após a sinérese e formação da coalhada, os queijos são salgados, através do processo de salga. Nesta fase de fabrico de queijo, é adicionado sal à coalhada, através de diferentes métodos (Real *et al.*, 2018; Guinee, 2004). No geral, os queijos são mantidos em salmoura ou são salgados por aspersão de sal (Cankurt, 2019). Estes processos originam uma distribuição não homogénea do sal no queijo, condição que pode restringir a taxa de proteólise nos queijos (Faccia *et al.*, 2015; Kongo *et al.*, 2009).

A absorção do sal para o queijo é explicada por eventos de difusão e osmose (salga por salmoura) e por eventos de difusão (salga a seco e salga a seco de superfície) (Cankurt, 2019; Guinee, 2004). As diferenças da difusão do sal no queijo podem explicar o sabor menos salgado apercebido pelos consumidores (Faccia *et al.*, 2015). O processo de salga confere ao queijo um sabor e aparência característicos, concede dureza e proporciona

um período de conservação maior do queijo (Real *et al.*, 2018; Ayyash and Shah, 2010; Cankurt, 2019). Além disso, o sal influencia o período de maturação; a proteólise que conseqüentemente, afetará a sua estrutura e o seu sabor; interfere nas operações do coalho; o crescimento bacteriano; as atividades enzimáticas e a sinérese nos queijos (Ayyash and Shah, 2010; Cankurt, 2019; Farkye, 2004). Relativamente à sinérese, o sal favorece a remoção do soro do queijo e ajuda a estabelecer o equilíbrio da água, resultando na diminuição da atividade de água do produto, que por sua vez permite exercer o controle sobre o crescimento microbiano (Cankurt, 2019; Freitas *et al.*, 1995; Guínee, 2004).

A salga é considerada uma etapa fundamental no fabrico de queijos, uma vez que o sal permite preservar e melhorar o sabor dos queijos (Ayyash and Shah, 2010; Cankurt, 2019; Farkye, 2004) produzindo dessa forma, queijos com qualidades desejadas, relativamente às regulamentações legais estabelecidas e desejos dos consumidores (Cankurt, 2019).

Por fim, a última etapa, a maturação ou amadurecimento do queijo, é o processo mais importante do fabrico dos queijos (Yoon *et al.*, 2016). Esta fase consiste no repouso do queijo com temperatura e humidade controladas, por um determinado tempo, de acordo com o tipo de queijo, de forma a adquirir propriedades organolépticas únicas, tal como a formação da sua casca (Real. *et al.*, 2018).

A maturação do queijo, é um processo complexo, dinâmico e lento, envolvendo uma série de reações microbiológicas, bioquímicas e químicas, que resultam na alteração da textura e do sabor, característicos de cada variedade (Galiou *et al.*, 2013; Farkye, 2003; Khattab *et al.*, 2019; Kongo *et al.*, 2009; McSweeney, 2004; Shiota *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2016). As reações decorridas durante este processo permitem a ocorrência de alterações físicas e químicas, como variações no pH, quebra de proteínas, acumulação lenta de aminoácidos e degradação lipídica (Fernandes *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2011). Para além, dos processos químicos da proteólise e da lipólise, a glicólise também ocorre durante a maturação do queijo (Farkye, 2004; Fernandes *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2010, 2011). Contudo, a relevância de cada um dos processos químicos depende do tipo de queijo em processamento (Farkye, 2004).

O processo de glicólise envolve várias reações, principalmente associadas à degradação da lactose, pelo que, a proteólise é conduzida principalmente por enzimas endógenas do leite, agentes coagulantes e enzimas microbianas produzidas por bactérias lácticas. Estas desempenham um papel crucial nas propriedades texturais e sensoriais finais do queijo, enquanto a lipólise induz mudanças específicas no perfil de ácidos gordos

(Fernandes *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2010). Por conseguinte, as principais alterações bioquímicas que ocorrem durante a maturação do queijo são determinadas pela microbiota nativa do leite cru, quando nenhuma cultura inicial é adicionada, que origina um sabor único ao queijo (Pino *et al.*, 2018). A maturação atua assim, como um processo de seleção natural, durante a qual, a flora patogénica existente é normalmente inibida pelas BAL (Zárate *et al.*, 1997).

Adicionalmente, todo o processo de maturação é influenciado por diversos componentes, nomeadamente, pelo leite, agentes coagulantes, microrganismos, enzimas proteolíticas e lipolíticas, parâmetros físicos do processo (temperatura e tempo de armazenamento, humidade), teor de sal, pH e pela tecnologia de processamento (Fernandes *et al.*, 2018; Panikuttira *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2017). A seleção da temperatura ideal ocorre para facilitar o processo de maturação e impedir o crescimento de bactérias indesejáveis, que possam causar deterioração e transmitir doenças por alimentos (Yoon *et al.*, 2016). No entanto, os três parâmetros fundamentais para controlar as reações bioquímicas: pH, atividade da água e concentração de sal, são estipulados durante o fabrico da coalhada de queijo. As alterações nesses parâmetros podem originar queijos com textura e/ou sabor inconsistentes (Kongo *et al.*, 2009).

A maturação permite assim transformar um queijo “verde”, duro com sabor suave para um queijo “maduro”, firme com sabor característico (Farkye, 2003).

1.3 Diversidade da flora microbiana do leite e do queijo

A composição da microbiota do leite afeta diretamente o desenvolvimento de produtos lácteos (Quigley *et al.*, 2013). Várias fontes contribuem para a diversidade da flora microbiana encontrada no leite e subsequentemente no queijo (Figura 2) (Adams and Moss, 2008; Montel *et al.*, 2014).

No leite, os microrganismos podem desempenhar diferentes funções no fabrico dos produtos lácteos. Os microrganismos podem melhorar a segurança do produto e promover a saúde, ajudando na digestão ou reduzindo as alergias (asma e doenças atópicas) em indivíduos que consomem leite cru durante os primeiros anos de vida. Mas também podem levar à deterioração do leite e dos seus derivados, interferindo negativamente na qualidade do leite e no prazo de validade dos produtos. Além disso, podem contribuir para infeções e doenças humanas pelo consumo de leite contaminado com patogénicos. Os microrganismos podem ainda promover a fermentação da lactose do leite através da produção de ácido láctico e contribuir para as propriedades

organolépticas, com efeitos variados nos produtos lácteos (Figura 2) (Quigley *et al.*, 2013).

As bactérias promotoras da saúde, são denominadas como probióticos, sendo definidos pela Organização Mundial de Saúde como “Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Quigley *et al.*, 2013; Settanni and Moschetti, 2010). Muitos isolados do leite cru têm características probióticas, um exemplo são os lactobacilos probióticos que geralmente inibem os microrganismos patogênicos, reduzem a intolerância à lactose, aumentam a resposta imune e normalmente são isolados gastrointestinais (Quigley *et al.*, 2013).

Da microbiota do leite cru podem fazer parte as bactérias de Gram negativo, de Gram positivo e catalase positiva, ainda bactérias ácido-lácticas, leveduras e bolores. As bactérias de Gram negativo são abundantes e diversas, estando presentes tanto no leite cru como nos queijos (Montel *et al.*, 2014).

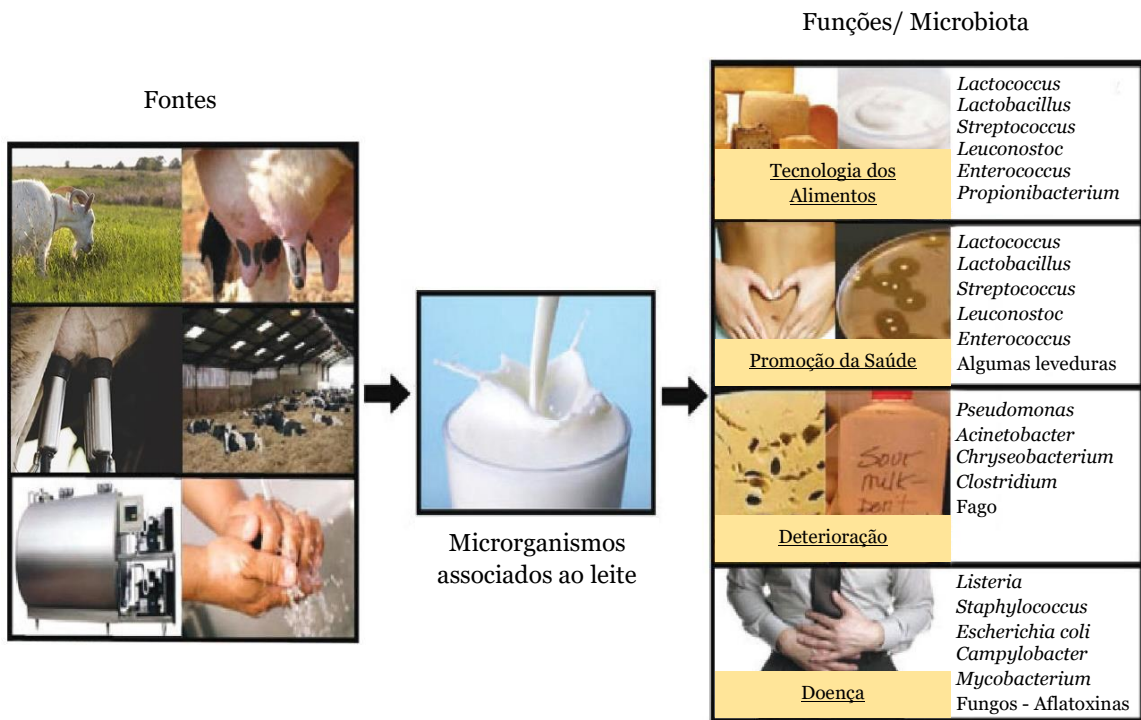


Figura 2: Caracterização dos microrganismos presentes no leite cru e a função que alguns microrganismos possuem quando presentes no leite (Adaptado de Quigley *et al.*, (2013)).

1.3.1 Fontes da diversidade microbiana

O leite cru pode atuar como uma fonte direta de microrganismos, sendo que diversas fontes podem contribuir para a microbiota do leite como: o contacto com o animal, o

contacto com os equipamentos utilizados na ordenha, a utilização de água na lavagem das máquinas das ordenhas ou tanques utilizados no armazenamento do leite, e por fim todo o manuseio do leite (Tabela 4) (Adams and Moss, 2008; Montel *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013).

O leite cru pode também ser contaminado por uma fonte indireta de microrganismos, adquirindo-os na alimentação, no local de rega, na água de consumo ou de lavagem, no ambiente da sala de ordenha e nas instalações dos animais, e através da higiene insuficiente da quinta ou dos trabalhadores (Tabela 4) (Adams and Moss, 2008; Montel *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013).

Tabela 4: Fontes diretas e indiretas da flora microbiana do leite e microflora predominante (Adams and Moss, 2008; Montel *et al.*, 2014).

Fontes diretas e indiretas	Microflora predominante	
Interior da teta	Filos Actinobacteria e Firmicutes (famílias <i>Clostridiaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> e menos frequente <i>Lactobacillaceae</i>); Filo Proteobacteria	
Superfície da teta	Estafilococos coagulase-negativos, bactérias corineformes, <i>Enterobacteriaceae</i> , bactérias associadas à deterioração, bactérias ácido-lácticas (por exemplo, <i>Lactococcus lactis</i>) e bactérias de Gram negativo não fermentativas (<i>Pseudomonas</i>)	
Nota: Nem todas as espécies são encontradas no leite cru.		
Equipamentos utilizados na ordenha	Diversos microrganismos na forma de biofilmes.	
Água de lavagem das máquinas das ordenhas ou tanques	Bactérias do ácido-lácticas, <i>Staphylococcus</i> sp., bactérias corineformes (<i>Micrococcus</i> sp.), leveduras, bactérias de Gram negativo (<i>Pseudomonas</i> sp. ou <i>Hafnia alvei</i>)	
Alimentação	Pastagem	Altos níveis de bactérias de Gram negativo (<i>Enterobacteriaceae</i>), estafilococos, bactérias corineformes (<i>Curtobacterium</i> sp.), leveduras e baixos níveis de <i>Lactococcus lactis ssp. Lactis</i>
	Silagem	BAL (<i>Pediococcus pentosaceus</i> , lactobacilos), <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, bactérias filamentosas, leveduras e bolores e Clostridia (<i>C. butyricum</i> e <i>C. tyrobutyricum</i>)
	Feno	Géneros fúngicos (<i>Eurotium</i> sp.), <i>Actinomycetaceae</i> mesofílicos e termofílicos, bactérias de Gram positivo (<i>Curtobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.) e bactérias de Gram negativo (<i>Pantoea</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.)
Local de rega	Leveduras, <i>Pseudomonas</i> sp. e bactérias coliformes	
Água de consumo ou de lavagem	Formação de aerossóis ou de biofilmes	
Ambiente da sala de ordenha		
Ambiente das instalações dos animais (cama e estrume)	Patógenos humanos (<i>E. coli</i> , <i>Campylobacter</i>), <i>Salmonella</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp.	
Fezes animais	<i>Enterobacteriaceae</i> , bactérias de deterioração, leveduras, <i>Bifidobacterium</i> e várias BAL (<i>Aerococcus viridans</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus mucosae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i>)	

A execução de práticas como o armazenamento do leite em refrigeração, a limpeza e a desinfecção das tetas, bem como a desinfecção do equipamento de ordenha, contribuem para a melhoria da qualidade do leite cru, e simultaneamente, para a diminuição da carga microbiana (Montel *et al.*, 2014).

O armazenamento do leite em temperaturas de refrigeração, reduzem o crescimento da maioria das bactérias, com a exceção dos microrganismos psicrotolerantes, capazes de proliferar nessas condições, podendo-se tornar uma das principais causas de deterioração do leite, pela produção de enzimas extracelulares (lípsases e proteases), originando sabores rançosos e amargos (Quigley *et al.*, 2013).

Através dos equipamentos e práticas utilizadas na produção de queijos tradicionais, como por exemplo as cubas de madeira e prateleiras para a maturação do queijo, o leite cru e o queijo são enriquecidos durante o seu fabrico através de populações microbianas ativas nesses processos. Um exemplo, são as prateleiras de madeira, que têm uma microbiota característica podendo ser diretamente transferida para a superfície do queijo (Montel *et al.*, 2014). Os microrganismos dessa microbiota geralmente produzem biofilmes, formados por leveduras, bolores e Actinobacteria, estáveis durante várias estações (Irlinger *et al.*, 2015). Outro exemplo, é o processo de salmoura, que contém uma microflora que inocula a superfície de muitos queijos de leite cru, otimizando assim o processo de maturação. Esses(as) equipamentos/práticas utilizadas na produção de queijo, possuem uma microbiota complexa que varia entre os laticínios (Montel *et al.*, 2014).

1.3.2 Composição da microbiota do leite cru e subsequentemente dos queijos de fabrico com leite cru

A composição microbiana do leite cru e consequentemente dos queijos de fabrico com leite cru é variável de acordo com a estação do ano e origem geográfica (Ercolini *et al.*, 2009). A alimentação animal é um determinante importante na qualidade do queijo, devido à composição bacteriana do leite, assim como, dos constituintes do leite, como gordura, proteínas, compostos de sabor, entre outros (Bozoudi *et al.*, 2018).

Os laticínios tradicionais são compostos por uma diversidade microbiana, que pode ter aplicações biotecnológicas, como as BAL, ou pode ser composta por bactérias deteriorantes, incluindo as bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, com um efeito notável geralmente, na qualidade do leite e dos produtos lácteos (Alegría *et al.*, 2009; Ercolini *et al.*, 2009). Por conseguinte, a comunidade microbiana do leite cru e dos queijos de fabrico com leite cru, torna-se muito complexa, podendo organismos

patogénicos estar presentes em alimentos tradicionais produzidos com leite cru (Andretta *et al.*, 2019; Ercolini *et al.*, 2009).

Deste modo, as principais questões na indústria de laticínios estão relacionadas com a higiene em todo o manuseio do leite, com a redução dos tempos de armazenamento, com o uso de temperaturas de refrigeração eficazes, com a disponibilidade de métodos para reduzir a flora microbiana patogénica e deteriorante, bem como, o uso dos sistemas de segurança alimentar (Ercolini *et al.*, 2009).

1.3.2.1 Microbiota tecnologicamente relevante

As espécies das BAL são o grupo de microrganismos mais importante presentes no leite e na maioria dos produtos lácteos (Kongo and Malcata, 2016a). Estas são conhecidas como microrganismos com potencial biotecnológico, aplicados em alimentos fermentados em todo o mundo, sendo reconhecidos como microrganismos seguros (Widyastuti *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013). As BAL são reconhecidas pela sua capacidade fermentativa, uma vez que a fermentação é considerada uma tecnologia segura e aceitável na preservação dos alimentos, aumentando assim a segurança do produto, melhorando os atributos organoléticos, enriquecendo os produtos lácteos com nutrientes e aumentando os benefícios para a saúde (Widyastuti *et al.*, 2014).

As BAL estão naturalmente na microbiota nativa do leite cru, mas também podem derivar do ambiente envolvente dos animais (superfície da teta, equipamentos de ordenha) e do ambiente envolvente da fábrica de laticínios (Widyastuti *et al.*, 2014; Alegría *et al.*, 2009; Delavenne *et al.*, 2012; Settanni and Moschetti, 2010). As populações de BAL podem ser divididas em dois grupos, bactérias iniciadoras e não iniciadoras, desempenhando diferentes papéis no fabrico de queijos (Widyastuti *et al.*, 2014; Settanni and Moschetti, 2010). O papel das BAL iniciadoras foca-se principalmente na produção de ácido durante o fabrico do queijo, pelo que também contribuem no processo de maturação. Relativamente às BAL não iniciadoras, estas não são responsáveis pela produção de ácido, mas contribuem mais intensamente durante o processo de maturação do queijo, sendo capazes de transformar os constituintes do leite em compostos voláteis que influenciam o sabor dos queijos (Tabela 5) (Widyastuti *et al.*, 2014; Togay *et al.*, 2017; Settanni and Moschetti, 2010).

As espécies identificadas no queijo podem ser homofermentativas, como os lactococos ou heterofermentativas, como os lactobacilos (Kongo and Malcata, 2016a). As espécies homofermentativas convertem os açúcares do leite em um único produto, ácido láctico, enquanto as heterofermentativas convertem a lactose em ácido láctico, ácido acético e CO₂ (Widyastuti *et al.*, 2014; Adams and Moss, 2008; Pereira *et al.*, 2010).

As BAL iniciadoras utilizam a lactose, como fonte nutricional, produzindo elevadas quantidades de ácido láctico. Por conseguinte as BAL não iniciadoras, além da lactose residual, utilizam outras fontes nutricionais, como citrato, peptídeos, aminoácidos e gorduras. As BAL não iniciadoras heterofermentativas podem fermentar pentoses libertadas pela autólise das BAL iniciadoras (Settanni and Moschetti, 2010).

Tabela 5: Bactérias ácido-lácticas iniciadoras e não iniciadoras, isoladas durante o fabrico de queijo (Settanni and Moschetti, 2010).

Bactérias ácido-lácticas	Espécies
Iniciadoras	Mesofílicas (<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.)
	Termófilicas (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i>)
Não iniciadoras	Homofermentativas obrigatórias (<i>Lactobacillus farciminis</i>)
	Lactobacilos Heterofermentativas facultativas (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)
	Heterofermentativas obrigatórias (<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> e <i>Lactobacillus brevis</i>)
	Outras espécies <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc</i> sp.

O desenvolvimento do sabor, como o sabor característico de cada variedade de queijo é formado durante a maturação pelas BAL iniciadoras e não iniciadoras, uma vez que, existe uma cooperação entre as populações de bactérias ácido-lácticas (Widyastuti *et al.*, 2014), seguindo uma dinâmica geral durante a maturação do queijo fabricado com leite cru, como mostra a figura 3 (Settanni and Moschetti, 2010).

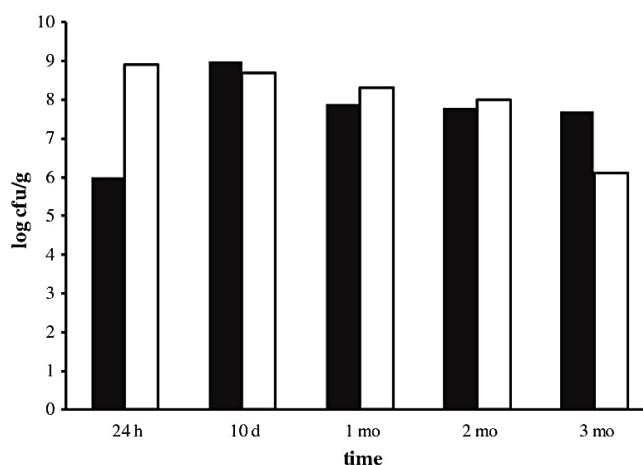


Figura 3: Dinâmica geral da evolução do BAL iniciadoras (colunas brancas) e BAL não iniciadoras (colunas pretas) durante a maturação do queijo (exemplo queijo Puzzone di Moena) (Settanni and Moschetti, 2010).

Estas bactérias têm um interesse particular na indústria de laticínios, onde se inclui resistência a bacteriófagos, produção de substâncias antimicrobianas, o potencial contributo para a formação de sabor, da textura, pelas suas atividades proteolíticas, e contribuem nas propriedades organolépticas e nutricionais dos produtos lácteos (Widyastuti *et al.*, 2014; Alegría *et al.*, 2009; Picon *et al.*, 2016; Settanni and Moschetti, 2010). Além disso, a sua presença em alimentos fermentados melhora a segurança alimentar e prolonga o prazo de validade dos alimentos, pelas suas propriedades antimicrobianas (Abriouel *et al.*, 2008; Widyastuti *et al.*, 2014; Picon *et al.*, 2016; Settanni and Moschetti, 2010). O seu efeito conservador é devido à produção de metabolitos, como ácidos orgânicos, e outras substâncias, como ácidos gordos, peróxido de hidrogénio, acetoína, diacetil, peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) (Abriouel *et al.*, 2008; Widyastuti *et al.*, 2014; Picon *et al.*, 2016; Quigley *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2016). Estes compostos podem inibir muitos patogénicos e microrganismos deteriorantes dos alimentos (Widyastuti *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013). Para além disso, os fabricantes de queijo tradicional contam com estas bactérias na fermentação da lactose em ácido láctico, pelo que a produção do ácido ajuda a expulsar o soro da coalhada, e contam ainda com a diminuição do pH contribuindo assim para o prazo de validade e para a segurança microbiológica do queijo (Adams and Moss, 2008; Marino *et al.*, 2003).

Os géneros das BAL frequentemente encontrados no leite são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. (Quigley *et al.*, 2013; Settanni and Moschetti, 2010). No leite de cabra, as BAL mais frequentemente encontradas são *Lactococcus lactis*, *Lactococcus graviae*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus casei* (Delavenne *et al.*, 2012). A maioria das BAL são geralmente reconhecidas como seguras ou qualificadas presumidamente como seguras garantindo o seu uso em alimentos (Widyastuti *et al.*, 2014; Delavenne *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013). No entanto, um pequeno número de BAL, como os enterococos, são excluídos desta qualificação devido ao seu papel na origem de infeções, assim como na disseminação de genes de resistência a antibióticos (Delavenne *et al.*, 2012).

1.3.2.1.1 Lactobacilos

O género *Lactobacillus* é bastante diversificado, sendo que algumas espécies são importantes na indústria de laticínios, particularmente, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *L. delbrueckii* ssp. *Lactis* (Quigley *et al.*, 2013).

Os lactobacilos podem ser encontrados em diversos ecossistemas ricos em carboidratos, como plantas, animais, silagem e em leite cru. Através das suas atividades proteolíticas, capacidade de produzir compostos aromáticos e exopolissacarídeos, estas bactérias podem contribuir na qualidade e no valor nutricional dos produtos lácteos (Quigley *et al.*, 2013). Por outro lado, existem outros lactobacilos do leite cru que durante o fabrico de produtos lácteos aumentam as suas populações e podem-se tornar como microflora dominante, sobretudo durante a maturação do queijo. Estes incluem: *L. casei*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *L. brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, e *Lactobacillus gasseri*. Esses lactobacilos são habitualmente designados de bactérias ácido-lácticas não iniciadoras, tendo uma capacidade de adaptação às condições de maturação do queijo, como baixos níveis de nutrientes, pH reduzido, teor de humidade baixo. Eles contribuem com vários produtos, resultantes da proteólise e lipólise, para o desenvolvimento do sabor e da textura do queijo (Quigley *et al.*, 2013).

1.3.2.1.2 Lactococos

Lactococcus é um género das BAL, pertencente à família *Streptococcaceae*, que está amplamente distribuído em plantas, peixes e outros animais (Tidona *et al.*, 2018), podendo estar naturalmente presentes no leite cru e nos queijos produzidos tradicionalmente (Quigley *et al.*, 2013). Várias espécies de entre este género fazem parte das principais BAL, utilizadas nos sistemas de cultura de lacticínios para a produção de queijo, como as subespécies de *Lactococcus lactis*: *Lc. lactis subsp. lactis* e *Lc. lactis subsp. cremoris*, as quais, no seu conjunto, são designadas como lactococos “lácteos” (Quigley *et al.*, 2013; Tidona *et al.*, 2018). Durante a produção de queijo, o principal papel dos lactococos lácteos é a acidificação através da produção de ácido láctico (Quigley *et al.*, 2013). Para além disso, também contribuem na proteólise, na conversão de aminoácidos em compostos aromatizantes (álcoois, cetonas, aldeídos), na utilização do citrato e/ou no metabolismo da gordura (Quigley *et al.*, 2013; Tidona *et al.*, 2018). A formação de sabor em produtos lácteos é desenvolvida pelas BAL iniciadoras, pelas culturas adjuntas ou pela microflora nativa nos queijos de leite cru. Além disso, os lactococos nativos definidos como estirpes do leite cru ou de ambientes não lácteos, originam sabores específicos, como foi mostrado em alguns estudos, os quais são distintos dos produzidos pelas estirpes industriais (Tidona *et al.*, 2018).

1.3.2.2 Microbiota deteriorante

A deterioração microbiológica dos alimentos ocorre de várias formas diferentes. O crescimento microbiano pode degradar os componentes estruturais dos alimentos, provocando uma perda da textura. Contudo o seu crescimento manifesta-se maioritariamente através dos produtos do metabolismo microbiano, como a formação de gás, pigmentos, polissacarídeos, odores e sabores desagradáveis (Adams and Moss, 2008). Dessa forma, a deterioração dos alimentos pela ação das bactérias, causam grandes perdas económicas para as indústrias (Dogan and Boor, 2003).

1.3.2.2.1 Enterococos

Dentro das bactérias BAL, os enterococos são o género mais controverso associado aos alimentos (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018; Quigley *et al.*, 2013). O seu habitat natural são os tratos gastrointestinais dos seres humanos e animais, e de acordo com a espécie, estes podem ser considerados organismos de culturas iniciais, probióticos, deteriorantes ou patogénicos (Abriouel *et al.*, 2008; Quigley *et al.*, 2013).

A sua existência em alimentos está relacionada com a higiene inadequada durante o fabrico de produtos lácteos (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018). Estas bactérias são consideradas organismos comuns da microbiota dos queijos tradicionais, os quais podem desempenhar um papel importante no processo de maturação dos queijos. Por exemplo, através das suas atividades proteolítica e lipolítica, pelas suas capacidades de estimular a produção de ácidos por certos lactococos, a produção de gás pelos *leuconostocs*, assim como, pela degradação do citrato e contribuindo no desenvolvimento do sabor dos queijos, através de compostos aromatizantes, incluindo, acetaldeído, acetoína e diacetil (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2018; Quigley *et al.*, 2013; Zárate *et al.*, 1997). Além disso, os enterococos, associados a sistemas alimentares são capazes de produzir uma variedade de bacteriocinas, designadas de enterocinas, que atuam contra possíveis patogénicos como a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium* spp. (Gonçalves *et al.*, 2018; Picon *et al.*, 2016). Entre as várias espécies de enterococos, associados a sistemas alimentares, as mais comuns no leite e nos produtos lácteos são *E. faecalis* e *E. faecium* (Quigley *et al.*, 2013). No entanto, *E. faecalis* tem sido associado a vários fatores de virulência, resistência a agentes antimicrobianos, e tem sido associado a mecanismos de transferência de genes relacionados à patogenicidade humana (Gonçalves *et al.*, 2018; Marino *et al.*, 2003).

1.3.2.2.6 Bactérias mesofílicas

A contagem de bactérias mesofílicas cultiváveis em amostras de leite cru, permite avaliar a qualidade e o nível de higiene do leite cru e pasteurizado (Duarte *et al.*, 2020; Ercolini *et al.*, 2009; Faccia *et al.*, 2015; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Marino *et al.*, 2003). Os quais podem ser avaliados como leite de boa qualidade, com contagens iguais ou inferiores a $1,5 \times 10^6$ ufc/ mL ou de má qualidade, com contagens superiores a $1,5 \times 10^6$ ufc/ mL, em leites cru de cabra e de outros animais. A exceção é o leite de vaca, que é classificado com boa qualidade para contagens iguais ou inferiores a $1,0 \times 10^5$ ufc/ mL (Regulamento CE N° 853/2004).

A má qualidade do leite indica condições de higiene insatisfatórias na produção, armazenamento e processamento do leite e também podem apontar para uma possível presença de agentes patogénicos (Duarte *et al.*, 2020).

1.3.2.2.2 Bactérias psicotróficas

O leite cru é armazenado a temperaturas baixas até ser utilizado na produção de queijos (Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016). A utilização de temperaturas de refrigeração inibe o crescimento de bactérias mesofílicas, no entanto, as bactérias psicotróficas encontradas na microflora nativa do leite cru, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e *Enterobacteriaceae* são capazes de sobreviver e proliferar neste ambiente, durante o armazenamento (Dogan and Boor, 2003; Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016). As bactérias psicotróficas são conhecidas por crescerem a 5-7°C, apesar da sua temperatura ótima de crescimento ser mais alta (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; ISO 4833:1991). Estas são ubíquas podendo ser isoladas do solo, da água e da vegetação (Dogan and Boor, 2003), sendo que na recolha do leite a contaminação pode ocorrer devido às superfícies dos equipamentos de ordenha não estarem devidamente higienizadas, à temperatura utilizada, ao tempo de armazenamento e no seu transporte (Decimo *et al.*, 2018; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Estes microrganismos compõem assim a população principal da microflora do leite cru refrigerado, pelo que as suas enzimas extracelulares, principalmente proteases e lípases, contribuem para a deterioração do leite e de produtos lácteos (Ercolini *et al.*, 2009; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Meng *et al.*, 2018; Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016). As enzimas ao hidrolisarem as gorduras e as proteínas do leite, formam compostos indesejáveis, responsáveis pelo desenvolvimento de sabores desagradáveis no leite e nos seus derivados, influenciando os níveis de produção de queijo (Decimo *et al.*, 2018; Ercolini *et al.*, 2009). Contudo, apesar destas bactérias não resistirem ao calor, as suas enzimas termorresistentes podem resistir à pasteurização e a processamentos de temperatura

ultra alta (Ercolini *et al.*, 2009; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Assim, as enzimas libertadas podem permanecer no leite causando a deterioração do queijo fabricado com leite cru durante o fabrico, bem como durante o seu armazenamento. Desta forma, a remoção inicial destas bactérias é um pré-requisito no fabrico de queijos de elevada qualidade microbiológica e organolética (Yoon *et al.*, 2016).

De entre os vários géneros de bactérias psicrotróficas isoladas do leite, encontram-se bactérias de Gram negativo (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* e *Flavobacterium*) e bactérias de Gram positivo (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*) (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007), sendo que *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* têm um papel importante na deterioração do leite e dos produtos lácteos (Decimo *et al.*, 2018). De entre as bactérias psicrotróficas, o género *Pseudomonas* spp. é o mais comum na microbiota do leite cru armazenado, dando origem a leite cru de má qualidade (Ercolini *et al.*, 2009; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Meng *et al.*, 2018; Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016).

1.3.2.2.3 *Pseudomonas* spp.

As *Pseudomonas* spp. têm uma enorme capacidade de crescer durante o armazenamento do leite em refrigeração, e algumas estirpes produzem enzimas extracelulares, como lípases, proteases e lecitinases estáveis ao calor, que podem contribuir para a deterioração do leite cru e do leite pasteurizado (Dogan and Boor, 2003). Assim, através das suas atividades enzimáticas, que degradam os componentes do leite originando uma redução da vida útil deste, assim como diminuição da qualidade organolética dos produtos lácteos (Dogan and Boor, 2003; Meng *et al.*, 2018). Estas bactérias estão frequentemente presentes no leite e nos ambientes dos lacticínios, pelo que das espécies não patogénicas, destacam-se as *P. fluorescens* e *P. putida*, bactérias deteriorantes habitualmente responsáveis pela deterioração do queijo (Duarte *et al.*, 2020).

1.3.2.2.4 *Enterobacteriaceae*

O estudo das populações de *Enterobacteriaceae* em alimentos tem interesse devido à sua relevância tecnológica, mas também à sua importância para avaliação da higiene sanitária/saúde (Tornadijo *et al.*, 2001).

O interesse tecnológico da população de *Enterobacteriaceae* deve-se ao facto de estas produzirem alterações nos queijos, as quais podem estar envolvidas no desenvolvimento de propriedades sensoriais (Gonçalves *et al.*, 2018; Tornadijo *et al.*,

2001). A presença de enterobactérias não patogênicas é essencial para certas atividades metabólicas e de crescimento, associadas à formação de gases e ao desenvolvimento de propriedades sensoriais em alguns tipos de queijo, devido aos sistemas proteolíticos de algumas estirpes, que atuam em todas as frações de caseína, no entanto também podem ser vistos como agentes responsáveis pela deterioração (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018).

Relativamente ao interesse sanitário, as populações de *Enterobacteriaceae* indicam a qualidade higiênica do produto, pelo que a sua presença pode estar relacionada à contaminação de origem fecal (Tornadijo *et al.*, 2001). No entanto, contagens elevadas em amostras de leite e queijo apontam para práticas higiênicas inadequadas na ordenha, no armazenamento, no transporte, durante o fabrico do queijo, entre outros (Gonçalves *et al.*, 2018; Tornadijo *et al.*, 2001). Por conseguinte, o armazenamento do leite em refrigeração por longos períodos deve ser evitado, uma vez que, as temperaturas baixas contribuem para a aumento da população de *Enterobacteriaceae* psicrotólicas (Tornadijo *et al.*, 2001).

O interesse desta população na saúde, deriva da possibilidade de alguns géneros da família de *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*) poderem ser enteropatogênicos devido às suas capacidades de produzir enterotoxinas, causando alterações gastrointestinais, mas também infeções extraintestinais, representando assim riscos para a saúde pública (Abriouel *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 1995; Tornadijo *et al.*, 2001). No entanto, nos produtos lácticos fermentados a produção dessas toxinas não é muito comum, devido ao efeito inibidor da rápida diminuição do pH. Por conseguinte, se existirem enterotoxinas nos produtos lácteos, as toxinas não serão inativadas pelos baixos valores de pH do produto (Tornadijo *et al.*, 2001).

1.3.2.2.7 Estafilococos

Espécies do género *Staphylococcus* são encontradas na pele e nas mucosas dos animais e de seres humanos, assim como podem estar presentes em ambientes de ordenha e nas superfícies de equipamentos lácteos. Como o processo de produção de queijo é caracterizado pela sua direta manipulação, o potencial de transferência de *Staphylococcus* spp. no queijo aumenta, através dos utensílios, dos equipamentos e dos funcionários. Devido aos possíveis meios de contaminação, *Staphylococcus* spp. são considerados bons indicadores de um manuseio adequado e de boas práticas de fabrico durante o processamento de alimentos. No entanto, as condições intrínsecas do queijo, como pH, atividade da água e concentrações de sal, podem também favorecer o seu crescimento (Andretta *et al.*, 2019).

Existem espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa que podem contribuir para o desenvolvimento do sabor, devido à atividade das suas enzimas líticas que quebram proteínas e lípidos, no entanto, existem outras estirpes que apresentam patogenicidade, pela produção de enterotoxinas (Yoon *et al.*, 2016). Como o potencial enterotoxigénico de alguns *Staphylococcus* esteve sempre associado ao seu potencial patogénico, a Direção Oficial da Europa considerou as contagens de estafilococos coagulase positiva como uma referência de segurança. Portanto, as contagens e a caracterização de *Staphylococcus* spp. são uma etapa importante para a avaliação de potenciais fatores que possam representar um risco para os consumidores, uma vez que também se torna uma ferramenta confiável nos programas de controle e qualidade (APPCC e boas práticas de fabrico) (Andretta *et al.*, 2019).

A bactéria *Staphylococcus aureus* pode ser o patogénico com maior incidência em queijos fabricados a partir de leite cru, em relação a outros patogénicos de origem alimentar. A contaminação dos queijos pode ser devida a leite cru produzido por animais que sofrem de mastite, por reservatórios de leite contaminados, por más práticas de higiene ou através dos queijeiros portadores de *S. aureus*. Apesar deste organismo poder crescer durante o processamento do queijo, com a diminuição da atividade da água e do pH, o seu crescimento é geralmente inibido (Gonçalves *et al.*, 2018).

1.3.2.2.5 Leveduras e bolores

O leite e os produtos lácteos fermentados são ambientes propícios para o crescimento de leveduras e bolores, os quais podem estar envolvidos na fermentação ou deterioração dos alimentos (Delavenne *et al.*, 2012). A composição fúngica do leite cru é influenciada por diversos fatores como estado fisiológico dos animais, clima, estação do ano e pela alimentação dos animais (Quigley *et al.*, 2013). No entanto, a contaminação de produtos lácteos, nomeadamente os queijos, é causada pela presença destes organismos nos ambientes das fábricas de queijos, como paredes e prateleiras das salas de maturação, ar, equipamentos, água, salmoura, entre outros (Kongo and Malcata, 2016a; Torkar and Vengušt, 2008).

Quando se considera a deterioração dos alimentos, as leveduras têm a capacidade de metabolizar o ácido láctico, podendo causar um aumento do pH, a produção de gás, álcool e compostos aromáticos indesejáveis, resultando em defeitos no sabor (produzindo um sabor levedado ou frutado), e na textura, sucedendo-se perdas económicas dos queijos (Delavenne *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 1995; Kongo and

Malcata, 2016a; Torkar and Vengušt, 2008). Por conseguinte, o aumento do pH incentiva o crescimento de bactérias sensíveis ao ácido (Marino *et al.*, 2003).

Embora algumas leveduras possam causar deterioração e originar sabores desagradáveis aos produtos lácteos, a sua presença é relevante porque a maioria é crucial para o desenvolvimento de um sabor completo em alguns tipos de queijo (Freitas *et al.*, 1995).

A presença de algumas leveduras origina a síntese de enzimas lipolíticas e proteolíticas, que podem eventualmente ter um papel importante na textura, na formação sensorial e na formação de compostos orgânicos voláteis (Freitas *et al.*, 1995; Marino *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2018; Quigley *et al.*, 2013; Zárata *et al.*, 1997). Mas também, a ocorrência de lise das suas células liberta vitaminas e aminoácidos, que permitem estimular as bactérias, fornecer precursores de sabor, produzem metabolitos, como ácidos gordos de cadeia curta e outros compostos com efeitos tóxicos conhecidos contra microrganismos indesejados no trato intestinal (Kongo and Malcata, 2016a; Torkar and Vengušt, 2008). No entanto, a principal contribuição no processo de maturação do queijo é evidenciada pela utilização de ácido láctico produzido pelas BAL (Marino *et al.*, 2003; Zárata *et al.*, 1997).

A existência de bolores nos produtos lácteos apresenta-se em níveis mais baixos relativamente às leveduras (Quigley *et al.*, 2013). Os bolores podem proliferar nas paredes e prateleiras das salas de maturação, assim a limpeza rigorosa destas áreas é a maneira principal de controlar o seu crescimento (Marino *et al.*, 2003). A inibição de bolores no queijo, pode ser causada pelos ácidos gordos livres, sendo a lavagem periódica das suas superfícies recomendada para evitar a sua propagação nas superfícies dos queijos (Freitas *et al.*, 1995). Eles têm a capacidade de melhorar o sabor e o aroma, no entanto através da sua extensa proteólise e lipólise, eles modificam a textura e a estrutura dos produtos lácteos (Quigley *et al.*, 2013). Assim, a presença de certos bolores no queijo é indesejável, uma vez que podem influenciar as características organolépticas e produzir micotoxinas que são prejudiciais à saúde do consumidor (Delavenne *et al.*, 2012; Torkar and Vengušt, 2008). Os bolores geralmente encontrados nos queijos de leite cru pertencem aos géneros *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* e *Penicillium* (Kongo and Malcata, 2016a).

1.3.2.3 Microrganismos patogénicos

O tema da segurança microbiológica do queijo fabricado com leite cru ainda é bastante questionável, sendo por vezes considerados microbiologicamente inseguros devido à

possibilidade de contaminações por bactérias patogénicas, apresentando riscos acrescidos à saúde pública (Andretta *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2016).

De acordo com estudos realizados, diversos organismos patogénicos de origem alimentar estão associados a queijos fabricados com leite cru, como *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* (Andretta *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2016). Estas bactérias podem ter proveniência das fezes dos animais, de ambientes com má higienização ou diretamente pela contaminação de animais doentes ou mesmo saudáveis. Assim, o queijo produzido a partir de leite cru pode ser um veículo de transmissão de microrganismos patogénicos (Yoon *et al.*, 2016). *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. são os patogénicos de origem alimentar que geralmente estão associados ao leite cru e aos produtos lácteos, e são geralmente analisados nos produtos lácteos como indicadores de segurança. Por conseguinte, a sua presença apresenta perigos e riscos para a saúde humana, assim como, uma preocupação para os produtores, consumidores e para os serviços oficiais de inspeção (Andretta *et al.*, 2019).

No entanto, as populações bacterianas no final do tempo de maturação dependem da adaptação dos microrganismos às condições adversas encontradas durante o processo de maturação, como concentração de sal, diminuição do pH e interação competitiva com a microbiota presente (Gonçalves *et al.*, 2018).

1.3.2.4 Inibição de microrganismos patogénicos e deteriorantes

As bactérias patogénicas do leite cru e do queijo fabricado com leite cru podem ser inibidas por agentes antimicrobianos como lactoferrina, sistema lactoperoxidase, lisozima, imunoglobulinas e através de ácidos gordos livres presentes no leite. Contudo, quando é aplicado tratamento térmico estes agentes antimicrobianos podem ser inativados. Assim, outra forma de inibir as bactérias patogénicas é através de estirpes antipatogénicas nativas do leite cru ou através de consórcios microbianos (Montel *et al.*, 2014). Como referido anteriormente, as BAL são um grupo representativo do leite cru que produzem substâncias antimicrobianas, esgotam os açúcares fermentáveis e diminuem o pH para permitirem a inibição do crescimento de bactérias patogénicas no queijo fabricado com leite cru (Montel *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016).

O principal mecanismo aplicado por estes microrganismos é a produção de bacteriocinas, que são pequenos péptidos ou proteínas sintetizadas pelas bactérias que desempenham uma atividade antimicrobiana contra outros microrganismos. Além disso, estas bactérias produzem outras substâncias antimicrobianas, como ácidos

orgânicos, ácidos gordos, peróxido de hidrogénio, acetoína, diacetil, que também são eficientes na inibição do crescimento de outros microrganismos patogénicos (Abriouel *et al.*, 2008; Picon *et al.*, 2016; Quigley *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2016). Estes compostos podem inibir muitos patógenos assim como microrganismos deteriorantes dos alimentos (Widyastuti *et al.*, 2014; Quigley *et al.*, 2013). O crescimento de bactérias patogénicas pode ainda ser afetado pela diminuição do pH, pela baixa atividade da água e pelo elevado teor de sal (Yoon *et al.*, 2016).

Também os biofilmes microbianos das superfícies de madeira podem proteger contra as bactérias patogénicas. A elevada colonização de leveduras e bactérias nos equipamentos de madeira podem inibir os patógenos, restringindo o suprimento de nutrientes e/ou dificultando a sua adesão (Montel *et al.*, 2014). Para além de que a inibição de bactérias patogénicas parece estar associada à composição qualitativa e quantitativa da microflora do leite cru, e não ao seu grau de diversidade (Montel *et al.*, 2014).

1.3.2.5 Dinâmica microbiana do núcleo e da superfície dos queijos

As condições iniciais encontradas pela microflora do leite cru, como as condições de todo o processo de fabrico e maturação do queijo, resultam em mudanças significativas no equilíbrio e na dinâmica microbiana (Montel *et al.*, 2014). Desta forma, a riqueza organolética e as variedades de queijos podem ser explicadas pela ação de microrganismos, com diferentes dinâmicas microbianas entre a superfície e o núcleo dos queijos (Irlinger *et al.*, 2015; Montel *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstraram que a diversidade de populações de BAL aumentam apenas no núcleo dos queijos, uma vez que estas bactérias se adaptam às condições existentes, como pH baixo, elevado teor de sal, condições anaeróbicas, ausência de carboidrato fermentável, entre outras. As BAL não iniciadoras são também abundantes em quase todas as variedades de queijos, tradicionais ou não. Destas bactérias, os lactobacilos mesófilos são os mais abundantes, contudo a sua prevalência durante a maturação de queijos de leite cru varia em relação ao tipo de tecnologia (mole, semi-duro ou duro) e ao tempo de maturação (Montel *et al.*, 2014).

Nos núcleos de queijos fabricado com leite cru prensados e maturados, o equilíbrio das espécies dominantes varia com o tempo de maturação e varia entre as diferentes variedades de queijo. As BAL são a população microbiana dominante, conseguindo atingir contagens acima de 9 log ufc/g, no primeiro dia de fabrico e permanecendo dominante até ao final da maturação. Além destes microrganismos, outras populações podem fazer parte da microflora dominante como, organismos pertencentes aos filos

Firmicutes, Proteobacteria (classe *Gammaproteobacteria*), Actinobacteria e Bacteroidetes (Montel *et al.*, 2014).

Na superfície dos queijos a microflora é mais diversificada em relação ao núcleo, uma vez que, a superfície dos queijos entra em contacto com o ambiente externo (Irlinger *et al.*, 2015; Montel *et al.*, 2014). É composta por microrganismos adventícios, e por microrganismos de culturas iniciadoras e secundárias, desempenhando papéis importantes nas características organolépticas no queijo, devido às suas atividades enzimáticas e ao seu papel de barreira protetora contra os microrganismos patogénicos e deteriorantes. No entanto, existem dois fatores fundamentais, propícios para o crescimento microbiano, o pH e o teor de sal, que atuam como uma pressão seletiva sobre a microbiota, favorecendo o crescimento de espécies microbianas resistentes a essas condições. Um exemplo é a desacidificação da superfície dos queijos pelas leveduras e bolores que estimulam o crescimento de bactérias aeróbias sensíveis ao ácido (Irlinger *et al.*, 2015).

A população microbiana da superfície dos queijos é complexa e diversificada, incluindo Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes, bem como leveduras e bolores (Irlinger *et al.*, 2015). As leveduras, bolores e bactérias aeróbicas podem desenvolver-se pela presença de mais oxigénio disponível em relação ao núcleo. As interações entre leveduras, e entre leveduras e bactérias afetam a microflora da superfície do queijo (Montel *et al.*, 2014). As leveduras e bolores, metabolizam o ácido láctico e produzem NH_3 , ocorrendo assim um aumento do pH da superfície (de 4,8 e 6,0; respetivamente para 5,2 e 8,2), permitindo o crescimento de bactérias tolerantes ao sal e sensíveis ao ácido. Bactérias, leveduras e fungos estão presentes em salmouras ou em soluções de esfregaço. Assim os processos de fabrico e de maturação dos queijos contribuem para a dinâmica e a diversidade do ecossistema do queijo (Irlinger *et al.*, 2015; Montel *et al.*, 2014).

Em estudos realizados nas indústrias lácteas, foi verificado que cada unidade fabril apresenta uma microbiota específica na superfície dos queijos, que é dependente das condições ambientais predominantes durante o fabrico dos queijos (Irlinger *et al.*, 2015).

1.4 Bioquímica do queijo

Os queijos maturados, passam por um processo designado de maturação. Durante a maturação do queijo, ocorrem uma série de reações bioquímicas, microbiológicas e químicas, as quais permitem a ocorrência de alterações físicas e químicas que originam

uma grande variedade de compostos aromáticos, conferindo os sabores e aromas desejáveis para cada queijo (Galiou *et al.*, 2013; Khattab *et al.*, 2019; Kongo and Malcata, 2016b; Kongo *et al.*, 2009).

Relativamente às alterações bioquímicas, estas podem ser agrupadas em eventos primários e secundários (McSweeney, 2004). Os eventos primários incluem o metabolismo da lactose, do ácido láctico e do citrato, a proteólise e a lipólise (Farkye, 2003; McSweeney, 2004). Os eventos secundários incluem o metabolismo dos ácidos gordos e dos aminoácidos que são importantes para o desenvolvimento de muitos compostos voláteis. As alterações microbiológicas incluem a morte e lise das culturas primárias/iniciadoras, o crescimento de culturas secundárias e possíveis culturas adventícias (McSweeney, 2004). As culturas primárias e secundárias são compostas principalmente pelas BAL (Alegría *et al.*, 2009).

As alterações físico-químicas que ocorrem ao longo do processo de maturação têm influência nas propriedades reológicas e sensoriais finais do queijo, que são apercebidas pelos consumidores, determinando a sua preferência e aceitabilidade pelo produto. A textura e a aparência são as principais características que influenciam a compra de queijo (Pereira *et al.*, 2011).

Assim, as modificações físico-químicas que ocorrem durante o processo de maturação do queijo, permitem atribuir ao queijo características finais únicas, em diferentes variedades de queijo (por exemplo, cor, aroma, aspeto, consistência) (Real, *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2018).

1.4.1 Alterações microbiológicas

Como referido anteriormente, os microrganismos iniciadores que estão envolvidos nas alterações bioquímicas são referidos como uma cultura de bactérias lácticas usadas para a produção de ácido, principalmente de ácido láctico, a partir da fermentação da lactose. Contudo existem outras bactérias ácido-lácticas (por exemplo, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*) designadas como não iniciadoras, que também estão envolvidos em alguns dos processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação dos queijos (Farkye, 2003; Settanni and Moschetti, 2010).

As populações de bactérias iniciadoras aumentam de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colónias (ufc) por mL de leite para 10^9 ufc por grama de queijo fresco. Durante a progressão da maturação a população bacteriana inicial diminui. A diminuição varia entre as variedades de queijo e depende da concentração de lactose (fonte primária de

energia), da inibição de crescimento pelo teor de sal existente no queijo e da autólise dos microrganismos. O crescimento das BAL não iniciadoras ocorre durante a maturação, em várias variedades de queijo, atingindo densidades celulares 10^7 ufc/g de lactobacilos não iniciadores, em 10 semanas (Farkye, 2003).

A população microbiana envolvida no processo de produção de queijo, deve ser controlada de modo a prevenir o aparecimento de problemas no produto final. Os principais problemas associados ao não controlo da população microbiana no fabrico de queijo são: (1) a não obtenção do produto com as características pretendidas, (2) o aparecimento de defeitos derivados da deterioração ou perda da qualidade do produto acabado e (3) apresentar possíveis contaminações, que podem originar um produto inseguro. No entanto estes problemas podem depender do tipo de queijo, da origem do leite, do processamento, da estação do ano, da localização geográfica, do armazenamento e da sua distribuição (Kongo and Malcata, 2016b).

1.4.2 Alterações bioquímicas

1.4.2.1 Metabolismo da lactose e do ácido láctico

O metabolismo da lactose em ácido láctico ocorre pela ação das BAL iniciadoras. O processo de fermentação, é fundamental no fabrico de queijo, devido à produção de ácido láctico, que ajuda no processo de sinérese, contribui para a diminuição do pH e dessa forma aumenta a segurança do produto e o tempo de prateleira, devido ao facto de a acidificação proteger o queijo contra microrganismos deteriorantes e da proliferação de possíveis patogénicos (Adams and Moss, 2008; Marino *et al.*, 2003; McSweeney, 2004; Widyastuti *et al.*, 2014). É importante que a fermentação da lactose seja completa para evitar a formação de uma microflora indesejável (McSweeney, 2004).

No metabolismo da lactose, o piruvato é o precursor de vários compostos aromáticos de cadeia curta, tem-se o exemplo de acetato, acetoína, diacetil, etanol e acetaldeído (Khattab *et al.*, 2019). A lactose é assim metabolizada rapidamente em L-ácido láctico pelas bactérias iniciadoras, nos primeiros estágios de maturação. A lactose que não é fermentada pode ser metabolizada pelas BAL não iniciadoras produzindo D-ácido láctico. Além disso, estas bactérias podem originar DL-ácido láctico pela racemização de L-ácido láctico (McSweeney, 2004). A formação dos isómeros de ácido láctico é influenciada pela população microbiana presente que metaboliza a lactose (Farkye, 2003).

A forma isomérica D (-) de ácido láctico forma um sal de cálcio insolúvel, que pode cristalizar no queijo, aparecendo como manchas brancas na sua superfície (Farkye, 2003). Os cristais são inofensivos, contudo a ingestão de queijo com elevados níveis de D (-) ácido láctico pode provocar distúrbios metabólicos no consumidor (Farkye, 2003; McSweeney, 2004). Por outro lado, os sais produzidos podem levar à rejeição do queijo pelos consumidores, considerando-o como um queijo que não reúne todas as condições de segurança (McSweeney, 2004).

O L-ácido láctico produzido é um substrato importante para uma série de reações que ocorrem no queijo durante a maturação, incluindo a racemização, a oxidação e o metabolismo microbiano do L-ácido láctico (McSweeney, 2004).

Como já referido anteriormente, as BAL não iniciadoras podem promover a racemização do L-ácido láctico em DL-ácido láctico, como também pode promover a sua oxidação, originando formato, acetato e CO₂ (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Esta reação de oxidação no queijo depende da população das BAL não iniciadoras e da disponibilidade de oxigénio molecular. A disponibilidade de oxigénio é determinada pelo tamanho do queijo e pela permeabilidade ao oxigénio do material de embalagem. Assim a oxidação do ácido láctico é muito limitada em queijos envolvidos em filme, devido à disponibilidade de oxigénio ser reduzida (McSweeney, 2004).

O ácido láctico pode também ser metabolizado anaerobicamente por *Clostridium* sp. produzindo butirato e H₂. Estes produtos provocam um defeito nos queijos conhecido como sopro tardio de gás, levando ao desenvolvimento de sabores desagradáveis e desenvolvimento de rachaduras no queijo durante a maturação (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Este problema ocorre principalmente em queijos salgados em salmoura. O problema advém do tempo necessário para que o NaCl se difunda no queijo e atinja as concentrações inibitórias para que o queijo não seja suscetível ao sopro tardio de gás. Em queijos onde o NaCl se difunde rapidamente como o queijo Cheddar e outras variedades salgadas a seco, este problema não acontece (McSweeney, 2004).

Uma outra via de o ácido láctico ser metabolizado é pela ação de pequenas quantidades de *Propionibacterium* sp. Esta espécie poderá ser adicionada ao leite ou poderá estar presente na cuba por exposição ao meio ambiente, sendo que esta espécie irá crescer durante a fase de maturação (Farkye, 2003; McSweeney, 2004). Um exemplo onde esta via ocorre é nos queijos Emmental e em variedades idênticas que têm como característica a presença de buracos (McSweeney, 2004). Este metabolismo do ácido

lático produz propionato (ou ácido propiónico) e acetato (ou ácido acético), que contribuem para o sabor do queijo, água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂) (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Este último produto acumula-se no queijo e origina buracos, que são frequentemente denominados de "olhos", sendo que a sua formação ocorre quando a pressão de CO₂ é suficiente (Farkye, 2003; McSweeney, 2004).

Por último, o metabolismo do ácido lático nos queijos pode ocorrer pela presença de bolores nas superfícies destes, como é o exemplo dos queijos Camembert e Brie. O ácido lático é então oxidado em CO₂ e H₂O, levando à desacidificação da superfície do queijo (McSweeney, 2004).

1.4.2.2 Metabolismo do ácido cítrico

No leite, a maioria do ácido cítrico existente encontra-se na forma solúvel, e por consequência quando ocorre a drenagem do soro algum citrato é perdido. Embora a maioria do ácido cítrico nativo do leite seja perdido na drenagem do soro, aquele que ficou retido na coalhada pode ser co-metabolizado, com outros açúcares, como a lactose, e metabolizado em vários compostos aromatizantes especialmente em ácido acético, diacetil e acetoína, que irão contribuir para o sabor em algumas variedades de queijo (Jo *et al.*, 2018; McSweeney, 2004).

O citrato é metabolizado pelo *L. lactis ssp. lactis* citrato⁺ e por espécies de *Leuconostoc*, que utilizam o citrato como fonte de energia (Farkye, 2003; Jo *et al.*, 2018). Estes microrganismos contemplam permeases específicas que dependem do pH para transportar o citrato para dentro da célula através da membrana celular (Farkye, 2003).

O metabolismo do citrato ocorre dentro da célula, sendo este convertido em acetato, piruvato e dióxido de carbono (Farkye, 2003). A partir do piruvato são formados vários produtos, entre eles o 2,3-butanodiona (diacetil), acetoína, 2-butanona, que contribuem para o sabor de muitos produtos lácteos (Farkye, 2003; Jo *et al.*, 2018; Tidona *et al.*, 2018). Os compostos diacetil e acetoína, têm um aroma cremoso amanteigado, no entanto o aroma do diacetil é 100 vezes superior ao aroma de acetoína (Tidona *et al.*, 2018).

1.4.2.3 Proteólise

A proteólise ocorre durante a maturação do queijo sendo considerada a reação mais importante e complexa na maioria das variedades de queijo, que determina a formação da textura (hidrólise das caseínas) e do sabor (formação de precursores que serão

convertidos em compostos voláteis) do queijo (Bontinis *et al.*, 2012; Kongo *et al.*, 2009; McSweeney, 2004).

No leite existem diversas proteínas, sendo as principais as α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseínas, que prevalecem no queijo (Farkye, 2003). A proteólise envolve a quebra destas proteínas e de polipéptidos pelos agentes proteolíticos ativos, como enzimas nativas do leite (plasmina) e no coalho (pepsina, quimosina entre outros), enzimas libertadas por BAL iniciadoras e não iniciadoras, por microrganismos adjuntos/secundários e por microrganismos contaminantes ou em certos casos pelas proteinases/peptidases exógenas adicionadas ao leite ou à coalhada para acelerar o processo de maturação do queijo (Farkye, 2003; Kongo *et al.*, 2009; McSweeney, 2004; Park *et al.*, 2017; Settanni and Moschetti, 2010).

Durante a coagulação, a hidrólise inicial das caseínas ocorre pela ação do coagulante residual (quimosina), plasmina ou por outras enzimas proteolíticas nativas do leite, resultando na formação de peptídeos de elevado peso molecular (insolúveis em água) e de tamanho intermédio (solúveis em água) (Bontinis *et al.*, 2012; Galiou *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2011; Farkye, 2003; McSweeney, 2004). Estes peptídeos são posteriormente hidrolisados pelo coagulante, assim como, pelas proteinases e peptidases das BAL iniciadoras e não iniciadoras e pela microflora secundária (Bontinis *et al.*, 2012; Galiou *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2011; Kongo *et al.*, 2009). Porém, as enzimas bacterianas têm um papel fundamental na hidrólise de peptídeos de baixo peso molecular em aminoácidos livres, uma vez que as enzimas coagulantes são incapazes de hidrolisar esses peptídeos em aminoácidos livres (Pereira *et al.*, 2010). As concentrações de diferentes péptidos e aminoácidos, tornam o padrão da proteólise muito variado e único para uma determinada variedade de queijo (McSweeney, 2004).

Os peptídeos produzidos pela ação do coagulante residual e da plasmina são muitas vezes insípidos ou amargos e não contribuem diretamente para o sabor típico do queijo. No entanto, os pequenos péptidos e aminoácidos livres libertados podem sofrer reações secundárias, contribuindo diretamente para o desenvolvimento de sabores nos queijos, através da formação de compostos voláteis como, cetoácidos, aldeídos, ácidos, álcoois, amoníaco, aminas e compostos de enxofre (Delgado *et al.*, 2011; Farkye, 2004; Jo *et al.*, 2018; Settanni and Moschetti, 2010).

1.4.2.3.1 Metabolismo de aminoácidos

Os aminoácidos livres produzidos tornam-se substratos para diversas reações catabólicas, originando compostos aromáticos importantes (Khattab *et al.*, 2019;

McSweeney, 2004; Settanni and Moschetti, 2010). De entre os aminoácidos livres mais comuns nos queijos, destacam-se o ácido glutâmico, a metionina, a asparagina, a histidina, a alanina, a valina, a fenilalanina, a leucina e a lisina (Farkye, 2003). Os aminoácidos formados podem então ser catabolizados pelas duas vias principais, transaminação e eliminação, pela ação das enzimas aminotransferases e liases, respectivamente (McSweeney, 2004).

As enzimas aminotransferases, convertem os aminoácidos no α -cetoácido correspondente, nesta conversão ocorre a transferência do grupo amina do aminoácido para uma molécula aceitadora (α -cetoglutarato) produzindo um novo aminoácido, geralmente ácido glutâmico, responsável pelo sabor umami no queijo (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Por sua vez, os α -cetoácidos produzidos são degradados através de reações químicas, por diferentes vias catalisadas por enzimas ou por microrganismos, para produzir compostos voláteis importantes para o sabor do queijo (Jo *et al.*, 2018; Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Assim os α -cetoácidos correspondentes dos aminoácidos podem sofrer reações de redução, descarboxilação, descarboxilação oxidativa (Figura 4). Desta forma, os α -cetoácidos podem ser reduzidos nos seus hidroxiácidos correspondentes, sendo que, não contribuem diretamente nas características do produto final, contudo estes hidroxiácidos estão envolvidos indiretamente na diminuição dos níveis de α -cetoácidos, precursores de compostos aromáticos importantes para o queijo. Por outro lado, os α -cetoácidos, principalmente de aminoácidos aromáticos, podem ser degradados por várias vias, produzindo compostos aromáticos importantes. Além disso, os α -cetoácidos podem ser descarboxilados nos seus aldeídos correspondentes, assim como, em ácidos carboxílicos através da reação de descarboxilação oxidativa, no entanto, estas vias catalisadoras não são consideradas importantes (McSweeney, 2004).

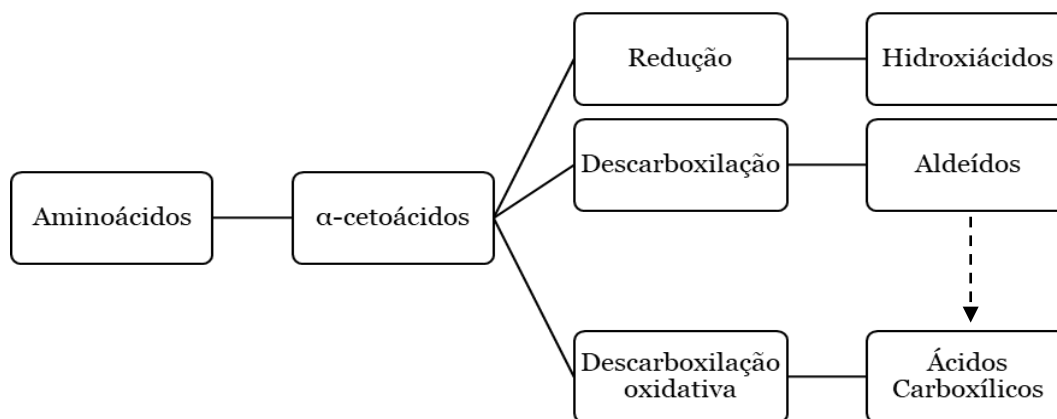


Figura 4: Diferentes vias catalisadoras dos α -cetoácidos produzidos pela ação das aminotransferases, e os respectivos produtos formados (McSweeney, 2004).

Em muitas variedades de queijo, a presença de compostos voláteis com enxofre é importante. Dos 20 aminoácidos principais, apenas dois apresentam na sua estrutura enxofre, são eles, a cisteína e a metionina. Como as caseínas apresentam baixa quantidade de cisteínas, os compostos voláteis com enxofre são formados maioritariamente pelo catabolismo da metionina (via de transaminação ou eliminação) (Jo *et al.*, 2018; McSweeney, 2004). A metionina é assim um precursor de diversos compostos contendo enxofre, sendo os mais importantes, o metanotiol (ranço), o dimetil dissulfeto (alho), dimetil trissulfeto, o metional (β -metil mercaptopropionaldeído) (batata cozida / carne como aroma) e tioésteres (alho/enxofre/ ovo) (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). O metional é produzido a partir do catabolismo da metionina pela reação de transaminação, o metanotiol e os seus produtos oxidativos (dimetil dissulfeto e dimetil trissulfeto) são formados pela reação de eliminação da metionina, enquanto que os tioésteres são formados pela reação de um tiol, geralmente metanotiol, e um ácido carboxílico (Jo *et al.*, 2018; McSweeney, 2004).

No entanto, os aminoácidos apresentam outras vias catabólicas, a desaminação e descarboxilação (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Na reação de desaminação os aminoácidos são degradados pela ação de desidrogenases e de oxidases, obtendo diferentes produtos. Nessas reações, o amoníaco produzido pode contribuir para o sabor de determinadas variedades de queijo, Se o amoníaco for produzido em quantidades suficientes, ele pode contribuir para o aumento do pH durante a maturação (McSweeney, 2004).

Através da via catabólica de descarboxilação, os aminoácidos são degradados produzindo aminas. As aminas produzidas produzem aromas fortes e desagradáveis, além disso as aminas biogénicas, causam efeitos fisiológicos adversos a consumidores vulneráveis (McSweeney, 2004). Exemplos de aminas biogénicas são histamina, tiramina e putrescina. Elas são responsáveis pelo envenenamento por histamina e pela hipertensão provocada pela toxicidade da tiramina após a ingestão de queijo. A monitorização dessas aminas biogénicas é assegurada de forma a garantir a segurança do queijo (Khattab *et al.*, 2019). A produção de aminas depende da concentração dos aminoácidos precursores, da flora microbiana do queijo, e esta pode ser afetada pela temperatura de maturação, concentração de sal e pH (McSweeney, 2004).

Os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina podem ser catabolizados pelas aminotransferases (reação de transaminação), pelas oxidases (reação de desaminação) ou pelas descarboxilases (descarboxilação) (Khattab *et al.*,

2019; McSweeney, 2004). Dos ácidos carboxílicos produzidos pela via de desaminação, estão incluídos os ácidos butírico e pentanóico que possuem um sabor rançoso e adiposo, respetivamente. Na reação de descarboxilação, estes aminoácidos são descarboxilados em aminas que possuem aromas fortes e desagradáveis. Sendo a microflora com atividade de descarboxilação as enterobactérias, *Pseudomonas* spp., enterococos e as BAL (Khattab *et al.*, 2019).

O catabolismo dos aminoácidos aromáticos, triptofano, tirosina e fenilalanina, ocorre pela via de transaminação, os quais são convertidos em acetato, hidroxibenzaldeído e benzaldeído, respetivamente. A degradação da fenilalanina permite exibir um sabor de amêndoa amarga (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004).

1.4.2.4 Lipólise

A gordura do leite é importante para o sabor característico do queijo (Jo *et al.*, 2018). A gordura mais comum são os triglicerídeos que através da sua degradação (lipólise pela ação de lipases), por reações de hidrólise ou de oxidação, ocorre a formação de ácidos gordos livres, lactonas, ésteres e cetonas, relevantes para o sabor geral do queijo (Jo *et al.*, 2018; Kongo and Malcata, 2016a; McSweeney, 2004). No entanto, no queijo, a degradação dos triglicéridos pela via oxidativa, é mais limitada, devido ao baixo potencial de oxidação/redução, assim, os triglicerídeos em todas as variedades de queijo são hidrolisados contribuindo para a formação de sabores dos queijos (Jo *et al.*, 2018; McSweeney, 2004).

A lipólise dos triglicerídeos do queijo ocorre pela ação das lipases nativas do leite, (lipoproteína lipase - LPL), pelas lipases exógenas da pasta de coalho e pelas lipases da microflora do leite e do queijo (Bertuzzi *et al.*, 2018; Farkye, 2003; McSweeney, 2004). Os triglicerídeos do leite são hidrolisados pelas enzimas, que clivam as ligações éster entre os ácidos gordos e o glicerol, formando ácidos gordos de cadeias longas/intermédias (superior a 10 carbonos), ácidos gordos de cadeias curtas (C₄-C₁₀), monoglicerídeos e diglicerídeos (Bertuzzi *et al.*, 2018; Farkye, 2003; Khattab *et al.*, 2019).

A LPL é uma lipase nativa do leite que existe como um homodímero. O papel fisiológico da LPL é o metabolismo dos triglicerídeos plasmáticos e por conseguinte, entra no leite a partir do sangue. Em condições ótimas e níveis elevados, a LPL é capaz de provocar rancidez no leite em apenas 10 segundos, contudo isto não acontece porque a gordura do leite é protegida pela membrana do glóbulo da gordura do leite (MGGL) da ação da LPL. No entanto, se a MGGL sofrer danos mecânicos, aquando da

homogeneização, agitação ou formação de espuma no leite, a lipólise pode ocorrer rapidamente, dando origem a aromas anormais (McSweeney, 2004). A ação da LPL nos triglicerídeos ocorre nas posições *sn-1* e *sn-3*, formando ácidos gordos, monoglicerídeos e diglicerídeos. A sua ação torna-se mais significativa em queijos de leite cru, uma vez que a sua atividade não é perdida, como acontece em queijos de leite pasteurizado (Farkye, 2003; McSweeney, 2004).

As BAL iniciadoras e não iniciadoras, presentes no queijo possuem enzimas lipolíticas intracelulares, libertadas na matriz do queijo após a sua lise, e são responsáveis pela libertação de níveis significativos de ácidos gordos durante a maturação de muitos queijos (McSweeney, 2004). Desta forma, durante a maturação do queijo, as lípases transformam a gordura do leite, triglicerídeos, em ácidos gordos de cadeia curta, precursores de compostos voláteis. No entanto, o tipo da cultura inicial, a duração do tempo de maturação e as condições de produção/fabrico são importantes para a taxa de lipólise (Kongo and Malcata, 2016a).

Os ácidos gordos de cadeia curta (C_4-C_{10}) têm um papel direto no sabor do queijo devido a seus sabores característicos, além disso, contribuem de forma indireta, devido ao facto de serem precursores de compostos aromáticos como lactonas, aldeídos, álcoois, ésteres, S-tioésteres, aldeídos de cadeia linear, álcoois secundários, metil cetonas (Jo *et al.*, 2018; Farkye, 2003; Khattab *et al.*, 2019; Kongo *et al.*, 2009; McSweeney, 2004). Apesar de desempenharem um papel significativo no desenvolvimento do sabor, a extensa lipólise pode ser indesejável em algumas variedades de queijo, devido ao desenvolvimento de sabor rançoso (Khattab *et al.*, 2019). Desse modo, quando a atividade lipolítica origina rancidez, torna-se um fator importante, na deterioração, na qualidade sensorial, na estabilidade de armazenamento do queijo e um fator importante na sua aceitabilidade pelo consumidor (Adams and Moss, 2008; Park *et al.*, 2017).

1.4.2.4.1 Metabolismo dos ácidos gordos

A partir da hidrólise dos triglicerídeos são produzidos ácidos gordos livres, os quais são precursores de diversos compostos aromáticos, através de diversas reações químicas, que podem ser resumidas na figura 5 (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004).

Um das reações, é a reação de ácidos gordos livres com álcoois, produzindo ésteres. Visto que o álcool mais disponível no queijo é o etanol, devido ao catabolismo de aminoácidos ou pela fermentação da lactose, os ésteres etílicos são os mais abundantes, como, butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de etilo, octanoato de etilo,

decanoato de etilo e hexanoato de metilo (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Os ésteres contribuem com sabores frutados, sendo os microrganismos responsáveis pela sua formação, *Geotrichum candidum* e *Pseudomonas fragi* (Jo *et al.*, 2018; Khattab *et al.*, 2019).

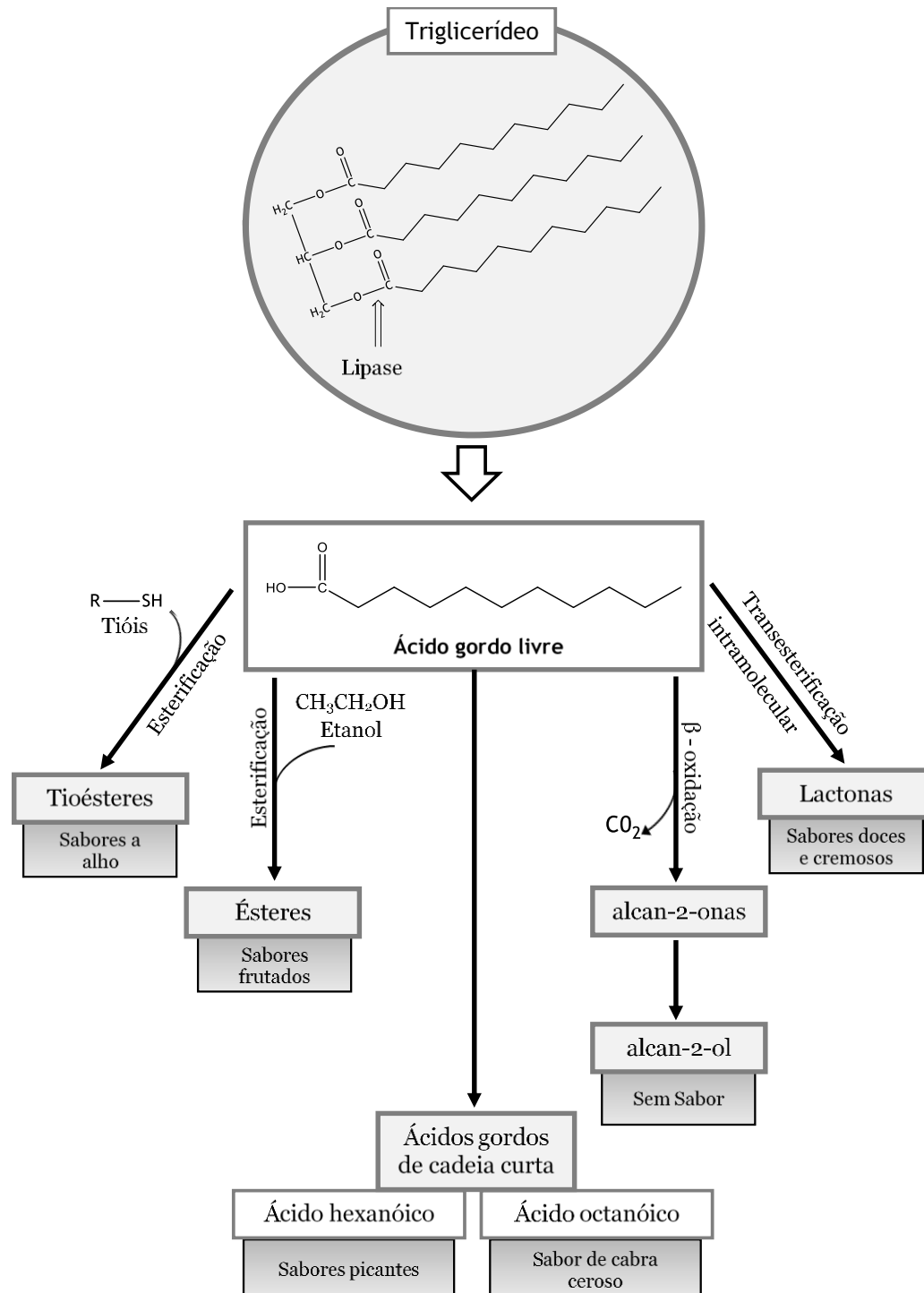


Figura 5: Ácidos gordos livres, precursores de diversos compostos aromáticos do queijo, através de diversas reações. (Adaptado de Khattab *et al.*, (2019) e McSweeney, (2004)).

No queijo também são encontradas as γ e δ -lactonas. As lactonas são compostos cíclicos formados a partir de ácidos gordos hidroxilados, que sofrem uma transesterificação intramolecular (Khattab *et al.*, 2019; McSweeney, 2004). Ambos os isómeros conferem sabores doces (Jo *et al.*, 2018). As nonalactonas, são responsáveis pelos sabores doces, cremosos ou amanteigados do queijo (Khattab *et al.*, 2019).

Outra reação dos ácidos gordos livres é com grupos sulfidrilos, como o metional que produz tioésteres, como o tioacetato de S-metilo, tioetil-2-metilpropanoato e tiobutirato de S-metilo, conferindo aromas que lembram o alho, enxofre e ovo. Nesta reação estão envolvidos *Brevibacterium linens* e *Micrococaceae* (Bertuzzi *et al.*, 2018; Khattab *et al.*, 2019).

Por fim, a última reação dos ácidos gordos livres, é a β -oxidação e a subsequente descarboxilação, que originam metilcetonas ou alcan-2-onas, especialmente heptanona e nonanona. Esta reação ocorre através de *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*. É importante ressaltar que estes ésteres também podem ser reduzidos nos seus respectivos álcoois secundários (como, 2-pentanol, 2-heptanol e 2-nonanol) causando sabores estranhos. Um fator que pode afetar os compostos voláteis produzidos está relacionado com os níveis de gordura do leite (Bertuzzi *et al.*, 2018; Khattab *et al.*, 2019).

Os ácidos gordos de cadeia curta também contribuem para o sabor do queijo, como o ácido hexanóico, octanóico, decanóico, dodecanóico. O ácido hexanóico é o responsável pelo sabor suado, picante e rançoso. O ácido octanóico possui um sabor de cabra ceroso e o ácido decanóico transmite odores cítricos e gordurosos, enquanto que o ácido dodecanóico transmite odores gordurosos (Khattab *et al.*, 2019).

1.5 Diversidade das características organolépticas dos queijos

A combinação de sabores e aromas associados ao leite de cabra origina uma variedade de sabores únicos que são importantes para a qualidade e para as propriedades gerais do leite e dos seus produtos lácteos (Park *et al.*, 2017). A formação de sabores característicos dos queijos são formados durante o processo de maturação dos queijos através do sinergismo entre as BAL iniciadoras e BAL não iniciadoras, desse modo, várias são as etapas/processos envolvidos no desenvolvimento de compostos aromáticos (figura 6) (Widyastuti *et al.*, 2014). As reações abrangem o metabolismo microbiano e inúmeras reações enzimáticas, incluindo a proteólise, a lipólise e a

fermentação de carboidratos. O produto dessas reações, originam uma diversidade de compostos aromáticos, resultando em sabores únicos dos queijos (Farkye, 2003; McSweeney, 2004; Shiota *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017)

De facto, a qualidade sensorial dos queijos pode ser afetada pelos níveis de peptídeos, aminoácidos e ácidos gordos livres existentes no queijo, produtos resultantes da lipólise e a proteólise ocorridos durante a maturação (Park *et al.*, 2017).



Figura 6: Processos envolvidos no desenvolvimento de compostos aromáticos.

A lipólise e os ácidos gordos livres resultantes estão associados aos sabores característicos dos queijos de leite de cabra. No leite de cabra existem concentrações elevadas de ácidos gordos de cadeia curta e média, em relação ao leite de vaca, os quais estão associados ao desenvolvimento de sabor a cabra nos produtos. Foi relatado que o ácido 4-etiloctanóico é o principal responsável pelo sabor aromático característico do queijo de cabra. As lípases que hidrolisam a gordura demonstraram ser um problema para a indústria, uma vez que a sua hidrólise causa um defeito a nível organolético de sabor rançoso no leite, queijo e noutros produtos lácteos (Park *et al.*, 2017).

A partir da proteólise resultam níveis de peptídeos e aminoácidos, que têm um grande impacto no sabor, aroma e textura na maioria das variedades de queijo (Park *et al.*, 2017).

O metabolismo da lactose, é um processo fundamental no fabrico de queijos, uma vez que permite aumentar a segurança do produto, além de que os produtos finais da fermentação contribuem para as características organolépticas dos queijos (Marino *et al.*, 2003). Por conseguinte, na fermentação dos carboidratos, lactose e citrato, o piruvato é o precursor de vários compostos aromáticos de cadeia curta (Farkye, 2003; Khattab *et al.*, 2019).

A qualidade sensorial dos queijos também pode ser influenciada pelo tipo de alimento fornecido aos animais. O parâmetro de cor do queijo relaciona-se com a composição do feno. O leite de cabra contém inúmeros pigmentos, incluindo o caroteno. O caroteno existe em quantidades significativas nos fenos verdes contribuindo para uma coloração amarela dos produtos lácteos. No entanto, este pigmento é sensível à luz ultravioleta sendo destruído durante a secagem e o seu armazenamento, assim os queijos produzidos com leite de primavera apresentam uma coloração mais amarelada que os queijos produzidos com leite de inverno (Park *et al.*, 2017).

As alterações microbiológicas, químicas e físicas para além de influenciarem as propriedades sensoriais finais do queijo, também influenciam as propriedades texturais e reológicas dos queijos (Pereira *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2017).

Capítulo 2 – Objetivos

Durante a produção de queijo, ocorre o processo designado de maturação, este por sua vez é dinâmico e complexo, envolvendo mudanças nos níveis microbiológico e bioquímico que resultam nas características organolépticas e físico-químicas únicas do tipo de queijo, especialmente no caso dos queijos de leite cru. Assim, é importante perceber quais as mudanças ocorridas durante o processo de maturação do queijo, de maneira a perceber de que forma as alterações interferem no fabrico do queijo e qual o seu contributo para o mesmo.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil físico-químico e monitorizar a população microbiana durante o período de maturação, permitindo identificar as mudanças mais significativas no queijo de leite de cabra cru.

Para a realização deste trabalho foram utilizados três lotes distintos de queijo de leite de cabra cru que foram analisados durante o seu processo de maturação. Deste modo, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar as propriedades físico-químicas, incluindo os parâmetros: pH, teor de humidade e perda de peso do queijo, teor de sal, taxa de proteólise do queijo, ácidos orgânicos existentes no leite e no queijo, perfil reológico do leite (quando submetido a taxa de cisalhamento) e do queijo (dureza e adesividade) e cor dos queijos.
- Avaliar a evolução das populações microbiológicas existentes no leite e no queijo.
- Avaliar a aceitabilidade do queijo pelos consumidores considerando a aparência, odor, textura, sabor, teor de sal através da análise sensorial e verificar a intenção de compra pelo consumidor.

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Neste capítulo serão abordados os materiais e os métodos utilizados na análise das alterações microbiológicas e físico químicas que ocorrem durante a maturação do queijo, concedendo os sabores e aromas característicos.

3.1 Origem das amostras

Durante o trabalho experimental foram recolhidas amostras durante o processamento de queijo de cabra produzido a partir de leite de cabra cru. Assim, foram recolhidas amostras de leite de cabra cru e o queijo fabricado com este leite, com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, provenientes de três lotes diferentes, numa fábrica do concelho da Covilhã. O período da amostragem decorreu entre os meses de janeiro e abril de 2019.

3.2 Recolha das amostras

As amostras de leite foram recolhidas instantes após a ordenha e as amostras de queijo do mesmo lote foram recolhidas com o tempo de maturação pretendido. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório em condições de refrigeração adequadas e analisadas posteriormente.

3.3 Determinação do pH das amostras

De forma a analisar a evolução do pH ao longo do processo de maturação do queijo, procedeu-se à sua avaliação em amostras de leite de cabra cru e de queijo produzido pelo mesmo, nos diferentes tempos de maturação. Assim para as amostras líquidas foi utilizado 1 mL de leite e para amostras sólidas foi pesado 1 g de queijo, protocolo adaptado de Holle e colaboradores (2018). Seguidamente as amostras de queijo foram maceradas em 9 mL de água destilada, sendo que para as amostras de leite foram diluídas com 9 mL de água destilada. Preparadas as amostras (n=3), procedeu-se então à medição do pH das amostras sob agitação, com um medidor eletrónico de pH calibrado Orion Start TM A211 (Fisher Scientific, Portugal) (Holle *et al.*, 2018).

3.4 Determinação do teor de humidade nos queijos

O teor de humidade dos queijos e o seu perfil ao longo o processo de maturação, foi determinado utilizando o método de secagem direta em estufa a 105 °C. Para tal, foram pesadas 2 g de amostra de queijos nos diferentes estágios de maturação, dos respetivos

lotes, tendo sido submetidas à secagem até que o seu peso estabilizasse. Todas as amostras foram analisadas em triplicado (Holle *et al.*, 2018).

A percentagem de humidade foi então calculada utilizando a seguinte equação (Bradley, 2010):

$$\% \text{ Humidade (m/m)} = \frac{\text{Peso da amostra húmida} - \text{Peso da amostra seca}}{\text{Peso da amostra húmida}} \times 100$$

3.5 Perda de peso do queijo

A determinação da perda de peso do queijo foi efetuada ao longo de todo o processo de maturação, de forma a perceber se o peso dos queijos era constante ou se sofria alterações. Para tal, foram escolhidos aleatoriamente 5 queijos os quais se identificaram e guardaram sendo sujeitos ao mesmo processo que todo o lote, tendo-se, posteriormente, realizado o registo do peso destes com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação (Correia *et al.*, 2014).

3.6 Determinação do teor sal das amostras

Para determinar a concentração de sal nas amostras de leite de cabra cru e queijo, nos diferentes tempos de maturação, foi utilizado o método de Mohr (Fernandes *et al.*, (2018). Foi pesada 1 g de amostra de queijo, tendo sido posteriormente liofilizada. Após o processo de liofilização as amostras foram homogeneizadas com 20 mL de água destilada e filtradas através de papel de filtro com 1 µm de poro (Pall Corporation – Life Sciences, México). Após a filtração, o filtrado obtido foi homogeneizado com a adição de 20 mL de água destilada, protocolo adaptado de Fernandes e colaboradores (2018). Depois disso, o pH da solução aquosa foi ajustado com hidróxido de sódio para 8,5; utilizando um medidor eletrónico de pH calibrado Mettler Toledo Five Easy™ – LE 409. Após o ajuste do pH, foi adicionado 1 mL de solução indicadora de cromato de potássio (Honeywell Fluka, EUA) a 5% (m/v). Posteriormente procedeu-se à titulação da mistura com nitrato de prata (Honeywell Fluka, EUA) com uma concentração de 0,05 mol/L; até ao aparecimento da primeira coloração avermelhada. A determinação do teor de sal foi realizada em triplicado.

Na quantificação do teor de sal também em amostras de leite de cabra cru, foi seguindo o mesmo protocolo.

A concentração de sal foi calculada utilizando a seguinte equação (Fernandes *et al.*, 2018):

$$\% \text{ Teor de sal} = \frac{(V_{\text{Titulado de AgNO}_3} \times 0,00292)}{(m_{\text{amostra}})} \times 100$$

Sabendo que em 1 mL de nitrato de prata (AgNO_3) corresponde a 0,00292 g de NaCl.

3.7 Determinação da proteólise nas amostras alimentares

O grau de proteólise foi determinado em cada lote, em amostras de leite de cabra cru e de queijo com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, através da utilização do reagente ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), que permite determinar os grupos α -amino livres existente nas amostras. Com base em adaptações ligeiras ao procedimento descrito por Polychroniadou (1988), foi medido 1 mL de leite e pesado 1 g de queijo (macerado), aos quais foi adicionado 20 mL de tampão borato 0,1 M (José M. Vaz Pereira S.A, Benavente – Portugal), com um pH de 9,5. A mistura obtida foi aquecida a 45°C durante 15 min, centrifugada a 3000 g durante 20 min. Após a centrifugação, foram retirados 3 mL do sobrenadante que foram diluídos em 50 mL de água destilada. A partir do extrato resultante, foi retirado 0,5 mL e foram adicionados 0,5 mL de tampão borato e 1 mL de reagente TNBS (1 mg / mL) (Sigma aldrich, EUA). Neste ponto, também foi preparado o branco, onde se substituiu apenas o extrato resultante por água destilada. Após a mistura do extrato com os reagentes bem como a preparação do branco, procedeu-se então à incubação das mesmas durante 60 minutos a 37 ° C. Ao final dos 60 minutos parou-se a reação com 2 mL de fosfato monossódico (Sigma aldrich, EUA) 0,1M contendo 1,5 mM de sulfito de sódio (Fisher Scientific, Portugal). Seguidamente foram retirados 100 μL da mistura da reação para as placas de 96 poços, para se proceder à medição da absorvância a 420nm, através do espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Go – Thermo Scientific) utilizando o programa SkanIt™ Software 4.1.

Para a quantificação dos grupos α -amino livres, resultantes da hidrólise das proteínas das amostras de leite e do queijo, foi realizado uma curva de calibração com glicina (0,025 – 3,2 mM), servindo como aminoácido padrão. Para todas as amostras, a sua análise foi realizada em triplicado.

3.8 Determinação dos ácidos orgânicos nas amostras alimentares

Para determinar os ácidos orgânicos existentes nas amostras alimentares dos três lotes em estudo, foi adaptado o protocolo sugerido por Ball e colaboradores (2011). Assim, procedeu-se à preparação das amostras, no qual foi medido/pesado, 250 µL de leite ou 0,250 g de queijo. Seguidamente procedeu-se à extração dos ácidos orgânicos, pela adição de 250 µL de água destilada e 1 mL de acetonitrilo (Fisher Scientific, Portugal), com o objetivo de precipitar as proteínas existentes. As amostras foram agitadas durante 2 minutos no vortex. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 13 000 rpm durante 4 minutos, às quais foi recolhido o sobrenadante que foi filtrado (Whatman, poro 0,2 µm). Finalmente, 10 µL do sobrenadante filtrado das respetivas amostras foram injetados na coluna de HPLC; 7,7 x 300 mm, 8 µm (Agilent Technologies, EUA), com uma temperatura do forno de 65 °C. Como fase móvel foi utilizado ácido sulfúrico a 0,009M (Chem-Lab nv, Bélgica), tendo sido usado um fluxo constante de 0,7 mL por minuto. Para a deteção dos ácidos orgânicos em estudo, utilizou-se o detetor UV a um comprimento de onda de 220 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

De forma a identificar os ácidos orgânicos no leite e no queijo com 5, 10, 20, 31 e 45 de maturação, soluções padrão, como o ácido láctico (Agilent Technologies, EUA), o ácido propiónico (Fisher Scientific, Portugal), o ácido acético (Fisher Scientific, Portugal), o ácido cítrico (Fisher Scientific, Portugal) e o ácido fórmico (Chem-Lab nv, Bélgica), foram preparadas e analisadas segundo o protocolo já descrito. Para a construção da curva de calibração (área do pico *versus* concentração), foram utilizadas concentrações crescentes de ácido láctico (0,05 – 3,05% (m/v)), de ácido propiónico (0,006-0,018% (m/v)), de ácido acético (0,010-0,064% (m/v)), de ácido cítrico (0,003-0,963% (m/v)) e de ácido fórmico (0,004-0,046% (m/v)). Deste modo, a partir dos tempos de retenção e das equações da reta de cada ácido, foi possível identificar e determinar a concentração dos ácidos existentes no leite e nos queijos em análise.

3.9 Avaliação da reologia das amostras

A avaliação das propriedades reológicas é importante, uma vez que afetam a qualidade sensorial, o prazo de validade, a estabilidade, a biodisponibilidade e a textura geral dos produtos, durante o seu desenvolvimento (Duhan *et al.*, 2018). Para além disso, permite avaliar a qualidade dos alimentos, uma vez que, os seus parâmetros, estão

diretamente relacionados com a aceitação do produto final pelos consumidor (Silva and Costa, 2017).

3.9.1 Determinação da viscosidade do leite

De forma a determinar e comparar a viscosidade do leite de cabra cru utilizado na produção de queijos provenientes de três lotes diferentes, a viscosidade do leite foi determinada adaptando o protocolo sugerido por Gabas e colaboradores (2012). Assim, para a sua medição foi utilizado um *Spindle* CPA- 40Z (Brookfield Ametek, USA) e o Brookfield Rheometer DV3T (Brookfield Ametek, USA), a uma temperatura de 25 °C. No reservatório foi colocado 600 µL de leite. Seguidamente a amostra de leite foi submetida a taxas de cisalhamento, compreendidas entre 7,5 s⁻¹ e 150 s⁻¹, com a duração de 1 minuto em cada intervalo.

3.9.2 Determinação da textura dos queijos

Na determinação das propriedades texturais das amostras de queijo provenientes dos três lotes propostos para o estudo, utilizou-se um texturómetro, Texture Analyzer TA.XT plus (Stable Micro Systems) para os vários estágios de maturação (5, 10, 20, 31, 45 dias).

A dureza e adesividade do queijo foram determinadas usando uma sonda esférica (P/1S). Neste teste as condições utilizadas na análise da textura tiveram como base no procedimento descrito por Medeiros e colaboradores, (2013). As amostras de queijo foram comprimidas até 50 % da sua altura inicial a uma velocidade de 1,0 mm/s, atingindo uma força de contacto de 5 g, no entanto a velocidade utilizada no pré-teste e no pós-teste foi de 0,75 mm/s e 5,00 mm/s, respetivamente.

Especificamente, cada amostra de queijos foi cortada em cubos de 1,5 x 1,5 x 1,5 cm para posteriormente serem analisados pelos testes já descritos (Togay *et al.*, 2017). As amostras de queijo a analisar corresponderam a frações recolhidas à superfície e ao interior do queijo. Os parâmetros de textura (dureza e adesividade) foram analisados usando o software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems).

3.10 Medição da cor dos queijos

A medição da cor do queijo foi realizada utilizando um colorímetro manual de tristímulo (Chroma meter, modelo CR-400/410, Konica Minolta), tendo sido calibrado com um padrão (fornecido com o equipamento), antes de se proceder à análise da cor do queijo (Correia *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2018).

Foi escolhido um iluminante padrão da Comissão Internacional de Iluminação (CIE), neste caso, utilizou-se o iluminante C para determinar as coordenadas cartesianas do espaço de cores CIE, valores de L^* , a^* e b^* (Correia *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2018). Os parâmetros determinados foram o brilho, que corresponde aos valores de L^* que variam de 0 (preto) a 100 (branco), e os restantes parâmetros analisados foram as coordenadas de cores opostas, valores de a^* e b^* . A coordenada de cor a^* assume cor verde para valores negativos e cor vermelha para valores positivos, já a coordenada de cor b^* , assume cor azul para valores negativos e cor amarela para valores positivos (Figura 7) (Correia *et al.*, 2014).

A medição da cor foi assim determinada a partir de zonas aleatórias da superfície e do interior do queijo com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, de cada lote. Em cada queijo foram então realizadas 3 medições da superfície do queijo e 3 medições do interior do queijo, pelo que aos valores obtidos foram determinadas as suas médias (Fernandes *et al.*, 2018).

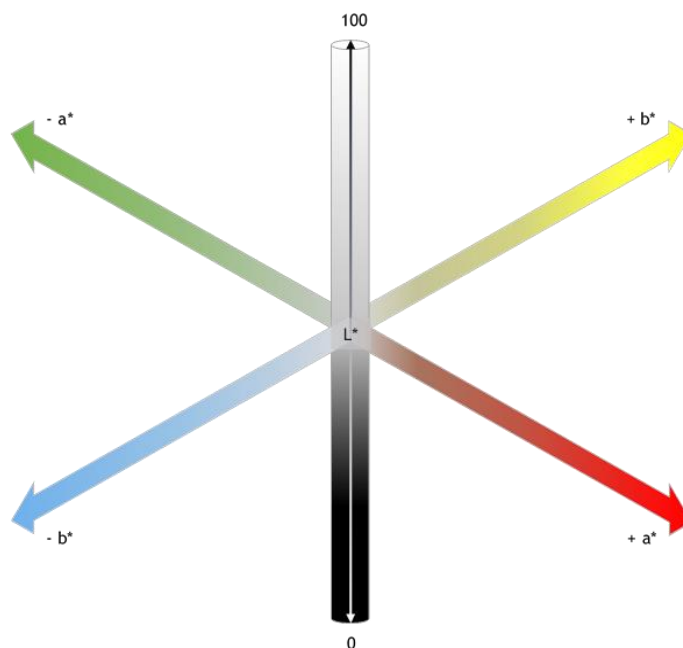


Figura 7: Coordenadas cartesianas do espaço de cores CIE (L^* , a^* , b^*).

3.11 Análise microbiológica das amostras alimentares

Os queijos de cabra foram produzidos com leite cru, utilizando apenas a microflora nativa do leite no seu fabrico. De forma a avaliar a população microbiológica das amostras de leite e queijo, nos diferentes tempos de maturação, todas as amostras foram manuseadas em condições de assepsia. Inicialmente, foram medidos 10 mL de

leite ou pesados 10 g de queijo de cada lote a cada tempo de maturação, para sacos de plástico estéreis. Posteriormente foram homogeneizadas com 90 mL de solução de citrato de sódio (Merck, Alemanha) a 2% (p/v), pré-aquecido a 37 °C, usando um Stomacher® 80 microBiomaster (Seward), durante 2 minutos a velocidade máxima (Abriouel *et al.*, 2008; Alegria *et al.*, 2009).

Após o processamento das amostras, a composição microbiana das amostras alimentares foi então determinada. A partir da mistura resultante, foram retirados 1 mL da solução para a realização de diluições decimais, com 9 mL de Solução Ringer (1/4 strength) (Sigma aldrich, EUA). Após as diluições, alíquotas de 100 µL ou de 1 mL das respectivas amostras foram plaqueadas nos meios seletivos, em duplicado, pelo método de espalhamento e de incorporação, respectivamente (Abriouel *et al.*, 2008; Ercolini *et al.*, 2009). Os meios utilizados para o isolamento da biodiversidade microbiana das amostras em estudo foram diversos e específicos para cada microrganismo a analisar. Os respectivos meios foram utilizados de acordo com as instruções do fornecedor.

Utilizou-se o meio *Plate Count Agar* (PCA) constituído por 5 g/L de triptona (Conda, Espanha), 2,5 g/L extrato de levedura (Merck, Alemanha), 1 g/L de glucose (Fisher Scientific, Portugal) e 12 g/L de agar (Himedia, Índia), com um pH igual a 7,0±0,2, para a contagem das bactérias mesofílicas totais aeróbias, tendo sido as placas incubadas a 30 °C por 72 h (Alegria *et al.*, 2009). No caso de contagem das bactérias psicrótróficas aeróbicas, as placas foram incubadas a 7 °C durante 10 dias (Ercolini *et al.*, 2009). Foi utilizado o método de incorporação, onde 1 mL das diluições sucessivas foram colocadas em placas de Petri, sendo subsequentemente adicionado 15 mL de meio PCA arrefecido a 45 °C, homogeneizado e deixado solidificar antes da incubação adequada.

O meio *Agar Man Rogosa and Sharpe* (VWR, EUA) com um pH 5,7 foi utilizado para contagem de lactobacilos, sendo as placas incubadas após inoculação de 100 µL de amostra pelo método de espalhamento a 30°C durante 72 h, em condições de anaerobiose (Alegria *et al.*, 2009). Após o tempo de incubação as colónias podem apresentar-se como compactas, emplumadas, pequenas, opacas e brancas.

O meio *agar M17* (Biokar Diagnostics, França) foi utilizado para contagem de lactococos (Alegria *et al.*, 2009), pelo que as placas após serem inoculadas com alíquotas de 100 µL de amostra pelo método de espalhamento foram incubadas a 30 °C durante 48 h em aerobiose. As colónias podem atingir 1 a 2 mm de diâmetro, dependendo do número de colónias existentes na placa.

O meio *Slanetz and Bartley agar* (VWR, EUA) foi utilizado para a contagem de enterococos. Após a esterilização do meio é adicionada uma solução estéril a 1% (v/v) de CTT (Cloreto de trifeniltetrazólio) (VWR, EUA), que irá permitir desenvolver uma coloração vermelha ou roxa das colónias presuntivas pelo facto destas bactérias reduzirem o CTT a um formazano insolúvel que é vermelho. Para a contagem de enterococos, as placas de Petri foram inoculadas com alíquotas de 100 µL de amostra pelo método de espalhamento, sendo posteriormente incubadas a 37 °C durante 48 h (Faccia *et al.*, 2015).

Para contagem de *Pseudomonas* spp. foi utilizado o meio agar base *Pseudomonas* suplementado com CFC suplemento seletivo de *Pseudomonas* (concentração final no meio: ceftrimida 2,5 mg/L; ácido fusídico 2,5 mg/L; Cefalosporina 12,5 mg/L) (VWR, EUA). Para a contagem de *Pseudomonas* spp., as placas foram inoculadas com alíquotas de 100 µL de amostra pelo método de espalhamento, e posteriormente foram incubadas a 25 °C durante 48 h. Após o tempo de incubação, as colónias típicas apresentam uma coloração verde-amarela fluorescente (Ercolini *et al.*, 2009).

Foi também utilizado o meio *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA) (VWR, EUA), para contagem de enterobactérias. Relativamente ao modo de execução, utilizou-se o método de incorporação, pelo que as diluições foram colocadas em placas de Petri, tendo sido subsequentemente adicionado 15 mL de agar VRBGA arrefecido a 45 °C. Após a solidificação adicionou-se mais 10 mL de agar VRBGA na superfície do meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h, e após o tempo de incubação as colónias apresentaram uma coloração rosa a vermelho-violeta (Alegría *et al.*, 2009).

Para a contagem de estafilococos foi utilizado o meio *Baird–Parker agar* (VWR, EUA), suplementado com 50 mL/L de gema de ovo com telurito (VWR, EUA). Este suplemento permite a diferenciação presuntiva de estafilococos coagulase positiva. As colónias apresentam uma coloração preta, devido à redução do telurito, e pode ocorrer ou não lipólise e/ou proteólise originando zonas claras translúcidas em volta das colónias, podendo apresentar halos opalescentes. A ocorrência de lipólise e/ou proteólise permite diferenciar os estafilococos coagulase positiva. As placas de Petri com este meio foram plaqueadas com alíquotas de 100 µL de amostra, utilizando o método de espalhamento. As colónias foram registadas após 48 h de incubação a 37 ± 1 °C (Alegría *et al.*, 2009).

Por último, na contagem de leveduras e bolores utilizou-se o meio *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar* (YGCA), constituído por 5 g/L extrato de levedura

(Merck, Alemanha), 20 g/L de glucose (Fisher Scientific, Portugal), 15 g/L de agar (Himedia, Índia), com um pH igual a $6,6 \pm 0,2$. Após a esterilização, foi adicionado 0,1 g/L de antibiótico cloranfenicol (Honeywell Fluka, EUA) para suprimir o crescimento de bactérias contaminantes, obtendo assim as condições ideais para o crescimento de leveduras e bolores. A amostra foi inoculada pelo método de incorporação. Uma alíquota de cada diluição foi colocada nas placas de Petri, seguidamente foi adicionado 15 mL meio YGCA arrefecido a 45°C. Após solidificação do meio, as placas foram então incubadas a 25°C durante 3-5 dias, originando colónias típicas (Alegría *et al.*, 2009).

Após a incubação, procedeu-se à contagem das colónias contabilizando as placas com 30 – 300 colónias. A contagem microbiana foi expressa em ufc/mL ou ufc/g de amostra.

3.12 Análise sensorial hedónica

Na realização da análise sensorial do queijo de leite de cabra cru os parâmetros como aparência, odor, textura, sabor e teor de sal foram avaliados usando uma escala hedónica de nove pontos (1 = não gostei e 9 = gostei extremamente). Para além disso, cada consumidor indicou a sua intenção de compra do queijo, utilizando uma escala hedónica de 5 pontos (1 = certamente não compraria e 5 = certamente compraria). O inquérito fornecido aos participantes encontra-se no anexo I (Tabet *et al.*, 2016).

Assim, os queijos com 45 dias de maturação, dos respetivos lotes, exceto o lote 1 que maturou até aos 31 dias, foram cortados em pequenos cubos e apresentados aos consumidores regulares de queijo (n=50), no qual, 25 consumidores foram homens e 25 consumidores foram mulheres, com idade média de 33 ± 11 . O painel foi composto por estudantes, professores e funcionários da Universidade da Beira Interior.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

A produção de queijo com leite cru tem os seus desafios, sendo que se distingue de outros leites, pela particularidade do seu sabor e pelo seu fabrico ocorrer apenas com a cultura nativa do leite, não possuindo nenhuma cultura iniciadora que auxilie o processo de produção do queijo (Montel *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2016). Para além disso, a composição do leite, pode ser afetada por muitos fatores (raça, alimentação, condições de manuseio, estado de saúde do animal, entre outros), (Guo, 2003; Adams and Moss, 2008; Farkye, 2004; Getaneh, *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017). Desta forma, todos estes fatores podem alterar a cultura nativa do leite e por conseguinte alterar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo.

Para a indústria de laticínios que trabalham com leite cru, o ideal seria que o leite apresentasse padrões de biodiversidade, de maneira a produzir queijos com características padronizadas, para que o queijo produzido mantivesse sempre as mesmas propriedades, que são apreciadas pelos consumidores. Assim, diminuindo a possível rejeição do produto pelo consumidor, uma vez que, o sabor e a textura são afetados pelos efeitos da microflora do leite cru, que modificam a composição físico-química do leite (Montel *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011).

Desta forma surge o objetivo deste trabalho, onde se pretendeu realizar uma caracterização físico-química e microbiológica de leite de cabra cru e de queijo fabricado pelo mesmo, durante os processos de produção e maturação, observando a possível variabilidade do produto. Assim para a realização deste trabalho, foram analisados 3 lotes diferentes. No primeiro lote analisado o tempo de maturação do queijo de cabra foi de apenas 31 dias, que seria o tempo necessário para obtenção de um produto com boas propriedades organolépticas e seria o tempo necessário para diminuir as populações bacterianas. Após a análise sensorial e microbiológica, foi proposto mais tempo de maturação (45 dias) de forma a obter resultados mais promissores.

4.1 Caracterização físico-química do leite cru e queijo de cabra

4.1.1 Avaliação do pH

Dado que o pH é um parâmetro que apresenta variações ao longo do tempo de maturação do queijo, visto ser uma consequência das reações ocorridas durante a

maturação (Fernandes *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2011), procedemos à sua avaliação durante a realização do estudo. Para além disso, o pH do leite cru também foi testado, de forma a perceber se o leite utilizado nestes três lotes apresentava diferenças nos valores de pH. A tabela 6 mostra os valores médios do pH do leite cru e dos queijos com o respetivo tempo de maturação.

Tabela 6: Valores de pH determinados no leite e durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

pH						
Lote	Leite	Tempo de maturação (dias)				
		5	10	20	31	45
1	7,22 \pm 0,01	5,92 \pm 0,03	5,59 \pm 0,02	5,53 \pm 0,01	5,52 \pm 0,02	n.d
2	6,73 \pm 0,02	6,19 \pm 0,01	6,05 \pm 0,00	5,72 \pm 0,01	5,65 \pm 0,02	5,72 \pm 0,00
3	7,07 \pm 0,02	6,06 \pm 0,02	5,97 \pm 0,01	5,66 \pm 0,01	5,64 \pm 0,01	5,28 \pm 0,01

n.d: não determinado

Nos resultados obtidos na determinação do pH, foi possível verificar que os valores do pH do leite encontram-se entre 6,73 e 7,22. Dos três lotes de leite de cabra cru utilizados no fabrico de queijo, o leite do lote 2 foi aquele que apresentou um pH mais baixo.

Analisando a evolução do pH ao longo do processo de maturação dos queijos foi possível verificar que a diminuição e estabilização do pH no lote 1 ocorreu mais cedo relativamente aos restantes lotes. Por outro lado, é verificado que os valores do pH dos queijos do lote 2 e 3 vão-se aproximando à medida que a maturação dos queijos progride, o que não se tinha verificado inicialmente.

No entanto, independente do pH inicial das amostras de leite cru de cabra, o pH sofre uma ligeira diminuição ao longo do processo de maturação que tende a estabilizar a partir dos 20 dias, assumindo valores entre 5,72 – 5,53. Porém, o lote 3 aos 45 dias de maturação sofreu uma pequena oscilação, assumindo valores de pH mais baixos (5,28).

O pH de leite de cabra cru descrito em trabalhos anteriores apresentam valores de pH de 6,6 ou próximos deste (Bontinis *et al.*, 2012; Faccia *et al.*, 2015; Miloradovic *et al.*, 2017; Pino *et al.*, 2018; Tabet *et al.*, 2016; Zárate *et al.*, 1997). Pelos resultados obtidos, o pH do leite do lote 2 é o mais semelhante com a literatura, no entanto, os valores de pH dos restantes lotes encontram-se próximos.

De acordo com resultados determinados pelos autores Hayaloglu *et al.*, (2013) e Pino *et al.*, (2018) na medição do pH em queijos fabricados com leite de cabra cru, os valores

de pH obtidos no final do tempo de maturação destes queijos, encontravam-se entre 4,71 e 5,42.

As diferenças encontradas nos valores de pH entre a literatura e este trabalho podem ocorrer, devido à composição do leite, uma vez que este é afetado por muitos fatores, como, a raça, a idade, o animal, a alimentação, a estação do ano, as condições ambientais, o período de lactação, o período da ordenha, o estado nutricional e a saúde do animal (Guo, 2003; Adams and Moss, 2008; Farkye, 2004; Getaneh, *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017).

Os valores baixos de pH, podem ser a causa de uma prensagem suave que proporciona a retenção de soro na coalhada, tendo como consequência a sua acidificação (Delgado *et al.*, 2011). Por outro lado, a diminuição do pH ao longo do tempo de maturação, pode estar relacionado, como relatado por vários autores, com a população microbiana existente nos queijos, e pela produção de ácido láctico, proveniente da degradação da lactose pelas BAL (Alegría *et al.*, 2009; Bertuzzi *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2011; Zárata *et al.*, 1997). Os baixos valores de pH, resultantes do metabolismo das BAL, podem estar envolvidos na inibição do crescimento de microrganismos, como aconteceu para a população de enterobactérias, observadas por Picon *et al.*, (2016).

Desta forma, a diminuição repentina do pH verificado no lote 1 logo nos primeiros dias de maturação pode estar relacionada com a prensagem insuficiente, que consequentemente, afeta o processo de sinérese pelo fato do soro não ser completamente expulso da coalhada, provocando a sua acidificação.

Os valores de pH obtidos no final do processo de maturação do queijo produzido com leite de cabra cru podem ainda ser comparados com os valores de pH de queijos produzido com leite cru proveniente de outros animais (ex: vacas e ovelhas).

Em trabalhos realizados pelos autores Alegría *et al.*, (2009) e Jo *et al.*, (2018) em queijos de leite de vaca cru, os valores do pH determinados no final do tempo de maturação dos queijos variaram entre 5,25 e 5,90. Porém, Alvarenga *et al.*, (2011), Bozoudi *et al.*, (2018) e Gonçalves *et al.*, (2018), em queijos fabricados com leite de ovelha cru, os valores do pH no final do tempo de maturação, variaram entre 4,1 e 5,70. Deste modo, os valores finais de pH dos queijos, podem variar entre os trabalhos dependendo do tipo de leite utilizado, do pH inicial do leite, do tempo de maturação utilizado, assim como o tipo de queijo fabricado.

4.1.2 Avaliação do teor de humidade e perda de peso do queijo

A humidade tem um contributo direto e indireto no fabrico de queijos, devido aos sólidos dissolvidos, como proteínas de soro de leite e sais de leite solúveis (Pazzola *et al.*, 2019).

De acordo com os dados da tabela 7, o teor de humidade apresentou valores entre 48,90% e 60,76%, mediante o tempo de maturação.

Tabela 7: Valores do teor de humidade (%) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Lote	Teor de humidade (%)				
	Tempo de maturação (dias)				
	5	10	20	31	45
1	48,90 \pm 0,13	49,88 \pm 1,06	43,73 \pm 10,3	48,72 \pm 0,50	n.d
2	48,23 \pm 0,10	51,83 \pm 0,58	53,95 \pm 0,83	57,21 \pm 0,27	57,20 \pm 0,41
3	50,04 \pm 0,76	50,88 \pm 0,42	54,17 \pm 0,80	53,73 \pm 0,62	60,76 \pm 1,67

n.d: não determinado

Pelos resultados obtidos, os queijos do lote 1 ao longo do processo de maturação apresentaram um teor de humidade idêntico, verificando-se uma oscilação dos seus valores aos 20 dias de maturação, no entanto foi observado nestes queijos um teor de humidade aos 31 dias de maturação de 48,72% (valor próximo ao observado nos queijos com apenas 5 dias de maturação). Em relação aos lotes 2 e 3, o teor de humidade dos queijos tende a aumentar ao longo do processo de maturação. Contudo, no lote 2 foi verificado que a partir dos 31 dias de maturação o teor de humidade tende a estabilizar, assumindo valores de humidade próximos de 57%. No lote 3 os queijos com 5 e 10 dias de maturação apresentaram um teor de humidade idêntico, tendo apresentado um aumento ao longo do processo de maturação, apresentando aproximadamente 60,76% de humidade aos 45 dias de maturação. Assim pelos resultados obtidos, foi verificado que os lotes 2 e 3 são semelhantes relativamente ao teor de humidade.

Porém, os teores de humidade dos queijos não sofreram grandes alterações, durante o processo de maturação. No entanto, estes resultados não eram os esperados, uma vez que ao longo da maturação foi verificado uma diminuição do peso dos queijos dos vários lotes (Figura 8). As diferenças observadas no teor de humidade durante a maturação dos queijos poderão ser causadas pelas amostras de queijo analisadas, uma vez que, em cada análise (com o tempo de maturação pretendido) o queijo foi sempre diferente. Por conseguinte, outra justificação pode estar na base dos resultados obtidos, como refere Macedo *et al.*, (1993), que o teor de humidade nos queijos aumenta à

medida que a razão caseína/gordura também aumenta. Esta razão está associada à humidade retida na rede de caseínas, uma vez que as caseínas formam uma rede contínua ocluindo a gordura e a água no seu interior (Pazzola *et al.*, 2019).

Em trabalhos anteriores, descritos por Hayaloglu *et al.*, (2013) e Pino *et al.*, (2018), os teores de humidade final dos queijos produzidos com leite de cabra cru apresentavam um teor de humidade $\leq 50\%$. Relativamente aos queijos produzidos com leite de cabra pasteurizado, Pereira e seus colaboradores (2010) verificaram teores de humidade entre 82,3% e 86,2%, diminuindo com o tempo de maturação.

Para além disso, os valores de humidade dos queijos obtidos neste trabalho, podem ser comparados com os valores de humidade de outros queijos fabricados com outros leites.

Em trabalhos realizados pelos autores Jo *et al.*, (2018) e Zhao *et al.*, (2019) em queijos produzidos com leite de vaca cru, observaram teores de humidade no final do período de maturação, entre 33% e 44,13%, contudo, nos trabalhos desenvolvidos por Ayyash and Shah, (2010), Kongo *et al.*, (2009) e Pereira *et al.*, (2010), em queijos fabricados com leite de vaca pasteurizado, os teores de humidade dos queijos exibiram valores entre 37% e 86,2%, os quais diminuíram durante a maturação dos queijos. Em queijos produzidos com leite de ovelha cru, foi constatado por vários autores, Alvarenga *et al.*, (2011), Bozoudi *et al.*, (2018) e Gonçalves *et al.*, (2018), que os valores do teor de humidade final dos queijos variaram entre 39,10% e 52,56%. Por conseguinte, em queijos fabricados com leite de ovelha pasteurizado, os queijos analisados por Pereira *et al.*, (2010) apresentaram valores entre 71,5% e 76,5%, com diminuição dos seus valores ao longo do tempo.

Deste modo, a variabilidade de resultados relativos ao teor de humidade está relacionada com os diferentes métodos de fabrico entre os lacticínios, assim como, pela composição diferente dos leites e da eficácia do processo de prensagem (Kongo *et al.*, 2009; Park, 2007).

De acordo com a classificação dos queijos, relativamente ao seu teor de humidade (Tabela 1), podemos classificar os queijos do lote 1 como queijos semi macios ($\leq 50\%$) e os queijos dos lotes 2 e 3 como queijos macios ($\geq 50\%$) (Adams and Moss, 2008).

Relativamente ao peso dos queijos, como já anteriormente referido, os resultados não apresentaram a mesma tendência com o teor de humidade (Figura 8). Desta forma, foi observado uma diminuição do peso dos queijos durante o tempo de maturação, tendo sido verificado uma redução de 20,7 % no lote 1, de 31,4 % no lote 2 e de 28,8 % lote 3,

em relação ao peso inicial dos queijos (considerando os queijos com 5 dias de maturação), (dados não mostrados).

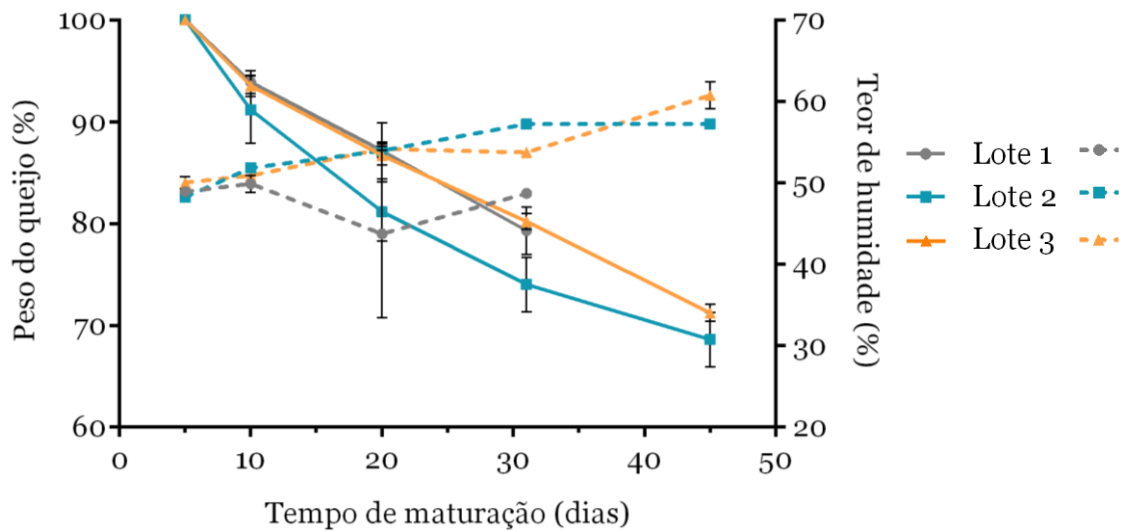


Figura 8: Valores percentuais do peso do queijo (linhas a cheio) e os valores do teor de umidade (linhas a tracejado) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.1.3 Avaliação do teor de sal

Após a formação da coalhada, os queijos são salgados, através do processo de salga, por diferentes métodos, os quais originam uma distribuição não homogênea do sal no queijo (Real, *et al.*, 2018; Faccia *et al.*, 2015; Guinee, 2004; Kongo *et al.*, 2009).

Neste caso, o processo de salga do queijo realizado não é padronizado. Durante o processo de maturação do queijo a absorção de sal ocorre através da sua difusão na coalhada. A absorção de sal é causada pelo contra fluxo de umidade do queijo que cria uma camada supersaturada na superfície do queijo, permitindo a dissolução do sal na umidade de superfície possibilitando a sua difusão, lentamente para o interior do queijo. Este contra fluxo causa um gradiente decrescente de sal da superfície para o interior dos queijos e um gradiente decrescente de umidade na direção oposta, no entanto estes gradientes vão desaparecendo lentamente ao longo do tempo de maturação, até que ocorra um equilíbrio entre o teor de sal e teor de umidade (Guinee, 2004).

Por conseguinte o equilíbrio é geralmente alcançado mais rapidamente em queijos de menores dimensões. Assim sendo, o teor de umidade dos queijos é o principal fator que afeta as taxas de absorção e difusão de sal, porém em queijos da mesma variedade a taxa de difusão de sal não é necessariamente maior no queijo com maior umidade, uma vez que os níveis de gordura e de proteína podem afetar a migração do sal no

queijo (Guinee, 2004). Adicionalmente, a área de superfície, acidez, proporção de sal e temperatura, também interferem na difusão do sal para o queijo (Cankurt, 2019).

A avaliação do teor de sal foi determinada tanto no leite cru como para queijos fabricados por este leite com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação. Pelos resultados obtidos (Figura 9), foi observado que o leite dos três lotes em estudo contém vestígios de sal, tendo-se verificado teores de sal semelhantes nos diferentes lotes, cerca de 0,4 % de sal. No trabalho desenvolvido por Zárte e co-autores, (1997) com o mesmo tipo de leite, este apresentou um teor de sal de 0,22%, conteúdo de sal semelhante ao leite utilizado neste estudo.

Relativamente ao teor de sal nos queijos, este aumenta progressivamente ao longo da maturação, em todos os lotes, como seria esperado (Figura 9), verificando-se aos 5 dias de maturação o maior aumento. Por conseguinte, nos lotes 2 e 3, entre os 10 e os 20 dias de maturação, o teor de sal não apresentou variações, aumentando gradualmente até ao último dia de maturação, no entanto, o lote 2 foi o que se destacou, tendo apresentado um aumento superior em relação ao lote 3.

Relativamente ao lote 1, o teor de sal sofre uma pequena oscilação entre os 10 e 20 dias de maturação, observando-se posteriormente um aumento do teor de sal até final o tempo de maturação, como verificado nos restantes lotes.

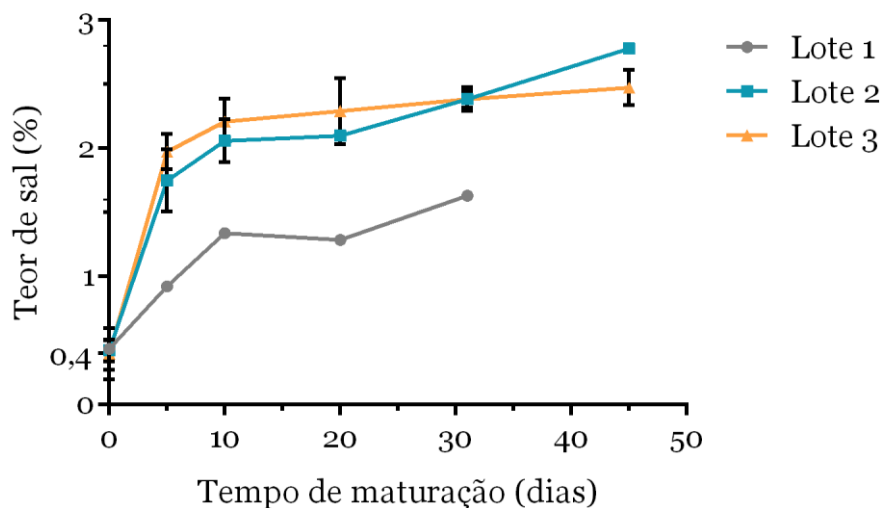


Figura 9: Valores do teor de sal (%) determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Comparando os três lotes, é possível concluir que os queijos do lote 1 foram os que apresentaram menor teor de sal em todo o processo de maturação, terminando com um

teor de sal, cerca de 1,6%, relativamente aos lotes 2 e 3, que apresentaram teores de sal de 2,8% e de 2,5%, respetivamente.

Os teores de sal obtidos nos queijos dos três lotes podem ser comparados com a literatura de queijos fabricados com o mesmo leite ou com outros leites. Em trabalhos anteriores, descritos por Hayaloglu *et al.*, (2013), Togay *et al.*, (2017) e Pino *et al.*, (2018), os teores finais de sal dos queijos produzidos com leite de cabra cru apresentaram valores entre 1,52% e 7,75%. Nomeadamente o autor Zárate *et al.*, (1997) observaram um comportamento similar ao verificado neste trabalho para os queijos dos vários lotes (entre 3,72% e 6,10%).

Pesquisas anteriores em queijos produzidos com leite de vaca cru, descritas por Jo *et al.*, (2018) e Zhao *et al.*, (2019) os queijos no final do tempo de maturação apresentaram um teor de sal entre 1,13% e 1,35%. Em queijos fabricados com leite de ovelha cru com um tempo de maturação de dois meses, o autor Bozoudi *et al.*, (2018) verificou teores de sal de 4,3% e 4,5%. Noutros trabalhos, onde foi aplicado tratamento térmico ao leite, os queijos produzidos também apresentaram um aumento do teor de sal durante o tempo de maturação, observando-se teores de sal entre 1,27% e 3,28%, em queijos de leite de cabra (Kondyli *et al.*, 2016; Miloradovic *et al.*, 2017) e em queijos de leite de vaca (Kongo *et al.*, 2009) foram determinados teores de sal entre 0,9% e 5,1%.

O aumento do teor de sal durante a maturação dos queijos, descrito por diversos autores, corrobora com os resultados aqui descritos (Figura 9), provém do aumento da difusão do sal na coalhada, uma vez que a absorção de sal é causada pelo contra fluxo da humidade do interior do queijo para a superfície (Guinee, 2004). Por conseguinte, enquanto não for estabelecido um equilíbrio entre os gradientes (sal e humidade) o aumento do teor de sal no queijo é verificado (Kondyli *et al.*, 2016). No entanto, o tempo necessário para a obtenção do equilíbrio é condicionado pelo tipo, forma e tamanho do queijo, sua composição e condições de maturação (Guinee, 2004).

Relativamente à variabilidade dos valores dos teores de sal observado, pode derivar do processo de salga, uma vez que este processo ocorre de forma convencional sem qualquer padronização no momento da sua aplicação (Cankurt, 2019; Kongo *et al.*, 2009).

4.1.4 Determinação da concentração de grupos de aminas livres, para monitorização do processo de proteólise

Na proteólise ocorre a degradação de proteínas e de polipeptídeos, pelo que, a clivagem das ligações peptídicas origina grupos α -amino livres. Estes grupos libertados pela hidrólise de proteínas reagem com o reagente TNBS, originando compostos cromogéneos (com uma intensidade de cor amarelo-laranja) que absorvem fortemente a 420 nm (Kuchroo *et al.*, 1983; Meng *et al.*, 2018; Polychroniadou, 1988).

O procedimento utilizando com o reagente TNBS, visa ser uma alternativa ao método clássico (método de Kjeldahl) para medir a proteólise durante a maturação do queijo, verificando-se uma boa concordância entre os valores obtidos pelos dois métodos (Polychroniadou, 1988). Desta forma, o procedimento com TNBS foi utilizado para quantificar os grupos α -amino livres, permitindo deste modo, monitorizar a proteólise durante a maturação dos queijos (Meng *et al.*, 2018; Polychroniadou, 1988). O método do TNBS é um ensaio espectrofotométrico simples, rápido e sensível, que permite utilizar pouca quantidade de amostra, assim como, analisar um grande número de amostras em simultâneo (Polychroniadou, 1988). Assim, a proteólise foi monitorizada em três lotes distintos, durante todo o processo de produção e de maturação dos queijos. A figura 10 demonstra a evolução da proteólise a partir das concentrações dos grupos α -amino livres, resultantes da hidrólise das proteínas das amostras de leite e dos queijos com 5, 10, 20, 31 e 45 de maturação.

Pelos resultados obtidos, dos três lotes em estudo, foi verificado que as concentrações dos grupos α -amino livres, quantificados como equivalentes de glicina (mM) tendem a aumentar com o tempo de maturação. Assim, como estes grupos permitem monitorizar a taxa de proteólise, conclui-se que durante a maturação do queijo a taxa de proteólise também aumentou.

A partir da figura 10, é possível observar que o lote 1 e o lote 3 apresentam perfis semelhantes de proteólise, sendo esta mais intensa entre os 10 e os 20 dias de maturação, sendo que, o lote 1 foi o que apresentou uma taxa de proteólise superior até aos 31 dias de maturação, tendo sido observado uma concentração de grupos α -amino livres de 0,267 mM. Por conseguinte, a taxa de proteólise do lote 3, aumentou continuamente até aos 45 dias de maturação (0,293 mM), período que não foi avaliado para o lote 1.

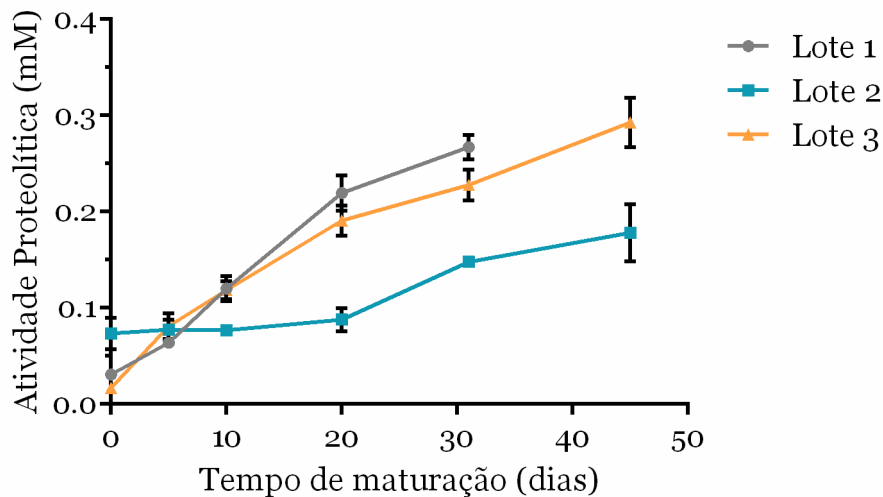


Figura 10: Quantificação da atividade proteolítica, representada pela concentração dos grupos α -amino livres, representados como equivalentes de glicina (mM), determinados durante a maturação do queijo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Relativamente ao lote 2, a concentração dos grupos α -amino livres determinada no leite foi superior aos restantes lotes (0,073 mM). No entanto, esta concentração foi aproximadamente estável até aos 20 dias de maturação, contrariamente ao observado nos lotes 1 e 3. Por outro lado, no lote 2, a partir dos 20 dias de maturação a taxa de proteólise apresentou um aumento, sendo, no entanto, sempre inferior à verificada nos lotes 1 e 3. Assim, a taxa de proteólise observada para o lote 2 apresentou-se inferior (0,178 mM) aos restantes lotes.

O aumento considerável dos grupos α -amino livres que reagem com o reagente de TNBS observado a partir dos 20 dias de maturação, no lote 2, assim como observado nos outros lotes, pode ter ocorrido pela libertação de peptidases microbianas iniciais e não iniciais após a morte celular (Kuchroo *et al.*, 1983).

Em estudos descritos por Alexandraki and Moatsou (2018), utilizando o método do TNBS, em queijos pasteurizados, fabricados com leite de ovelha e com leite de mistura (ovelha e cabra), foi verificado que a concentração dos grupos α -amino livres aumentou durante o processo de maturação dos queijos (120 dias). Nos queijos de leite de ovelha, o grupo de investigação determinou concentrações de grupos α -amino livres entre 0,229 mM e 0,463 mM, e em queijos de leite de mistura foram verificadas concentrações entre 0,185 mM e 0,294 mM. Como as concentrações de grupos α -amino livres foram superiores às obtidas nos queijos dos três lotes em estudo, constata-se que os queijos analisados pelo autor sofreram maior proteólise, no entanto, estes resultados

só devem ser considerados para fins comparativos, uma vez que, a população microbiana difere (Pereira *et al.*, 2010).

Noutros trabalhos em queijos fabricados com leite de cabra cru, com um método de quantificação diferente (método de Kjeldahl), os resultados obtidos apresentaram a mesma tendência, tendo sido quantificado pelo método, um aumento das frações azotadas durante o processo de maturação (Bontinis *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2011). Além disso, o aumento da taxa de proteólise também foi verificado em queijos pasteurizados com leite de cabra, descrito pelos autores Kondyli *et al.*, (2016), Miloradovic *et al.*, (2017) e Tabet *et al.*, (2016).

Pelos vários resultados descritos, a extensão da taxa de proteólise nos queijos de cabra pode apresentar algumas diferenças. Assim a taxa de proteólise pode ser mais ou menos intensa dependendo de diversos fatores utilizados no fabrico dos queijos, podendo estar relacionados com o tipo de coalho, enzimas microbianas proteolíticas presentes em cada queijo, atividade enzimática das peptidases e proteases das BAL nativas, introdução de uma cultura iniciadora, tipo de alimentação dos animais produtores de leite, assim como, condições de maturação (pH, níveis de humidade, concentração de sal) (Bozoudi *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2011; Kondyli *et al.*, 2016; Tabet *et al.*, 2016). No entanto, os baixos valores de pH e humidade, os elevados teores de sal, limitam a atividade enzimática (Bontinis *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2011; Hayaloglu *et al.*, 2013; Miloradovic *et al.*, 2017).

Pelos fatores apresentados, a taxa de proteólise é mais intensa se a atividade enzimática não for comprometida. Assim sendo, quantos mais fatores interferirem na atividade das enzimas, menor será a proteólise nos queijos.

Este processo torna-se importante durante a maturação do queijo, uma vez que, está envolvido no desenvolvimento da textura do queijo, através da clivagem das caseínas, que causa alterações estruturais na matriz do queijo. Está também envolvido no desenvolvimento do sabor da maioria das variedades de queijo, pela formação de precursores (peptídeos mais curtos e aminoácidos livres) que posteriormente sofrem reações secundárias, pelo que, são convertidos em compostos voláteis associados ao sabor (Bontinis *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2018; Kongo *et al.*, 2009).

Em muitas variedades de queijo a hidrólise inicial das caseínas ocorre pela ação do coagulante, pela plasmina e por enzimas proteolíticas nativas do leite (Bontinis *et al.*, 2012; Galiou *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2011). Isto pode justificar a determinação de grupos α -amino livres nas amostras de leite de cabra cru (Figura 10).

A atividade destas enzimas origina peptídeos grandes e intermédios que são posteriormente degradados pelo coagulante, assim como, pelas proteinases e peptidases das BAL iniciais e não iniciais e pela microflora secundária (Bontinis *et al.*, 2012; Galiou *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2011; Kongo *et al.*, 2009). No entanto, as enzimas bacterianas têm um papel fundamental na hidrólise de peptídeos de baixo peso molecular em aminoácidos livres, uma vez que as enzimas coagulantes são incapazes de hidrolisar esses peptídeos em aminoácidos livres (Pereira *et al.*, 2010).

Assim ao longo da maturação, existe um sinergismo entre a ação das enzimas do coagulante e as enzimas bacterianas, uma vez que esta relação pode explicar o aumento de pequenos peptídeos, verificado ao longo da maturação do queijo (Pereira *et al.*, 2010). Desta forma, a partir dos resultados obtidos, foi possível verificar o aumento da concentração de grupos α -amino livres ao longo da maturação nos queijos dos vários lotes, resultantes da possível cooperação entre as enzimas coagulantes e bacterianas (Figura 10).

4.1.5 Avaliação de ácidos orgânicos existentes no leite e no queijo

A avaliação dos ácidos orgânicos é importante para estudos de sabor, por razões nutricionais, sendo também a sua determinação um indicador da atividade microbiana (Ball *et al.*, 2011; Bevilacqua and Califano, 1989; Marsili *et al.*, 1981; Pereira *et al.*, 2010). Além disso, a quantificação dos ácidos orgânicos e os seus perfis podem ser usados na classificação dos queijos relativamente à extensão da sua maturação (Pereira *et al.*, 2010).

Os ácidos orgânicos podem surgir nos produtos láteos, como resultado da hidrólise de ácidos gordos, pela adição direta de acidificantes (como são exemplos, os ácidos, cítrico, láctico e propiónico), pelos processos metabólicos normais dos animais, ou pelo crescimento microbiano (por exemplo, ácido pirúvico, láctico, acético e propiónico) (Bevilacqua and Califano, 1989; Marsili *et al.*, 1981). A produção de ácidos orgânicos através das BAL, assim como a produção de outros compostos, permitem melhorar a segurança e o prazo de validade dos alimentos (Abriouel *et al.*, 2008).

Nesta fase, a concentração dos ácidos orgânicos do leite de cabra cru e do queijo fabricado, com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, foram quantificados por deteção UV (220 nm), num HPLC a operar em modo isocrático. Este método é simples e rápido, apresentando como principais vantagens, a preparação das amostras, que é simples, pelo que a extração dos ácidos orgânicos ocorre de uma só vez. Outro aspeto positivo, é ser apenas necessário uma única coluna de HPLC para a determinação de diversos ácidos orgânicos (Bouzas *et al.*, 1991). O método permite monitorizar a atividade da

cultura inicial, entendendo o metabolismo microbiano, através da quantificação dos seus metabolitos, assim como, acompanhar as alterações de qualidade durante a maturação do queijo (Bevilacqua and Califano, 1989; Marsili *et al.*, 1981; Bouzas *et al.*, 1991). Além disso, esta técnica permite aos fabricantes de queijos decidirem quais os lotes de queijo ideais para venda imediata e quais os lotes de queijo que devem de sofrer uma maturação adicional (Bouzas *et al.*, 1991).

Assim para a identificação dos ácidos orgânicos nas amostras alvo, soluções padrões de ácido láctico, ácido propiônico, ácido acético, ácido cítrico e o ácido fórmico foram analisadas no HPLC para a determinação dos respetivos tempos de retenção. Adicionalmente foi injetada uma solução com a mistura de ácidos orgânicos para verificar se os ácidos orgânicos alteravam o seu tempo de retenção (Figura 11). Todos os ácidos orgânicos mantêm o seu tempo de retenção na mistura de ácidos orgânicos, exceto o ácido láctico (10,95 versus 11,02).

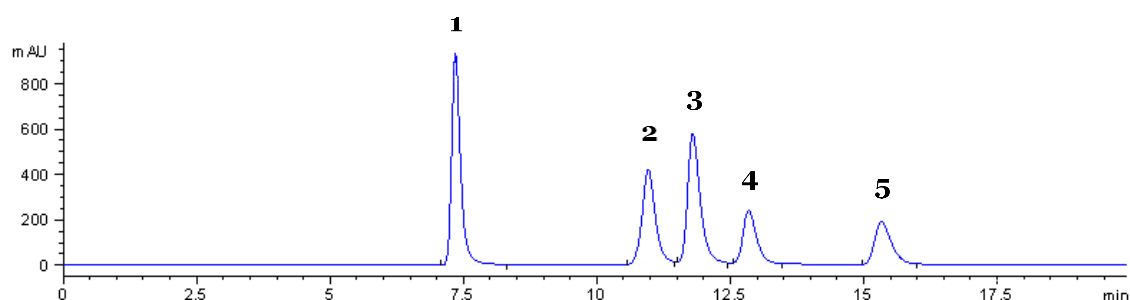


Figura 11: Cromatograma característico da mistura dos padrões de ácidos orgânicos a 2%. (1) ácido cítrico (7,3 min.); (2) ácido láctico (10,9 min.); (3) ácido fórmico (11,7 min.); (4) ácido acético (12,8 min.); (5) ácido propiônico (15,3 min.).

Considerando os tempos de retenção dos padrões dos ácidos orgânicos, foi possível identificá-los nas amostras alimentares, pelo que, a partir da curva de calibração de cada ácido, foi determinada a concentração dos ácidos existentes no leite e nos lotes de queijos.

Pelos resultados obtidos, como é mostrado na tabela 8 verificou-se que apenas os ácidos cítrico, láctico e acético existem nas amostras alimentares em valores quantificáveis, considerando que os restantes ácidos, também estejam presentes nos produtos lácteos, como verificado em trabalhos anteriores (Bouzas *et al.*, 1991; Jo *et al.*, 2018; Marsili *et al.*, 1981).

Pelas concentrações dos ácidos orgânicos determinadas aos longo da maturação do queijo, foi possível observar que o ácido cítrico foi determinado em todas as amostras de leites de todos os lotes, tendo sido verificado, um valor de 0,005%. Posteriormente,

este deixou de ser detetado no queijo, uma vez que aos 5 dias de maturação e a partir deste, não foi possível determinar mais a sua concentração, apresentando-se este em níveis indetetáveis pela metodologia usada.

Tabela 8: Valores das concentrações dos ácidos orgânicos determinados no leite de cabra cru e no queijo durante a maturação. Os resultados são expressos em % de ácido orgânico, apresentados como média \pm desvio padrão.

Ácidos Orgânicos (%)	Lt.	Leite	Tempo de maturação (dias)				
			5	10	20	31	45
Ácido Cítrico	1	0,005 (\pm 0,000)	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d
	2	0,005 (\pm 0,000)	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t
	3	0,005 (\pm 0,001)	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t	n.d ^t
Ácido Láctico	1	n.d ^t	0,087 (\pm 0,005)	0,095 (\pm 0,003)	0,162 (\pm 0,004)	0,110 (\pm 0,012)	n.d
	2	- (a)	- (a)	- (a)	0,085 (\pm 0,014)	0,110 (\pm 0,015)	0,088 (\pm 0,011)
	3	n.d ^t	0,059 (\pm 0,002)	0,084 (\pm 0,006)	0,103 (\pm 0,010)	0,123 (\pm 0,008)	0,148 (\pm 0,005)
Ácido Acético	1	n.d ^t	n.d ^t	0,013 (\pm 0,002)	0,027 (\pm 0,002)	0,042 (\pm 0,001)	n.d
	2	n.d ^t	- (a)	- (a)	0,010 (\pm 0,002)	0,013 (\pm 0,001)	0,012 (\pm 0,001)
	3	n.d ^t	- (a)	0,011 (\pm 0,001)	0,017 (\pm 0,000)	0,021 (\pm 0,001)	0,030 (\pm 0,002)

n.d: não determinado

n.d^t: não detetado pela metodologia

- (a) :detetável mas não quantificável (encontra-se abaixo do limite mínimo da reta de calibração)

Relativamente às concentrações do ácido láctico, estas apresentaram um aumento ao longo da maturação, tendo sido verificadas pequenas oscilações no lote 1 e 2. No entanto, só a amostra de leite do lote 2 é que apresentou valores detetáveis de ácido láctico, mas não quantificáveis. No lote 1, aos 20 dias de maturação, foram determinadas as concentrações mais altas, apresentando cerca de 0,162%, ocorrendo um pequeno decréscimo aos 31 dias (0,110% de ácido láctico). No lote 2, as maiores concentrações foram obtidas aos 31 dias de maturação, com 0,110%, tendo diminuído e apresentado uma concentração final foi de 0,088%. No lote 3, as concentrações deste ácido aumentaram em todo o processo de maturação do queijo, apresentando aos 45 dias de maturação uma concentração de 0,148%.

Perante os resultados apresentados, é possível concluir que o lote 3 foi o que apresentou maior concentração de ácido láctico no final da maturação dos queijos (45 dias de maturação). Adicionalmente, apesar de algumas oscilações existentes nas concentrações deste ácido ao longo da maturação, os valores de concentração de ácido

lático nos queijos são semelhantes nos lotes 1 e 3. O lote 2 apresenta valores inferiores aos verificados nos restantes lotes.

Pelos resultados apresentados foi possível verificar que as concentrações de ácido acético aumentam ligeiramente ao longo do processo de maturação. O lote 1 destacou-se dos restantes, uma vez que, foi o que apresentou o maior aumento de concentração de ácido acético ao longo da maturação do queijo com 0,042% de ácido. No lote 3, foi também verificado um aumento da concentração de ácido acético ao longo do tempo, terminando o processo de maturação com uma concentração de 0,030% de ácido.

Por conseguinte, o lote 2 apesar de ter apresentado valores detetáveis de ácido acético, estes não foram quantificáveis até aos 10 dias de maturação. Posteriormente a esta fase de maturação, a concentração de ácido acético foi quantificada, apresentando valores semelhantes até aos 45 dias de maturação (0,012% de ácido acético), concentração inferior à observada nos outros lotes.

À exceção do ácido cítrico, as concentrações dos ácidos orgânicos, lático e acético, aumentam ao longo do tempo de maturação. Esta tendência, também foi comprovada na literatura (Ayyash and Shah, 2010), num estudo onde avaliam a concentração destes ácidos durante o tempo de maturação (durante 56 dias de maturação) em queijos produzidos com leite de vaca pasteurizado. A produção desses ácidos é determinante na produção de compostos de sabor e de aroma para os queijos (Jo *et al.*, 2018).

O ácido lático pode contribuir no queijo, de diversas formas através da expulsão do soro da coalhada, diminuição do pH, nos estágios iniciais da maturação, formação de compostos aromatizantes através do seu metabolismo e contribui para a segurança e qualidade do queijo (Adams and Moss, 2008; Jo *et al.*, 2018; Marino *et al.*, 2003). Além disso, o aumento da concentração de ácido lático produzido pelas BAL, pode contribuir para a diminuição de grupos microbianos no interior do queijo. Assim, o aumento verificado na produção de ácido lático ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes, pode estar relacionada com o carácter fermentativo dos microrganismos (Widyastuti *et al.*, 2014; Adams and Moss, 2008; Pereira *et al.*, 2010).

O citrato pode ser utilizado como fonte de energia (Jo *et al.*, 2018). A maioria do ácido cítrico nativo do leite cru é perdido para o soro do leite, no entanto, o ácido cítrico que fica retido pode ser metabolizado em vários compostos aromatizantes, principalmente, ácido acético, 2,3-butanodiona (diacetil), e acetoína (Ayyash and Shah, 2010; Jo *et al.*, 2018). A informação anterior, justifica a diminuição do ácido cítrico verificada logo após os 5 dias de maturação do queijo (tabela 8).

A aumento da produção de ácido acético foi verificado ao longo da maturação do queijo (tabela 8). A sua produção devida ao metabolismo da lactose, metabolismo do citrato ou a partir do catabolismo dos aminoácidos contribui significativamente para o sabor final do queijo (Ayyash and Shah, 2010; Galiou *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2010).

No entanto, o conteúdo inicial de lactose pode ser o responsável pela variação dos dados relativamente aos ácidos orgânicos (Pereira *et al.*, 2010). Considera-se este o principal carboidrato no leite e a principal fonte de energia das bactérias, pelo que, é a partir do seu metabolismo que existe a produção de ácido láctico e de ácido acético (Widyastuti *et al.*, 2014; Farkye, 2003; Jo *et al.*, 2018). Deste modo, a análise dos resultados obtidos não deve ser em modo absoluto, mas de forma integrativa. Este fato justifica-se porque a carga microbiana e concentração de lactose inicial interfere na produção dos ácidos, assim como a microflora do queijo e o tipo de fermentação que as bactérias executam (homo ou heterofermentativa) (Pereira *et al.*, 2010). Também as técnicas de processamento, as temperaturas utilizadas, o tempo de maturação, e a época/estação de produção, podem influenciar os perfis dos ácidos orgânicos (Bozoudi *et al.*, 2018).

O aumento da produção de ácido láctico, pode relacionar-se com a diminuição dos valores de pH ao longo da maturação dos lotes analisados (Figura 12A). Este comportamento foi verificado em outros trabalhos (Zárate *et al.*, 1997). Além disso, a diminuição dos valores de pH está também relacionada com a produção de ácido acético (Figura 12B) (Adams and Moss, 2008). Assim os valores de pH e de ácidos orgânicos podem ser indicativos de uma acidificação bem-sucedida do queijo, devido à atividade microbiana das BAL (Tabet *et al.*, 2016).

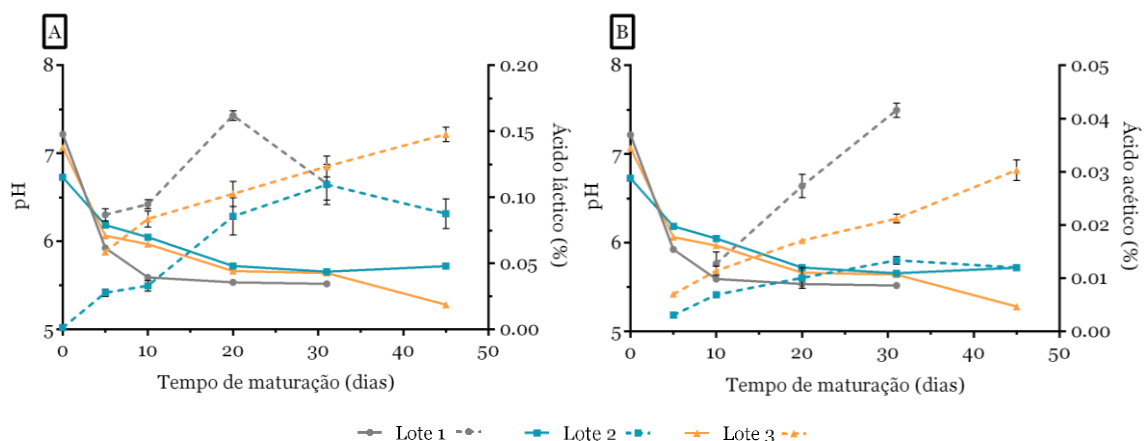


Figura 12: Relação entre os valores de pH (linhas a cheio) e a produção de ácidos orgânicos (linhas a tracejado - (A) ácido láctico e (B) ácido acético) dos queijos ao longo do processo de maturação. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.1.6 Análise reológica das amostras alimentares

A reologia alimentar é a ciência que estuda a deformação de sólidos e a fluidez dos líquidos através de forças mecânicas aplicadas (Silva and Costa, 2017). Nos alimentos, as variáveis mais importantes que influenciam os parâmetros reológicos são, a temperatura, a composição do alimento e as condições de processamento (Gabas *et al.*, 2012). Além destas variáveis, nos laticínios, o comportamento reológico pode ainda ser influenciado pela microestrutura, estabilidade do produto, propriedades organolépticas e qualidade da matéria-prima (Silva and Costa, 2017; Gabas *et al.*, 2012).

A composição do leite é determinante nas características reológicas dos produtos lácteos, sendo as proteínas (principalmente as caseínas) e a gordura os compostos que mais influenciam. Por conseguinte, estes compostos podem ser modificados por vários fatores, como tratamentos térmicos ou operações mecânicas, podendo dessa forma aumentar ou diminuir as características reológicas do leite e dos seus derivados (Silva and Costa, 2017). Determinadas condições e tratamentos, como acidez, teor de sal, tratamento térmico e ação de várias enzimas e bactérias, podem afetar a estabilidade da caseína que conseqüentemente, podem influenciar significativamente a viscosidade do leite. No queijo e em outros produtos lácteos, a maioria das suas propriedades reológicas/texturais dependem dos géis de caseína formados no leite, independente da sua origem (vaca, ovelha, cabra, etc) (Park, 2007).

Desta forma, a avaliação das características reológicas do leite e dos seus derivados, torna-se uma ferramenta analítica importante para avaliar a qualidade dos alimentos, como controlar a qualidade do produto final, pelo que, os seus parâmetros, estão diretamente relacionados com a aceitação do produto final pelos consumidores (Silva and Costa, 2017).

4.1.6.1 Reologia do leite de cabra cru

A reologia do leite é influenciada por sua viscosidade. A viscosidade (η) é a propriedade física de um líquido para resistir ao seu fluxo, que depende do atrito interno de um líquido e da relação entre o movimento cinético e a superfície livre (Park, 2007). A viscosidade condiciona a libertação do sabor, relativamente à sua percepção e na parte sensorial (Duhan *et al.*, 2018). Contudo, a viscosidade é afetada pelas concentrações e estado da gordura e das proteínas, pela temperatura, pH e idade do leite (Park, 2007).

O comportamento reológico do leite, geralmente exibe um comportamento newtoniano simples, por conseguinte o leite concentrado demonstra um comportamento pseudoplástico (não newtoniano) (Gabas *et al.*, 2012). O comportamento

pseudoplástico (comportamento de afinamento por cisalhamento) é caracterizado pela diminuição da viscosidade com taxas de cisalhamento crescentes (Laguna *et al.*, 2016).

Assim, de forma a avaliar o comportamento reológico do leite de cabra cru dos vários lotes, foram aplicadas taxas de deformação (taxas de cisalhamento) compreendidas entre $7,5 \text{ s}^{-1}$ e 150 s^{-1} . A partir do reograma obtido da análise dos leites de cabra cru dos três lotes, figura 13, foi possível determinar o comportamento reológico do leite, ou seja, o comportamento da sua viscosidade após a aplicação de taxas crescentes de deformação.

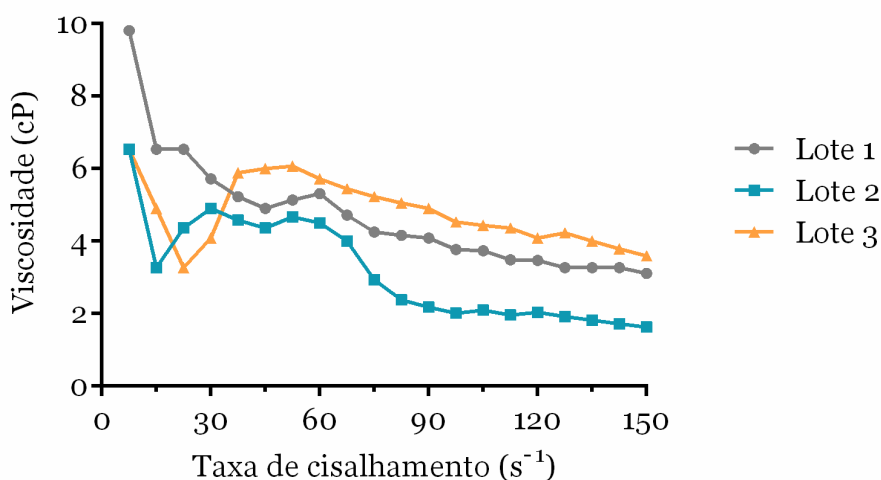


Figura 13: Comportamento da viscosidade dos leites de cabra cru, dos três lotes em estudo, após a aplicação de taxas crescentes de cisalhamento (entre $7,5 \text{ s}^{-1}$ e 150 s^{-1}).

Foi possível constatar que com uma taxa de cisalhamento de $7,5 \text{ s}^{-1}$, o leite do lote 1 foi o que apresentou uma viscosidade mais elevada ($\approx 10 \text{ cP}$), enquanto que os lotes 2 e 3 demonstraram ter uma viscosidade inferior, porém os lotes 2 e 3 apresentaram valores iguais, cerca de $6,54 \text{ cP}$. Com o aumento das taxas de cisalhamento aplicadas, a viscosidade dos leites tende a diminuir. Contudo, os lotes 2 e 3 apresentaram algumas oscilações no comportamento do fluxo do leite. No que diz respeito à viscosidade final apresentada pelas amostras de leite de cabra cru, após terem sofrido uma taxa de cisalhamento de 150 s^{-1} , os lotes 1 e 3 apresentaram uma viscosidade relativamente próxima.

As amostras de leite de cabra cru dos vários lotes apresentaram uma evolução similar, as quais se comportaram como fluidos não newtonianos, de natureza pseudoplástica (afinamento por cisalhamento), pelo facto da viscosidade diminuir com taxas de

cisalhamento crescentes (Laguna *et al.*, 2016). Deste modo, as viscosidades dos leites de cabra cru dependem das taxas de cisalhamentos aplicadas.

Em trabalhos anteriores, em leite de cabra pasteurizado com elevado teor de sólidos totais, após terem sido aplicadas taxas de cisalhamento num intervalo compreendido entre 16 – 360 s⁻¹, o leite exibiu um comportamento não newtoniano, para qualquer tipo de temperatura testada. Este comportamento pode ser atribuído devido à presença de gordura, proteínas e outras moléculas complexas (Gabas *et al.*, 2012).

Laguna e seus colaboradores (2016) no seu trabalho, em leite de vaca comercializado, após a aplicação de taxas de cisalhamento de 0,01 e 100 s⁻¹ verificaram que a viscosidade diminuiu após taxas de cisalhamento crescentes, mostrando um comportamento de afinamento por cisalhamento. Este comportamento está de acordo com o observado nos leites de cabra cru dos vários lotes.

A diminuição da viscosidade com o aumento das taxas de cisalhamento, poderá ocorrer devido à redução da resistência do fluido da matriz do leite ao seu fluxo. Este comportamento de afinamento por cisalhamento (comportamento pseudoplástico) é comum para materiais biológicos ricos em gordura (Duhan *et al.*, 2018).

Como descritos pelos vários autores, o comportamento pseudoplástico da viscosidade, verificado nas amostras de leite de cabra cru dos vários lotes, pode derivar da composição do leite (gordura e proteína) como pela diminuição da resistência da matriz do leite ao seu fluxo.

4.1.6.2 Reologia do queijo de cabra cru

A reologia do queijo (textura), tem um papel importante na qualidade do queijo, sendo que várias propriedades texturais podem ser medidas (Park, 2007).

Os resultados da dureza e adesividade do queijo de cabra, foram avaliados ao longo do processo de maturação nos dias 5, 10, 20, 31 e 45, relativamente às suas partes externas e internas, apresentados na figura 14. Os resultados da dureza e adesividade, foram obtidos através da compressão da amostra até 50 % da sua altura inicial a uma velocidade de 1,0 mm/s.

Observando os resultados obtidos da textura do exterior do queijo, relativamente à sua dureza, a parte externa apresenta uma dureza superior relativamente ao seu interior, observado em todos os lotes. No entanto, foram encontradas diferenças na dureza externa do queijo entre os vários lotes (Figura 14A).

Foi observado que no lote 1 (4,66 N e 1,62 N) e no lote 2 (9,5 N e 7,27 N), a dureza dos queijos diminuiu ao longo do tempo de maturação, ao contrário do lote 3 (6,15 N e 7,75 N) que apresentou um aumento da dureza do queijo.

Relativamente à dureza do interior dos queijos, foi inferior à determinada na parte externa dos queijos. A sua evolução ao longo do processo de maturação, apresentou oscilações, não sendo possível observar a sua tendência (Figura 14B). No entanto, é possível observar que a dureza final é inferior à dureza inicial observada no lote 1 (2,73 N e 1,31 N) e no lote 2 (3,99 N e 3,07 N). Por conseguinte, foi verificado o contrário no lote 3, obtendo queijos com uma pasta mais dura, com valores a variar entre 3,57 N aos 5 dias de maturação e 5,39 N ao fim de 45 dias de maturação.

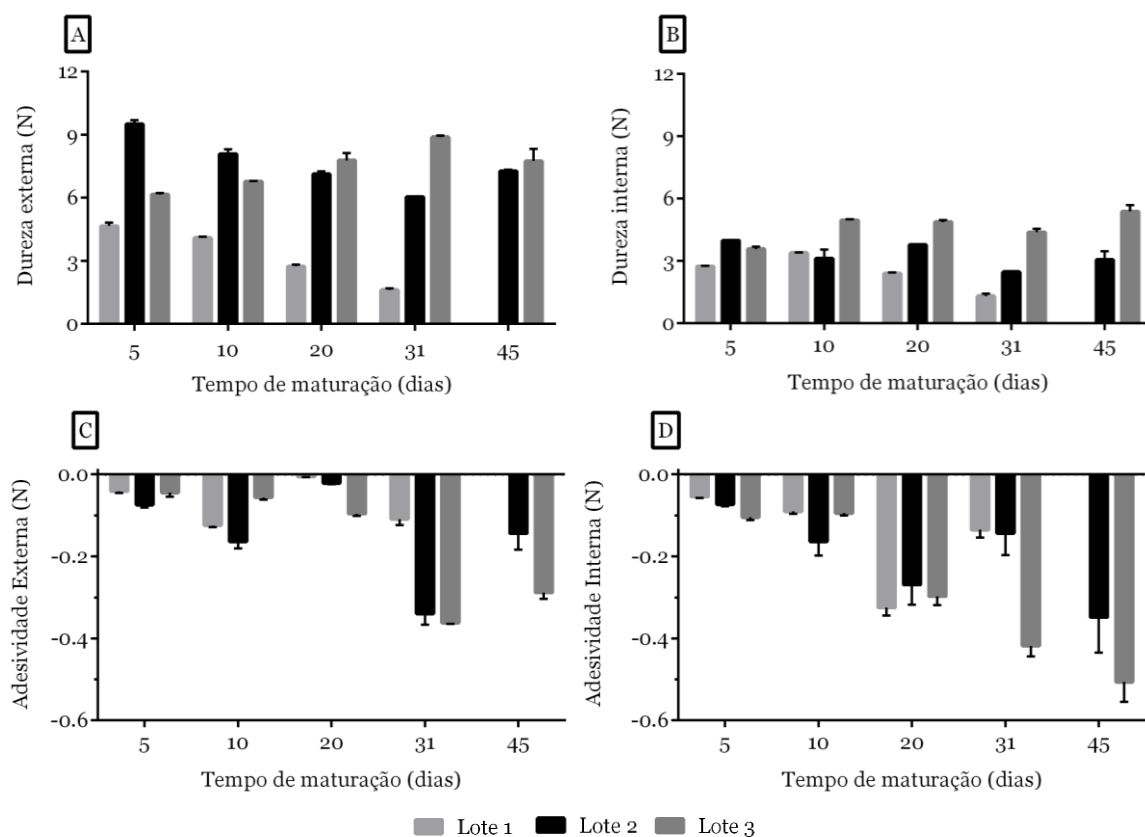


Figura 14: Propriedades da textura do queijo de cabra, avaliados ao longo do processo de maturação em cada lote (1,2 e 3), sendo (A) Dureza externa, (B) Dureza interna, (C) Adesividade externa, (D) Adesividade interna). Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

A adesividade inicial da parte externa dos queijos dos vários lotes (Figura 14C), aos 5 dias de maturação apresentou resultados semelhantes. No geral, foi observado, em todos os lotes, um aumento da adesividade da parte externa do queijo à sonda até aos 31 dias de maturação, lote 1 (-0,04 N e -0,11 N), lote 2 (-0,07 N e -0,34 N) e lote 3 (-

0,04 N e -0,36 N), contudo, a partir dos 20 dias de maturação verificou-se uma oscilação dos seus valores.

Relativamente à adesividade da parte interna dos queijos (Figura 14D), também apresentou a mesma tendência observada na parte externa dos queijos, ao longo da maturação. No entanto, no lote 1 apresentou uma ligeira diminuição da adesividade aos 31 dias, tendo nesta mesma fase de maturação o lote 2 apresentado uma oscilação dos seus valores. Nos resultados obtidos da adesividade da parte interna dos queijos, foi verificado que os três lotes apresentaram valores muito semelhantes aos observados na parte externa dos queijos no início da maturação, verificado no lote 1 (-0,05 N) e no lote 2 (-0,07 N). No lote 3, o queijo apresentou uma adesividade superior à verificada na parte externa do queijo (-0,10 N). Porém, durante o processo de maturação a adesividade da parte interna dos queijos dos vários lotes em estudo, apresentou valores superiores relativamente à parte externa. No final do tempo de maturação observou-se que os queijos do lote 3, apresentavam uma adesividade superior (-0,51 N), tendo o lote 1 exibido adesividade inferior (-0,14 N). É importante ter em conta que o tempo de maturação do lote 1 foi de apenas 31 dias.

As oscilações observadas nas medições da adesividade do queijo, poderão resultar da existência de pequenos buracos no queijo, resultando num menor impacto entre o queijo e a sonda, ocorrendo uma redução da aderência à sonda. Por conseguinte e segundo Kinik e seus colaboradores (2017), a adesividade das amostras de queijo fabricado com leite de cabra pasteurizado, tende a aumentar durante o processo de maturação, fundamentando o seu comportamento pelo aumento da capacidade de retenção de água das proteínas resultante da proteólise.

Foi possível durante a análise da textura observar, que, com o avanço do tempo de maturação, as amostras de queijo tornaram-se mais quebradiças, provavelmente devido à atividade proteolítica ocorrida durante esse processo, que afeta a estabilidade da matriz proteica, e o estado das amostras pode ter sido influenciado pelo teor de humidade, uma vez que é importante ter um determinado teor de humidade que permita a ligar à rede de caseínas de forma a manter uma boa textura do queijo (Zhao *et al.*, 2019). Assim sendo, a atividade proteolítica e o teor de humidade poderão justificar as oscilações observadas durante a análise da textura dos queijos.

Em suma, os parâmetros de textura analisados no interior e no exterior dos queijos apresentaram um comportamento igual, embora os valores registados tenham sido diferentes resultantes das condições/composição distintas existentes entre o interior e o exterior do queijo. Assim sendo, a textura do queijo pode ser quantificada usando

métodos reológicos que medem a resposta a pequenas ou grandes deformações do queijo, contudo a sua avaliação pode ser influenciada pelo tipo de teste selecionado, os parâmetros do teste, pela composição do queijo e tempo de maturação (Hekken *et al.*, 2004; Togay *et al.*, 2017).

Em trabalhos anteriores, os queijos fabricados majoritariamente por leite de cabra cru com idades compreendidas entre 6 e 12 meses, os autores verificaram uma grande variabilidade nos valores de dureza, entre 0,71 N e 6,54 N, consequência da composição dos queijos e tempo de maturação, como justifica o autor Togay *et al.*, (2017).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com o trabalho desenvolvido por Delgado e seus colaboradores (2010), em queijo fabricado com leite de ovelha cru, tendo verificado uma diminuição da dureza e um aumento da adesividade ao durante o processo de maturação. As alterações foram explicadas pela perda progressiva de humidade e principalmente pela elevada atividade proteolítica, tornando a pasta do queijo mais suave. Por conseguinte, a relação entre as propriedades da textura e a atividade proteolítica podem indicar a degradação/alteração da matriz proteica, resultante da proteólise, causando assim, uma diminuindo da dureza e um aumento da adesividade do queijo (Delgado *et al.*, 2010). Também em queijos de leite de cabra pasteurizado, foi verificada uma diminuição da dureza durante o processo de maturação (Hekken *et al.*, 2004).

No trabalho desenvolvido por Kinik, *et al.*, (2017), os autores verificaram maior dureza do queijo no início do processo de maturação, apresentando uma textura emborrachada, causada pela ausência de proteólise. No entanto, ao longo da maturação foi verificado o amolecimento do queijo, sendo este fato justificado pelo aumento da atividade proteolítica causada pela ação das enzimas proteolíticas produzidas pelas BAL. Além disso, o aumento da adesividade verificada ao longo do tempo também foi fundamentada pela atividade proteolítica ocorrida.

Assim sendo, pela análise da atividade proteolítica (Figura 10) constata-se que durante a maturação do queijo houve um aumento, interferindo assim na estabilidade da matriz proteica, causando uma diminuição da dureza dos queijos. Deste modo, a atividade proteolítica pode justificar a diminuição da dureza dos queijos do lote 1 e 2 ao longo do tempo de maturação, assim como justificar o aumento da adesividade dos queijos dos vários lotes. Tendo em conta que todos os lotes apresentam um comportamento similar quando realizada a avaliação dos parâmetros físico químicos, os dados obtidos da dureza no lote 3 são incongruentes, dessa forma, um fator externo poderia ter

interferido na análise da dureza, suspeitando ser derivado da temperatura das amostras (inferiores à temperatura ambiente).

Para além da atividade proteolítica, outros fatores podem afetar a textura dos queijos durante o processo de maturação, como: humidade, teor de sal, composição do leite, variedade e composição dos queijos, o pH, teor de gordura, e o tempo de maturação dos queijos (Alvarenga *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2011; Miloradovic *et al.*, 2017; Togay *et al.*, 2017; Zheng, *et al.*, 2016).

Em relação ao contributo do pH na textura dos queijos, foi descrito por McSweeney, (2004), queijos com pH mais elevados são considerados mais macios em comparação a queijos com um pH mais ácido. Por outro lado, o teor proteico do queijo pode influenciar a dureza do mesmo, uma vez que, um teor proteico elevado permite caracterizar o queijo como mais duro, permitindo assim a formação de uma matriz proteica mais compacta e granular do queijo, originando uma microestrutura das redes de proteínas mais densa e ramificada (Shiota *et al.*, 2015). Desse modo, o teor de proteína, gordura e humidade são os três principais constituintes do queijo que afetam diretamente as propriedades texturais e funcionais do queijo (Zheng, *et al.*, 2016).

4.1.7 Avaliação da cor dos queijos

A cor do queijo é dos primeiros atributos sensoriais apercebidos pelo consumidor, antes da sua compra ou do seu consumo e dessa forma torna-se uma característica importante do queijo que deve ser avaliada (Ariceaga *et al.*, 2019).

Nos três lotes em estudo, durante o processo de maturação, foram observadas alterações na cor dos queijos de cabra cru. Essas alterações da cor foram medidas através do colorímetro, na zona externa e interna dos queijos, sendo que na zona externa foi evidente a alteração da cor do queijo (Figura 15).

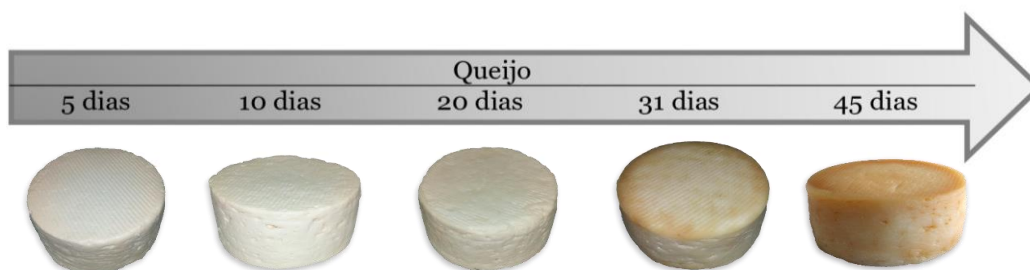


Figura 15: Exemplo das alterações da cor do exterior no queijo de cabra.

A partir da análise instrumental da cor do queijo de cabra, utilizando o sistema de coordenadas cartesianas do espaço de cores CIE, foi possível determinar os valores de L^* , a^* e b^* , correspondentes à luminosidade, e a cores opostas (Figura 7). Assim, a determinação da cor foi avaliada a partir de zonas aleatórias da superfície e do interior dos queijos com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, de cada lote. Os resultados encontram-se na tabela 9.

Relativamente aos resultados obtidos no parâmetro de luminosidade (L^*), no geral, ao longo da maturação do queijo dos três lotes, os valores determinados no interior dos queijos foram superiores aos valores de L^* observados no seu exterior. Além disso, os valores de L^* do exterior dos queijos revelaram uma diminuição durante o processo de maturação, indicando por isso, um ligeiro escurecimento da parte externa do queijo. No geral, as amostras de queijo mostraram elevados valores de L^* , próximos do limite máximo da escala (100), revelando elevada luminosidade dos queijos. Relacionando o tempo de maturação com este parâmetro, foi verificado que, a maturação não causou um efeito claro na luminosidade do interior e exterior dos queijos, uma vez que os valores obtidos neste parâmetro foram próximos uns dos outros. Também Fernandes e seus colaboradores (2018) no seu trabalho constataram, que o tempo de maturação não manifestou diferenças claras na luminosidade, além disso a luminosidade do interior e exterior dos queijos de leite de cabra cru obtida foi elevada, contudo, os valores obtidos foram inferiores aos apresentados na tabela 9. Contrariamente noutros estudos, em queijos fabricado com leite de cabra cru, o parâmetro de cor L^* apresentou um aumento durante a maturação (Delgado *et al.*, 2011). Desta forma, os valores determinados pelo autor foram superiores relativamente aos resultados obtidos nos queijos dos vários lotes.

Os elevados valores obtidos de L^* podem ser explicados pelo efeito brilhante, causado pela camada gordurosa superficial do queijo (Fernandes *et al.*, 2018). Por conseguinte, queijos com cor branca mais intensa (elevados valores de L^*) resultam provavelmente como consequência do tamanho reduzido do diâmetro dos glóbulos de gordura do leite de cabra (3,5 μm no leite de cabra vs 4,5 μm no leite de vaca) (Medeiros *et al.*, 2013). Estes fatores podem de certa forma, ter influenciado os valores elevados de luminosidade (L^*) obtidos nos queijos de cabra cru dos vários lotes.

Tabela 9: Parâmetros da cor relativos à superfície e ao interior do queijo de cabra cru, verificados durante o processo de maturação, dos três lotes em estudo. Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Tempo de maturação	Lote	L * (luminosidade)		a * (vermelho)		b * (amarelo)	
		interior	exterior	interior	exterior	interior	exterior
Dia 5	1	94,12 \pm 1,67	93,90 \pm 0,50	0,01 \pm 0,21	0,17 \pm 0,02	8,03 \pm 0,91	8,44 \pm 0,38
	2	95,56 \pm 1,17	95,65 \pm 0,70	-0,27 \pm 0,15	0,13 \pm 0,05	8,44 \pm 0,40	8,41 \pm 0,02
	3	96,36 \pm 0,75	94,80 \pm 0,16	-0,79 \pm 0,09	-0,45 \pm 0,11	9,76 \pm 0,62	8,93 \pm 0,26
Dia 10	1	94,77 \pm 0,46	93,49 \pm 2,38	-0,02 \pm 0,08	-0,15 \pm 0,20	8,14 \pm 0,37	10,78 \pm 2,17
	2	93,58 \pm 1,06	93,48 \pm 2,93	-0,40 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,05	8,00 \pm 0,11	9,29 \pm 0,16
	3	98,12 \pm 0,90	94,89 \pm 0,63	-0,89 \pm 0,08	-0,56 \pm 0,08	10,55 \pm 0,38	10,53 \pm 0,15
Dia 20	1	93,83 \pm 0,47	81,22 \pm 1,16	-1,20 \pm 0,05	1,78 \pm 0,40	10,65 \pm 0,36	14,93 \pm 0,63
	2	91,82 \pm 0,17	86,86 \pm 0,51	-0,41 \pm 0,12	0,54 \pm 0,08	9,06 \pm 0,68	13,76 \pm 1,70
	3	96,88 \pm 0,54	89,65 \pm 0,58	-1,56 \pm 0,15	-0,97 \pm 0,14	13,94 \pm 0,76	13,09 \pm 0,89
Dia 31	1	92,76 \pm 0,87	83,34 \pm 1,39	-0,90 \pm 0,10	2,07 \pm 0,28	9,35 \pm 1,19	9,93 \pm 1,10
	2	94,81 \pm 1,44	81,07 \pm 0,46	-1,11 \pm 0,38	3,24 \pm 0,52	11,58 \pm 1,25	14,97 \pm 0,22
	3	93,56 \pm 0,66	89,16 \pm 0,46	-1,44 \pm 0,07	-1,13 \pm 0,09	13,50 \pm 0,27	15,59 \pm 0,85
Dia 45	1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	2	92,36 \pm 0,17	83,47 \pm 0,42	-1,18 \pm 0,32	1,87 \pm 0,11	11,59 \pm 0,68	17,12 \pm 0,88
	3	92,69 \pm 0,47	81,38 \pm 0,44	-1,15 \pm 0,06	1,35 \pm 0,11	10,03 \pm 0,31	14,19 \pm 0,67

n.d: não determinado

Na determinação da cor durante a maturação dos queijos, os valores da componente b^* nos três lotes, apresentaram valores do exterior do queijo superiores, comparativamente aos valores de b^* do seu interior. Por outro lado, o comportamento deste parâmetro ao longo do processo de maturação, ocorreu de igual forma, no interior e no exterior do queijo, tendo aumentado os seus valores ao longo do processo de maturação e a coordenada de cor b^* , assumiu valores positivos, querendo isto dizer que, houve uma predominância da tonalidade amarela para ambas as zonas.

As diferenças observadas entre o interior e o exterior do queijo, também foram verificadas por outros autores, em queijo de leite de cabra cru, tendo de igual forma assumido valores positivos para o parâmetro de cor b^* , pelo que, o aumento verificado foi induzido pelo processo de maturação do queijo (Fernandes *et al.*, 2018). Por conseguinte, os resultados foram ligeiramente superiores aos determinados neste trabalho.

No trabalho desenvolvido por Togay *et al.*, (2017), em queijos produzidos maioritariamente por leite de cabra cru com idades compreendidas entre 6 e 12 meses, os valores do parâmetro de cor b^* determinados estavam entre 7,70 e 18,62.

Contrariamente, Delgado e seus co-autores (2011) verificaram no seu trabalho uma diminuição dos valores de cor b^* , na parte externa dos queijos, obtendo assim uma coloração mais esbranquiçada, tendo sido determinado valor de 0,81 ao final do tempo de maturação, cor típica dos queijos Ibores, produzidos com leite de cabra cru.

Em estudos realizados, foi verificado que valores de cor b^* superiores foram correlacionados com queijos mais gordurosos (Togay *et al.*, 2017). Por outro lado, a tonalidade amarela observada nos queijos (valores de b^* elevados) derivava provavelmente da conversão total de β -caroteno em vitamina A, que ocorre no metabolismo das cabras (Medeiros *et al.*, 2013). Além disso, o aumento dos valores do parâmetro b^* , pode ser devido ao efeito de escurecimento, típico na maturação dos queijos (Fernandes *et al.*, 2018). Isto pode justificar o aumento verificado dos valores de cor b^* observados nas zonas internas e externas ao longo do processo de maturação, dos queijos fabricados com leite de cabra cru dos vários lotes.

Os valores da componente a^* apresentaram tendências diferentes comparativamente ao interior e ao exterior dos queijos. No interior dos queijos, a coordenada de cor a^* , assumiu valores negativos (cor verde), tendo-se observado um crescimento negativo durante o processo de maturação. No entanto, no lote 1, os valores negativos só foram observados a partir dos 10 dias de maturação. Por sua vez, a coordenada de cor a^* , no exterior dos queijos, no geral, apresentou valores positivos (cor vermelha), tendo sido

verificado um aumento dos valores ao longo o processo de maturação, com exceção do lote 3. Neste lote, foram determinados valores de a^* negativos até aos 31 dias de maturação, por conseguinte, no final do tempo de maturação foram observados valores de a^* positivos. De acordo, com o observado, os valores do parâmetro de cor a^* estavam próximos de zero, esta evidência indica que, as amostras apresentaram uma cor insignificante esverdeada ($- a^*$) e avermelhada ($+ a^*$) (Fernandes *et al.*, 2018). Assim sendo, pode-se concluir que o processo de maturação dos queijos dos vários lotes, induziu o aumento do parâmetro de cor a^* , apresentando tendências para valores mais positivos (zona externa) ou para valores mais negativos (zona interna).

Em trabalhos anteriores, na análise do parâmetro de cor a^* da zona externa do queijo produzido com leite de cabra cru, foi observada a mesma tendência ao longo da maturação e os valores obtidos foram próximos de zero, apresentando como valores finais 0,76 (Delgado *et al.*, 2011). Porém, em queijos produzidos maioritariamente por leite de cabra cru com idades compreendidas entre 6 e 12 meses (Togay *et al.*, 2017) ou em queijos fabricados com leite de ovelha cru (Aktypis *et al.*, 2018), os resultados obtidos pelos autores do parâmetro de cor a^* da parte externa dos queijos foram negativos comparativamente aos obtidos observados neste estudo, do mesmo modo, também foi verificado no trabalho desenvolvido por Fernandes *et al.*, (2018), em queijo produzido com leite de cabra cru, por conseguinte, neste trabalho os valores de cor a^* obtidos pelo autor na parte interna do queijo, foram mais negativos ($\geq - 4$) relativamente aos verificados neste trabalho, para todos os queijos dos vários lotes.

Em suma, os queijos de cabra cru dos três lotes em estudos, no final do tempo de maturação revelaram ter uma coloração mais amarelada no exterior do que no interior, contudo menos luminosa. Relativamente aos registos dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , durante o processo de maturação dos queijos foram observadas mudanças dos mesmos, contudo a coordenada de cor a^* , foi o parâmetro que mais diferenças apresentou, relativamente aos resultados obtidos nos diferentes lotes, para o exterior do queijo. No entanto, nas coordenadas que melhor descrevem a cor dos queijos, L^* e b^* , uma vez que o parâmetro da cor a^* apresentou cores insignificantes (próximas de zero), não foram verificadas muitas diferenças entre lotes (Tabela 9).

Assim, foi possível constatar que a parte externa do queijo do lote 2 comparativa aos outros queijos dos outros lotes, demonstrou ser o queijo com mais luminosidade (L^*), tonalidade mais amarela (b^* positivo) e demonstrou ter tendências para cores mais vermelhas (a^* positivo), apesar destes valores do parâmetro a^* terem sido próximos de zero. Além disso na parte interna o queijo do lote 2 também demonstrou ter mais tonalidade amarela e tendências para cores mais vermelhas (a^* positivo), ainda que

próximas de zero, por conseguinte, o queijo que demonstrou mais luminosidade interna foi o do lote 1.

O facto de a zona escolhida para a determinação da cor dos queijos, ser uma zona aleatória da superfície e do interior do queijo, permite que haja uma variabilidade de resultados, uma vez que a formação da cor no queijo, não ocorre de forma homogénea, existindo por isso zonas com diferentes tonalidades, como foi possível observar pela figura 15, representativa da parte externa do queijo.

No entanto, vários são os fatores que podem afetar a cor dos queijos. As diferenças de cor encontradas nos queijos, podem derivar da perda de humidade durante a maturação dos queijos, como, pela contração da matriz proteica com perda de água (Jo *et al.*, 2018). Além disso outros fatores como, a microflora nativa, diferenças no processo de fabrico, condições de maturação e armazenamento podem influenciar a cor final do queijo (Ariceaga *et al.*, 2019).

4.2 Avaliação da evolução das populações microbiológicas existentes no leite cru e no queijo durante o processo de maturação

Como o leite cru, apresenta condições ótimas para o crescimento de microrganismos, nele podem proliferar microrganismos indesejáveis, como os microrganismos associados à deterioração, assim como, os patogénicos (D'amico, 2014; Adams and Moss, 2008; Montel *et al.*, 2014; Tirloni *et al.*, 2014). No entanto, este possui também diversos microrganismos que podem ser benéficos, contribuindo de forma positiva, para o desenvolvimento do produto, e tendo relevância para as características organolépticas, a conservação, a qualidade e a segurança do produto (Adams and Moss, 2008; Yoon *et al.*, 2016). Desta forma, as condições de manuseamento do leite, como de processamento e maturação de queijo originam mudanças no equilíbrio e na dinâmica microbiana (Montel *et al.*, 2014).

Portanto, o controlo das comunidades microbianas durante o fabrico e a maturação dos queijos, é o principal fator para garantir a segurança alimentar, mas também a qualidade do produto, tal como as propriedades sensoriais do produto final (Gonçalves *et al.*, 2018). Assim, neste trabalho, procedeu-se a uma caracterização microbiológica do produto, desde o leite cru até ao queijo maturado, quantificando bactérias mesofílicas totais aeróbias, bactérias psicrotróficas aeróbias, lactobacilos, lactococos, enterococos, *Pseudomonas* spp., enterobactérias, estafilococos, e leveduras e bolores, em leite de cabra cru e em queijo fabricado com este leite, com 5, 10, 20, 31 e 45 dias de maturação, em três lotes distintos.

Os resultados das análises microbiológicas realizadas em diferentes meios de cultura, permitiram obter dados quantitativos sobre a composição microbiológica do leite e dos queijos, durante os processos de produção e maturação. A partir da tabela 10 é possível observar que as populações microbianas dos lotes em estudo, apresentam algumas diferenças entre si, relativamente à dinâmica microbiana verificada durante o fabrico e maturação dos queijos, mas também quanto à população inicial existente no leite.

Estas diferenças observadas seriam expectáveis, uma vez que a produção de queijos de cabra a partir de leite cru, contam apenas com a composição microbiana nativa do leite cru e do ambiente de processamento. No entanto, a ausência de padronização existente no leite cru, permite desenvolver uma dinâmica microbiana distinta o que pode levar a um produto final com características diferentes (Montel *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2011). Relativamente ao lote 1 e de forma generalizada, o leite de cabra cru apresenta uma flora microbiana mais reduzida relativamente aos outros lotes, quer sejam microrganismos benéficos ou não, para o queijo. Além disso, é de recordar que este lote sofreu um tempo de maturação inferior relativamente aos lotes 2 e 3.

Assim é possível observar uma dinâmica microbiana desde o processamento do leite de cabra cru até ao queijo maduro, que pode ter um contributo positivo ou negativo na maturação do queijo.

A contagem de bactérias mesofílicas cultiváveis em amostras de leite cru, permite avaliar a qualidade e o nível de higiene do leite cru e pasteurizado (Duarte *et al.*, 2020; Ercolini *et al.*, 2009; Faccia *et al.*, 2015; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Marino *et al.*, 2003).

Pelos critérios de higiene estabelecidos pela legislação europeia aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal (Regulamento CE N^o 853/2004), as contagens de bactérias mesofílicas totais aeróbias em placas a 30°C em leite de cabra cru, devem ser inferiores a $1,5 \times 10^6$ ufc/mL, deste modo, é possível concluir, que a qualidade microbiológica do leite de cabra cru utilizado no lote 1 era satisfatório, uma vez que as suas contagens estavam dentro do intervalo permitido por lei. Noutros trabalhos realizados, os leites de cabra cru (Faccia *et al.*, 2015; Picon *et al.*, 2019; Pino *et al.*, 2018; Tabet *et al.*, 2016) também foram bem definidos, os quais apresentaram contagens de bactérias mesofílicas, entre 10^3 ufc/mL e 10^6 ufc/mL. O mesmo não foi verificado para os lotes 2 e 3 onde a contagem de mesófilos ultrapassou os valores limites. Esta observação também foi constada pelo autor Pino *et al.*, (2018) no seu estudo, realizado em leite de cabra cru, tendo apresentado contagens entre 10^7 ufc/mL e 10^8 ufc/mL.

Tabela 10: Avaliação microbiológica do leite de cabra cru e do queijo de cabra, ao longo do processo de maturação, em três lotes (\log_{10} ufc/mL de leite ou \log_{10} ufc/g de queijo). Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Microrganismos	Lotes	Leite	Tempo de maturação (dias)				
			5	10	20	31	45
Bactérias mesofílicas totais aeróbias	1	4,73 \pm 0,03	8,72 \pm 0,01	9,15 \pm 0,06	8,64 \pm 0,01	9,09 \pm 0,02	n.d
	2	7,95 \pm 0,03	8,18 \pm 0,06	8,26 \pm 0,02	9,32 \pm 0,30	10,53 \pm 0,03	9,13 \pm 0,01
	3	7,61 \pm 0,06	9,12 \pm 0,03	8,94 \pm 0,00	9,47 \pm 0,12	10,10 \pm 0,74	9,03 \pm 0,04
Bactérias psicrotróficas aeróbias	1	4,57 \pm 0,17	8,35 \pm 0,01	7,87 \pm 0,05	8,33 \pm 0,01	8,90 \pm 0,02	n.d
	2	8,25 \pm 0,03	8,28 \pm 0,00	8,29 \pm 0,04	8,92 \pm 0,04	9,13 \pm 0,01	7,85 \pm 0,01
	3	7,48 \pm 0,04	8,39 \pm 0,03	8,81 \pm 0,01	9,16 \pm 0,01	9,46 \pm 0,35	8,17 \pm 0,01
Lactobacilos	1	3,87 \pm 0,06	8,32 \pm 0,03	8,88 \pm 0,05	8,37 \pm 0,04	8,36 \pm 0,04	n.d
	2	6,37 \pm 0,30	7,54 \pm 0,21	7,96 \pm 0,04	9,05 \pm 0,03	9,48 \pm 0,18	8,87 \pm 0,05
	3	5,44 \pm 0,20	8,56 \pm 0,06	8,51 \pm 0,06	9,20 \pm 0,00	9,21 \pm 0,07	9,05 \pm 0,01
Lactococos	1	4,55 \pm 0,01	8,74 \pm 0,06	8,96 \pm 0,10	8,70 \pm 0,04	8,68 \pm 0,05	n.d
	2	7,76 \pm 0,12	8,08 \pm 0,00	8,16 \pm 0,14	9,11 \pm 0,11	9,52 \pm 0,20	9,08 \pm 0,06
	3	6,69 \pm 0,05	8,79 \pm 0,00	8,73 \pm 0,03	9,30 \pm 0,03	9,20 \pm 0,06	9,16 \pm 0,23
Enterococos	1	2,99 \pm 0,13	7,00 \pm 0,06	6,86 \pm 0,00	7,81 \pm 0,12	7,79 \pm 0,08	n.d
	2	5,00 \pm 0,04	6,10 \pm 0,06	6,64 \pm 0,01	8,45 \pm 0,13	8,88 \pm 0,01	7,40 \pm 0,00
	3	5,09 \pm 0,01	7,55 \pm 0,03	7,82 \pm 0,41	8,10 \pm 0,01	8,56 \pm 0,19	8,26 \pm 0,02

n.d: não determinado

Tabela 11 (continuação): Avaliação microbiológica do leite de cabra cru e do queijo de cabra, ao longo do processo de maturação, em três lotes (\log_{10} ufc/mL de leite ou \log_{10} ufc/g de queijo). Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Microrganismos	Lote	Leite	Tempo de maturação (dias)				
			5	10	20	31	45
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	4,26 \pm 0,04	8,26 \pm 0,04	7,56 \pm 0,07	7,63 \pm 0,01	8,46 \pm 0,06	n.d
	2	7,55 \pm 0,01	7,12 \pm 0,50	6,99 \pm 0,04	5,42 \pm 0,16	4,66 \pm 0,04	4,43 \pm 0,37
	3	5,43 \pm 0,07	6,62 \pm 0,04	6,19 \pm 0,01	6,04 \pm 0,08	4,87 \pm 0,03	4,32 \pm 0,07
Enterobactérias	1	3,21 \pm 0,08	7,17 \pm 0,01	7,03 \pm 0,01	7,70 \pm 0,09	8,70 \pm 0,00	n.d
	2	5,74 \pm 0,11	4,78 \pm 0,08	4,64 \pm 0,02	4,05 \pm 0,01	4,41 \pm 0,16	3,48 \pm 0,00
	3	3,96 \pm 0,10	6,36 \pm 0,22	6,37 \pm 0,04	5,70 \pm 0,11	4,54 \pm 0,04	3,88 \pm 0,02
Estafilococos	1	3,71 \pm 0,08	6,31 \pm 0,07	6,59 \pm 0,01	6,95 \pm 0,04	6,80 \pm 0,02	n.d
	2	5,22 \pm 0,02	6,05 \pm 0,01	6,29 \pm 0,05	6,98 \pm 0,01	6,97 \pm 0,02	7,70 \pm 0,09
	3	5,22 \pm 0,01	7,26 \pm 0,00	7,66 \pm 0,41	7,59 \pm 0,04	7,74 \pm 0,03	7,54 \pm 0,08
Leveduras e bolores	1	3,69 \pm 0,01	7,49 \pm 0,04	6,80 \pm 0,08	6,88 \pm 0,01	3,41 \pm 0,00	n.d
	2	6,55 \pm 0,02	4,50 \pm 0,13	4,10 \pm 0,01	3,54 \pm 0,21	3,94 \pm 0,04	3,45 \pm 0,26
	3	4,92 \pm 0,08	5,57 \pm 0,06	5,14 \pm 0,01	4,87 \pm 0,06	4,45 \pm 0,06	4,19 \pm 0,02

n.d: não determinado

As contagens de bactérias mesofílicas totais aeróbias, de uma forma geral, aumentaram ao longo da maturação nos três lotes em estudo (Tabela 10), pelo que no lote 1 foram contabilizadas contagens de 4,73 log ufc/mL de leite de cabra cru, inferiores às apresentadas nos lotes 2 e 3, com cerca de 7,95 log ufc/mL e de 7,61 log ufc/mL, respetivamente. Por outro lado, no lote 1, aos 5 dias de maturação foi verificado um aumento acentuado na contagem, atingindo o pico máximo aos 10 dias com contagens de 9,15 log ufc/g de queijo, mantendo um valor próximo até ao final do tempo de maturação (9,09 log ufc/g).

Nos lotes 2 e 3, aos 31 dias de maturação para ambos os lotes, foram atingidas as contagens máximas de bactérias mesofílicas totais aeróbias, cerca de 10,53 log ufc/g e 10,10 log ufc/g de queijo, respetivamente, pelo que, seguidamente apresentaram um decréscimo das suas populações no final do tempo de maturação (9,13 log ufc/g e 9,03 log ufc/g). Assim, apesar de algumas diferenças observadas durante o processo de maturação destas bactérias, as contagens finais verificadas nos três lotes apresentaram valores similares.

O comportamento comprovado pelas bactérias mesofílicas totais aeróbias, durante o processo de maturação do queijo fabricado com leite de cabra cru, foi análogo ao observado em queijos fabricados com leite de vaca cru ou pasteurizado variando no geral, as contagens e a fase de maturação onde estas assumiram os valores mais elevados (Alegria *et al.*, 2009; Marino *et al.*, 2003).

Sendo que as contagens de bactérias mesofílicas foram inferiores às verificadas nos três lotes do nosso trabalho, tendo apresentado níveis entre 10^7 ufc/g e 10^8 ufc/g em amostras de queijos fabricados com leite de cabra cru (Pino *et al.*, 2018), com leite de vaca cru (Alegria *et al.*, 2009) e com leite ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018).

Elevadas contagens de bactérias mesofílicas são assim indicadoras de condições inadequadas no manuseamento do leite, no armazenamento, ou no seu processamento, assim como, indicadoras de condições higiénicas insatisfatórias durante a produção de queijo (Duarte *et al.*, 2020).

As populações das bactérias psicrotóficas, estão omnipresentes na natureza (Dogan and Boor, 2003), sendo que também pode ocorrer contaminação durante a recolha e transporte de leite, através da má higienização de equipamentos utilizados (Decimo *et al.*, 2018; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Estas bactérias compõem assim a microflora principal do leite cru refrigerado, contribuindo para a deterioração do mesmo e dos seus derivados (Ercolini *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2018). Assim, é importante que estas bactérias sejam eliminadas durante o fabrico de queijos, de

maneira a produzir um produto final com elevada qualidade microbiológica e organolética (Yoon *et al.*, 2016).

As contagens de bactérias psicotróficas aeróbias, no geral, apresentaram um perfil semelhante ao longo do processo de maturação, em relação às bactérias mesofílicas totais aeróbias, uma vez que, as suas contagens também aumentaram ao longo do tempo de maturação (Tabela 10). O lote 1 apresentou contagens inferiores aos restantes lotes, cerca de 4,57 log ufc/mL de leite de cabra cru, tendo sido verificado um aumento acentuado nos primeiros 5 dias de maturação, por conseguinte, o valor das suas contagens manteve-se estável até a final do tempo de maturação (31 dias), com contagens de 8,90 log ufc/g de queijo. Em relação ao lote 2 as contagens iniciais, do leite de cabra cru, foram altas com valores de 8,25 log ufc/mL, no entanto, os seus valores mantiveram-se estáveis até aos 10 dias de maturação do queijo (8,92 log ufc/mL). Aos 31 dias as bactérias psicotróficas atingem o seu pico máximo, com contagens de 9,13 log ufc/g de queijo, tendo diminuído a sua população ao final do tempo de maturação (7,85 log ufc/g). No lote 3, as contagens iniciais de bactérias psicotróficas no leite de cabra cru, também foram elevadas, com contagens de 7,48 log ufc/mL, apresentando um perfil similar de evolução da população ao verificado para o lote 2, no entanto com um aumento gradual da população ao longo do tempo de maturação. Após um pico máximo aos 31 dias com contagens de 9,46 log ufc/g de queijo, verificou-se um pequeno decréscimo nas contagens, tendo assumido valores de 8,17 log ufc/g de queijo, no final da maturação.

Assim, foi observado que as contagens iniciais de bactérias psicotróficas aeróbias apresentaram valores elevados, as quais, se mantiveram altas durante a maturação do queijo.

Como as bactérias psicotróficas aeróbias são conhecidas por crescerem a 5-7°C, embora a sua temperatura ótima de crescimento seja mais alta, elas dominam a flora do leite, durante o seu armazenamento a frio (Ercolini *et al.*, 2009; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; ISO 4833:1991). Por conseguinte, o número destas bactérias, aumentam durante o armazenamento do leite no frio, originando consequências na sua qualidade (Ercolini *et al.*, 2009). Estes fatores podem justificar as contagens elevadas desta população no leite de cabra cru.

Como as bactérias psicotróficas abrangem vários géneros, bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007), a sua prevalência nos queijos dos vários lotes durante a maturação pode existir pelo facto de certos microrganismos conseguirem resistir às condições adversas encontradas durante o

processo de maturação, como concentração de sal, diminuição do pH e interação competitiva com a microbiota presente (Gonçalves *et al.*, 2018).

As bactérias ácido-lácticas estão naturalmente presentes na microbiota nativa do leite cru, mas podem estar presentes nos ambiente envolventes dos animais e dos laticínios (Alegría *et al.*, 2009; Delavenne *et al.*, 2012; Settanni and Moschetti, 2010). Estas bactérias são denominadas como o grupo de microrganismos mais importante presentes no leite e na maioria dos produtos lácteos, pelo facto de estas bactérias produzirem vários compostos contribuindo de forma positiva para o queijo (inibição de microrganismos patogénicos ou deteriorantes, propriedades organoléticas, segurança do produto, entre outros) (Kongo and Malcata, 2016a; Picon *et al.*, 2016; Quigley *et al.*, 2013; Widyastuti *et al.*, 2014).

Da população das BAL, fazem parte os lactobacilos, que podem ser encontrados em plantas, animais, silagem e em leite cru. Durante a maturação do queijo, estas bactérias contribuem no desenvolvimento do sabor e da textura através dos vários compostos produzidos (Quigley *et al.*, 2013).

Nas contagens de lactobacilos determinadas no leite cru de cabra, os três lotes apresentaram contagens distintas. No lote 1, foram contabilizados 3,87 log ufc/mL, sendo que a sua contagem aumentou acentuadamente nos primeiros 5 dias de maturação para 8,32 log ufc/g de queijo. A partir desta fase de maturação o valor das contagens de lactobacilos mantiveram-se estáveis durante todo o processo de maturação, finalizando a maturação com 8,36 log ufc/g de queijo.

Em relação aos lotes 2 e 3, no leite de cabra cru foram contabilizadas 6,37 ufc/mL e 5,44 log ufc/mL, respetivamente. No lote 2, as contagens de lactobacilos aumentaram gradualmente ao longo da maturação, atingido o pico máximo aos 31 dias de maturação, com contagens de 9,48 log ufc/g de queijo, por conseguinte, a partir dos 31 dias de maturação as contagens apresentaram uma pequena diminuição tendo-se verificado cotagens finais de 8,87 log ufc/g. No lote 3 as contagens de lactobacilos também aumentaram gradualmente ao longo do tempo, no entanto, a partir dos 20 dias de maturação foi verificado valores estáveis das contagens destas bactérias, finalizando o processo de maturação com valores de 9,05 log ufc/g de queijo.

Este comportamento observado é análogo ao demonstrado em outros queijos fabricados com leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016) variando no geral, as contagens e a fase de maturação onde estas assumiram os valores mais elevados.

Comparando os resultados obtidos no leite de cabra cru, com outros trabalhos que utilizaram o mesmo tipo de leite (Faccia *et al.*, 2015; Picon *et al.*, 2016) e leite de vaca (Alegría *et al.*, 2009), os autores apresentaram contagens inferiores aos determinados nos lotes 2 e 3, apresentando contagens de 10^3 ufc/mL. No entanto, em outro trabalho as contagens de lactobacilos, foram superiores relativamente às obtidas nos três lotes, com contagens entre 10^6 ufc/mL e 10^8 ufc/mL de leite de cabra cru (Pino *et al.*, 2018).

Comparando os resultados obtidos nas amostras de queijos de leite de cabra cru, com outros autores, as contagens de lactobacilos determinadas ao final do tempo de maturação nos lotes 1 e 2, foram similares às obtidas em, queijos mistos feitos com leite cru de cabra e ovelha (Abriouel *et al.*, 2008), queijos de leite de ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018) em queijos de leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016; Pino *et al.*, 2018) e em queijos de leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009), com contagens de 10^8 ufc/g de queijo, o que não foi constatado no lote 3.

Por outro lado, os resultados obtidos em outros trabalhos as contagens dos lactobacilos, foram inferiores aos verificados neste trabalho, apresentando contagens entre 10^6 ufc/g e 10^7 ufc/g em queijos fabricados com leites pasteurizados de vaca ou de cabra (Marino *et al.*, 2003; Tabet *et al.*, 2016).

O aumento verificado das contagens de lactobacilos ao longo do processo de maturação pode derivar da presença de lactobacilos mesofílicos, designados como "BAL não iniciadoras", uma vez que são o único grupo microbiano que cresce bem em ambientes hostis no interior do queijo, com pH baixo, alto teor de sal, carência de carboidratos fermentáveis, é anaeróbio e pode conter bacteriocinas produzidas pelas bactérias iniciadoras (Marino *et al.*, 2003).

Outras populações que pertencem às BAL são os lactococos que podem ser encontrados em plantas, peixes e outros animais, assim como, podem estar naturalmente presentes no leite cru e nos seus derivados (queijo). Durante a produção de queijo, a sua principal função é a acidificação através da produção de ácido láctico (Quigley *et al.*, 2013; Tidona *et al.*, 2018).

Na determinação das contagens de lactococos nas amostras de leite de cabra cru, a contagem destas bactérias foi superior relativamente à de lactobacilos, com valores de 4,55 ufc/mL, 7,76 ufc/mL e 6,69 log ufc/mL de lactococos, nos lotes 1, 2 e 3, respetivamente. Apesar das diferenças iniciais verificadas, os lactococos apresentam um comportamento semelhante em relação aos lactobacilos, ao longo do processo de maturação. Foi possível observar que os lactococos do lote 1 e 2, atingiram o seu pico

máximo na mesma fase de maturação dos lactobacilos, aos 10 dias no lote 1 e aos 31 dias no lote 2, apresentando contagens muito próximas às contabilizadas nas contagens de lactobacilos, com valores de 8,96 ufc/g e de 9,52 log ufc/g, respetivamente. No entanto, o lote 3 apresentou o pico máximo de lactococos mais cedo que os lactobacilos, tendo ocorrido aos 20 dias de maturação, com contagens de 9,30 log ufc/g de queijo. Após o tempo de maturação pretendido, as contagens finais de lactococos encontraram-se na mesma ordem de grandeza relativamente às contagens de lactobacilos verificadas nos lotes 1 e 3, tendo sido contabilizados contagens de 8,68 log ufc/g, 9,16 log ufc/g de queijo, respetivamente. Contudo, no lote 3 as contagens de lactococos foram ligeiramente superiores aos lactobacilos, com 9,08 log ufc/g de queijo, no final da maturação.

O comportamento demonstrado pela população de lactococos é idêntico ao observado em outros queijos fabricados com leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016) ou pasteurizado (Tabet *et al.*, 2016) e em queijos de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009) ou pasteurizado (Marino *et al.*, 2003) variando no geral, as contagens e a fase de maturação onde estas assumiram os valores mais elevados.

Comparando os resultados obtidos nas amostras de leite de cabra cru, com outros trabalhos que utilizaram leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016) ou em leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009), os autores determinaram contagens superiores, que as observadas no lote 1, com valores de 10^5 ufc/mL. Nos resultados obtidos por Pino e seus co-autores (2018), as amostras de leite de cabra cru analisadas, no geral, apresentaram contagens entre 10^7 ufc/mL e 10^8 ufc/mL, superiores às observadas nos lotes 2 e 3.

Relativamente aos resultados obtidos nas amostras de queijos de leite de cabra cru, comparando com trabalhos anteriores, as contagens finais de lactococos determinadas nos lotes 2 e 3, foram superiores às obtidas em queijos de leite cru de cabra e ovelha (Abriouel *et al.*, 2008), em queijos de cabra cru (Picon *et al.*, 2016; Pino *et al.*, 2018), em queijos de ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018) ou em queijos de leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009), uma vez que apresentaram contagens de lactococos de 10^8 ufc/g. No entanto, a ordem de grandeza das contagens de lactococos obtida pelos autores nas amostras de queijo foi igual à determinada no lote 1

As elevadas contagens de lactococos durante o fabrico de queijo, poderá dever-se devido à presença de determinadas espécies de lactococos, como *Lc. lactis subsp. lactis* e *Lc. lactis subsp. cremoris*, uma vez que, podem dominar a microflora do leite cru, queijos e outros produtos láteos (sem tratamento térmico) (Quigley *et al.*, 2013).

Além dos lactobacilos e lactococos que pertencem às BAL, os enterococos também fazem parte, e podem ser encontrados nos tratos gastrointestinais dos seres humanos e animais, contudo a sua presença em alimentos lácteos está associada à má higienização durante o processamento e produção (Abriouel *et al.*, 2008; Quigley *et al.*, 2013). Por conseguinte, os enterococos podem ser considerados organismos de culturas iniciais, probióticos, deteriorantes ou patogênicos dependendo da sua espécie (Gonçalves *et al.*, 2018).

Acerca das contagens de enterococos nas amostras de leite de cabra cru, o lote 1 apresentou contagens inferiores aos restantes lotes, cerca de 2,99 log ufc/mL, enquanto que nos lotes 2 e 3 as contagens foram de aproximadamente 5 log ufc/mL. No geral, a contagem de enterococos aumentou de forma gradual ao longo do processo de maturação do queijo. No lote 1 foi verificado um aumento considerável nos primeiros 5 dias de maturação atingindo uma contagem de enterococos de 7,00 log ufc/g de queijo, tendo atingido o pico máximo aos 20 dias, as quais permaneceram estáveis até aos 31 dias de maturação (7,79 log ufc/g). Em relação aos lotes 2 e 3, as contagens de enterococos atingiram o pico máximo aos 31 dias de maturação, pelo que, no lote 2 as populações de enterococos sofreram uma pequena diminuição, apresentando contagens de 7,40 log ufc/g de queijo no final do processo de maturação, pelo contrário, no lote 3 os valores das contagens de enterococos mantiveram-se constantes (8,26 log ufc/g).

O comportamento dos enterococos é similar ao observado em outros queijos fabricados com leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016), como com leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009) ou pasteurizado (Marino *et al.*, 2003) variando no geral, as contagens e a fase de maturação onde estas assumiam os valores mais elevados.

Comparando os resultados obtidos no leite de cabra cru, com outros trabalhos, com leite cru proveniente de cabra (Picon *et al.*, 2016) ou de vaca (Alegría *et al.*, 2009), apresentaram no geral, contagens iniciais de 10^3 ufc/mL de leite, por conseguinte, foram inferiores aos valores das contagens obtidas no leite de cabra cru dos lotes 2 e 3. Porém no trabalho desenvolvido por Faccia *et al.*, (2015), que utilizou leite de cabra cru, foram determinadas contagens inferiores a 10^2 ufc/mL, portanto, mais baixos que os valores observados no leite de cabra cru dos três lotes.

Relativamente às contagens de enterococos nas amostras de queijos de leite de cabra cru obtidas neste trabalho, vários autores noutros trabalhos, em queijos produzidos com leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016), com leite de ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018), com leite cru de mistura (cabra e ovelha) (Abriouel *et al.*, 2008) ou com leite de

vaca cru (Alegria *et al.*, 2009), determinaram contagens inferiores às verificadas nos queijos dos vários lotes, os quais apresentaram no geral, contagens entre 10^5 ufc/g e 10^6 ufc/g de queijo.

A presença de um número elevado de enterococos é próprio dos queijos de leite cru tradicional, uma vez que, devido ao seu estado onnipresente, pode facilmente contaminar o leite cru durante a sua recolha ou durante o seu processamento na produção de queijo, devido às más práticas higiénicas de fabricação (Gonçalves *et al.*, 2018; Marino *et al.*, 2003). Além disso, a sua presença também pode derivar em consequência do contato direto entre a sala de ordenha e a área onde os animais dormem (Pino *et al.*, 2018). Por outro lado, podem perseverar pela resistência dos enterococos a condições adversas, como, elevadas temperaturas, altas concentrações de sal e elevados níveis de ácido (Zárate *et al.*, 1997).

Devendo-se ao facto de estas bactérias nem sempre estarem diretamente associadas à deterioração dos queijos, os enterococos contribuem para o desenvolvimento das propriedades organoléticas típicas dos queijos, através das suas atividades proteolíticas e lipolíticas e alguns enterococos revelaram ter uma elevada capacidade de produzir metabolitos, como bacteriocinas, que atuam contra patogénicos de origem alimentar (Gonçalves *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2018; Tabet *et al.*, 2016; Zárate *et al.*, 1997).

As *Pseudomonas* são um género de bactérias psicrotróficas frequentemente presentes no leite e nos ambientes dos lacticínios (Duarte *et al.*, 2020). Desta forma, ao pertencerem às bactérias psicrotróficas estas bactérias têm a capacidade de crescer durante o armazenamento do leite contribuindo para a deterioração do leite cru e dos produtos lácteos (Dogan and Boor, 2003). Assim, para analisar a qualidade microbiológica do leite, métodos convencionais são usados para quantificar as suas populações (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007).

De acordo com os resultados da tabela 10, é possível constatar que, a população de *Pseudomonas* spp. dos lotes 2 e 3 apresentam um comportamento semelhante, o que não se observa para o lote 1. No lote 1, as contagens iniciais determinadas foram de 4,26 log ufc/mL de leite de cabra cru, sendo que aos 5 dias de maturação foi verificado um aumento acentuado da sua população nas amostras de queijo, para valores de 8,26 log ufc/g de *Pseudomonas* spp. Após esta fase de maturação, as contagens de *Pseudomonas* spp. não apresentaram variações consideráveis durante o processo de maturação, no entanto, as suas contagens permaneceram elevadas, obtendo contagens finais de 8,46 log ufc/g de queijo.

Relativamente aos lotes 2 e 3, foram contabilizadas *Pseudomonas* spp. nas amostras de leite, cerca de 7,55 log ufc/mL e 5,43 log ufc/mL, respetivamente. Quanto ao lote 2, este foi o que iniciou o processo de produção de queijo com as maiores contagens de *Pseudomonas* spp., no entanto, aos 5 dias de maturação e a partir deste, foi verificado uma diminuição constante de *Pseudomonas* spp. até ao último dia de maturação, com contagens finais de 4,43 log ufc/g. No que se refere ao lote 3, este apresentou um ligeiro aumento nas contagens de *Pseudomonas* spp. até aos primeiros 5 dias de maturação, no entanto, a partir deste dia, a evolução da população de *Pseudomonas* spp. decorreu da mesma maneira ao verificado no lote 2, finalizando o processo de maturação com contagens de 4,32 log ufc/g.

Em resumo, as contagens de *Pseudomonas* spp. no leite de cabra cru foram elevadas para todos os lotes no geral, porém no lote 2 e 3 foi observado uma diminuição nas contagens de *Pseudomonas* spp. ao longo do tempo de maturação, à exceção do lote 1, que manifestou um aumento das contagens durante todo o processo de fabrico do queijo. De forma geral, a proximidade entre os valores obtidos para as contagens de *Pseudomonas* spp. com as cargas obtidas nas contagens das bactérias mesofílicas e psicotróficas aponta para este género bacteriano como um dos principais contaminantes do leite cru.

Em trabalhos anteriores, as contagens de *Pseudomonas* spp. em leite de cabra cru foram inferiores aos valores obtidos neste trabalho, tendo apresentado contagens iniciais de 10^3 ufc/mL (Faccia *et al.*, 2015). Ainda, comparativamente às contagens de *Pseudomonas* spp. nas amostras de queijos de leite de cabra cru, os autores observaram contagens inferiores aos valores obtidos nos queijos dos vários lotes, tendo apresentado contagens de 10^3 ufc/g de queijo. As reduzidas contagens conseguidas por este autor podem dever-se à nova abordagem tecnológica utilizada no fabrico de queijo de leite de cabra cru (acidificação direta do leite com ácido cítrico juntamente com acidificação da coagulada pela fermentação láctica com iniciadores selecionados).

Assim sendo, as contagens reduzidas de *Pseudomonas* spp. obtidas nos queijos dos lotes 2 e 3 no final do tempo de maturação, poderão ter derivado da presença das BAL, que através da produção de metabolitos, como ácido orgânicos entre outras substâncias, possam eliminar microrganismos deteriorantes, como as *Pseudomonas* spp. No entanto no lote 1, contagens reduzidas de *Pseudomonas* spp. no final do tempo de maturação não foram verificadas. As contagens elevadas observadas durante todo o processo de maturação poderão ter ocorrido, pelo facto de certas bactérias conseguirem resistir às condições adversas encontradas durante o processo de

maturação, como concentração de sal, diminuição do pH e interação competitiva com a microbiota presente (Gonçalves *et al.*, 2018).

O sal ajuda a estabelecer o equilíbrio da água, resultando na redução da atividade de água do produto, que por sua vez permite exercer o controlo sobre o crescimento microbiano (Guinee, 2004). Como observado na figura 9, o queijo do lote 1 foi aquele obteve teores de sal mais baixos, assim sendo, a baixa concentração de sal pode ter sido o principal fator para a prevalência das contagens elevadas de *Pseudomonas* spp. observadas ao longo da maturação.

Segundo Duarte *et al.*, (2020), os valores de referência para as contagens de *Pseudomonas* spp. no leite e no queijo são inferiores a 10^6 cfu/mL. Deste modo, o leite de cabra cru, dos lotes 1 e 3 estavam abaixo do limite de referência, e por isso a qualidade do leite pode ser considerada satisfatória, o mesmo não foi verificado para o leite do lote 2 onde a contagem de *Pseudomonas* spp. ultrapassou os valores de referência.

Está descrito que as *Pseudomonas* spp. causam defeitos de sabor em leites processados, geralmente quando a população bacteriana atinge valores de 10^7 ufc/mL (Dogan and Boor, 2003). Assim sendo, pode ter ocorrido uma afetação das propriedades organolépticas dos queijos pela população de *Pseudomonas*.

De maneira, a controlar o crescimento *Pseudomonas* spp. e evitar a deterioração do leite cru durante o armazenamento e o seu transporte, devem ser estabelecidas temperaturas e tempo armazenamento corretos (Meng *et al.*, 2018). Para além do controlo no leite, também é essencial controlar o crescimento das *Pseudomonas* spp. durante o armazenamento do queijo de forma a prolongar a vida útil do queijo, uma vez que estes microrganismos afetam a sua qualidade (Faccia *et al.*, 2015).

Populações de *Enterobacteriaceae* nos alimentos despertam interesses tecnológicos (desenvolvimento de propriedades sensoriais), na qualidade higiénica (presença destas bactérias associada à contaminação de origem fecal) e na saúde (determinadas espécies podem ser consideradas patogénicos humanos) (Gonçalves *et al.*, 2018; Tornadijo *et al.*, 2001).

O comportamento das enterobactérias nas amostras alimentares do lote 1 apresentaram diferenças relativamente aos lotes 2 e 3. No lote 1, a contagem inicial de enterobactérias foi de 3,21 log ufc/mL de leite de cabra cru, tendo-se verificado um aumento considerável nos primeiros 5 dias de maturação para cerca de 7,17 log ufc/g de queijo, onde as contagens destas bactérias se mantiveram estáveis, pelo que,

apresentaram um aumento no final do processo de maturação, observando-se contagens de 8,70 log ufc/g de queijo.

Os lotes 2 e 3, apresentam um comportamento semelhante entre si, verificando-se uma diminuição das suas contagens ao longo da maturação. O lote 2, obteve contagens de enterobactérias no leite de cabra cru de 5,74 log ufc/mL, valor superior aos verificados nos lotes 1 e 3. Aos 5 dias de maturação do mesmo, a população de enterobactérias sofreu uma ligeira diminuição para 4,78 log ufc/g de queijo, as quais se mantiveram-se estáveis, no entanto, aos 45 dias de maturação foi verificado uma diminuição das contagens de enterobactérias para valores de 3,48 log ufc/g de queijo. Em relação ao lote 3, este iniciou a produção de queijo com contagens de enterobactérias de 3,96 log ufc/mL de leite de cabra cru, tendo-se verificado um aumento considerável nos primeiros 5 dias de maturação para cerca de 6,36 log ufc/g de queijo, onde os valores das contagens se permaneceram constantes até aos 10 dias de maturação. A partir desta fase de maturação foi observado um decréscimo da população de enterobactérias até ao final do processo de maturação do queijo, tendo sido contabilizadas 3,88 log ufc/g de queijo.

Comparando os resultados das amostras de leite de cabra cru, com outros trabalhos, com leite de cabra cru (Picon *et al.*, 2016) ou com leite de vaca cru (Ercolini *et al.*, 2009; Tornadijo *et al.*, 2001), apresentaram contagens iniciais entre 10^2 ufc/mL e 10^4 ufc/mL de leite, intervalo de valores inferiores às contagens obtidas no leite de cabra cru do lote 2. Por conseguinte, os autores Alegría *et al.*, (2009) e Pino *et al.*, (2018), em leite de vaca cru e em leite de cabra cru, respetivamente, nos seus trabalhos verificaram que no geral, as contagens de enterobactérias assumiram valores de 10^5 ufc/mL de leite, contagens similares às determinadas no lote 2. No entanto, contagens desta população microbiana superiores a 10^4 ufc/mL de leite, podem ser considerados níveis elevados, uma vez que o valor de referência para leite cru é entre 10^2 a 10^4 ufc/mL (Duarte *et al.*, 2020; Picon *et al.*, 2016).

Relativamente às contagens de enterobactérias nas amostras de queijos de leite de cabra cru obtidas neste trabalho, vários autores noutros trabalhos também em queijos produzidos com leite de cabra cru (Kongo *et al.*, 2009; Pino *et al.*, 2018) determinaram contagens entre 10^1 ufc/g e 10^4 ufc/g de queijo, intervalo de valores que incluem as contagens de enterobactérias obtidas nos lotes 2 e 3. No entanto, em estudos anteriores em queijos produzidos com leite de ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018), com leite cru de mistura (cabra e ovelha) (Abriouel *et al.*, 2008) ou com leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009), os autores determinaram contagens de enterobactérias entre 10^5 ufc/g e 10^7

ufc/g de queijo, pelo que a unidade logarítmica do limite máximo deste intervalo de valores está próximo da unidade logarítmica verificada no lote 1.

O aumento das contagens de *Enterobacteriaceae* nos primeiros estágios de maturação do queijo, está associado às condições favoráveis de crescimento (Tornadijo *et al.*, 2001). Nos lotes 2 e 3, foi notório que o tempo de maturação influenciou a contagem final de enterobactérias, apresentando contagens inferiores às obtidas inicialmente. Esta diminuição também foi relatada em queijos produzidos com leite de cabra cru (Jo *et al.*, 2018) e com leite de mistura (cabra e ovelha) (Freitas *et al.*, 1995). Assim, fatores como o aumento da concentração de sal (proveniente do processo da salga), o declínio da atividade da água, os baixos valores de pH, produção de ácido e de bacteriocinas, resultantes do metabolismo das BAL, podem contribuir para a diminuição e/ou inibição dessas bactérias durante a maturação, controlando assim as populações de *Enterobacteriaceae* no queijo (Picon *et al.*, 2016; Tornadijo *et al.*, 2001; Zárata *et al.*, 1997). Por conseguinte, é importante referir que a diminuição progressiva de *Enterobacteriaceae*, não é uma consequência de um único parâmetro físico químico, mas sim, pela combinação dos seus efeitos dos vários parâmetros.

Estes fatores mencionados, podem justificar assim a diminuição verificada das populações das enterobactérias ao longo da maturação do queijo nos lotes 2 e 3, não sendo observado no lote 1. As contagens elevadas durante a maturação do queijo observadas no lote 1 podem derivar das baixas concentrações de sal verificadas neste lote (Figura 9), concentrações essas que poderão ser insuficientes para provocar a diminuição desta população microbiana. Lembrando que o sal exerce o controlo sobre o crescimento microbiano (Guinee, 2004).

Além disso, o pH também poderá ter contribuído para as contagens elevadas, uma vez que, apesar do pH diminuir ao longo do processo, são necessários valores inferiores a 5,0 – 5,2 para atingir a inibição de *Enterobacteriaceae* (Tornadijo *et al.*, 2001).

Deste modo, as contagens elevadas em amostras de leite e queijo, são indicativas de uma possível contaminação por más práticas higiénicas na ordenha, no armazenamento, no transporte, entre outros, e durante o fabrico do queijo (Abriouel *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2018; Picon *et al.*, 2016; Tornadijo *et al.*, 2001; Zárata *et al.*, 1997). Por conseguinte, o armazenamento do leite em refrigeração por longos períodos deve ser evitado, uma vez que, as temperaturas baixas contribuem para a aumento da população de *Enterobacteriaceae* psicrótróficas (Tornadijo *et al.*, 2001).

Vários gêneros de *Enterobacteriaceae* são encontrados em queijos fabricados com leite cru, onde a presença de enterobactérias não patogênicas é essencial para certas atividades metabólicas, associadas à formação de gases e ao desenvolvimento de propriedades sensoriais em alguns tipos de queijo (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018). Por outro lado, a sua presença pode constituir um risco para a saúde, uma vez que, algumas espécies deste grupo microbiano são consideradas organismos deteriorantes ou patogênicos humanos, como *E. coli* ou *Salmonella* spp. (Abriouel *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018).

Espécies de *Staphylococcus*, podem ser encontrados na pele e nas mucosas (animais e de seres humanos), nos ambientes de ordenha e nas superfícies de equipamentos lácteos. Devido à sua omnipresença, são considerados bons indicadores de boas práticas higiênicas durante o processamento de alimentos (Andretta *et al.*, 2019). Dentro das espécies de *Staphylococcus*, existem estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativa, que podem contribuir para o desenvolvimento do sabor de queijos de leite cru (Yoon *et al.*, 2016).

Neste trabalho, para a identificação/ isolamento de estafilococos, foi utilizado o meio Baird–Parker agar, suplementado com gema de ovo com telurito. Este suplemento permitiu diferenciar os estafilococos coagulase-positiva presuntivos, devido à redução do telurito, originando zonas claras translúcidas em volta das colônias, resultantes da ocorrência de lipólise e/ou proteólise (ISO 4833:1991). Após a contagem de estafilococos no leite de cabra cru, como nos queijos dos vários lotes, foi possível observar zonas claras translúcidas em volta de algumas colônias, por conseguinte, nas placas aquando da contagem das colônias de estafilococos, as colônias com essas características não se encontravam dentro do intervalo de 30-300 colônias. Deste modo, conclui-se para todos os lotes que o leite de cabra cru como o queijo produzido por este apresentavam valores de *Staphylococcus* coagulase positiva inferiores a 3 log ufc/mL ou g.

Relativamente às contagens de estafilococos, os três lotes em estudo, apresentam um comportamento semelhante, verificando-se um aumento mais considerável nas suas contagens entre o leite de cabra e os primeiros 5 dias de maturação do queijo. Nas amostras de leite de cabra cru, o lote 1 apresentou contagens inferiores aos restantes lotes, cerca de 3,71 log ufc/mL, enquanto que nos lotes 2 e 3 as contagens foram de 5,22 log ufc/mL para ambos os lotes. Além disso, no lote 1 foi verificado nos primeiros 5 dias de maturação do queijo, um aumento acentuado das suas contagens, tendo sido contabilizado 6,31 log ufc/g, pelo que, as contagens de estafilococos mantiveram-se

estáveis durante o processo de maturação, tendo sido verificado contagens finais de 6,80 log ufc/g de queijo.

Nos lotes 2 e 3, na contagem de estafilococos também foi observado um aumento aos 5 dias de maturação, no entanto, de forma mais ligeira que o observado no lote 1. Por conseguinte, o lote 3, foi o lote que apresentou as maiores contagens de estafilococos nesta fase de maturação em relação aos lotes 1 e 2, com contagens de 7,26 log ufc/g. Por conseguinte, as contagens apresentaram valores estáveis durante o processo de maturação, na ordem dos 6 log ufc/g no lote 2 (unidade logarítmica equivalente ao lote 1) e dos 7 log ufc/g no lote 3. Contudo, no lote 2 aos 45 dias de maturação foi verificado um ligeiro aumento das contagens de estafilococos para valores de 7,70 log ufc/g de queijo, valor próximo ao observadas no lote 3.

Comparando os resultados das amostras de leite de cabra cru, com as mesmas condições e o mesmo tipo de leite, foram reportadas contagens inferiores relativamente às obtidas nos três lotes, com valores de cerca de 10^2 ufc/mL (Pino *et al.*, 2018). Por conseguinte, noutros trabalhos, vários autores em leite de vaca cru (Alegría *et al.*, 2009) e em leite de cabra cru (Tabet *et al.*, 2016), determinaram contagens entre 10^3 ufc/mL e 10^4 ufc/mL, intervalo de valores que inclui a contagem de estafilococos observada no lote 1.

Por outro lado, em queijos produzidos com leite de cabra cru (Pino *et al.*, 2018) e com leite de ovelha cru (Gonçalves *et al.*, 2018), os autores apresentaram no geral contagens inferiores às obtidas neste trabalho, valores entre 10^2 ufc/g e 10^4 ufc/g de queijo.

De facto, a presença de *Staphylococcus* spp. nos queijos é esperada por causa destas bactérias poderem ser encontradas na pele e nas mucosas dos animais e dos seres humanos, assim como, poderem estar presentes nos ambientes de ordenha e nas superfícies de equipamentos lácteos. Além disso, como a produção de queijos realiza-se por manipulação direta, o potencial de transferência de *Staphylococcus* spp. no queijo aumenta, através dos utensílios, dos equipamentos e dos funcionários (Andretta *et al.*, 2019). Por outro lado, a sua presença durante a maturação dos queijos, é provavelmente devido à resistência das condições intrínsecas do queijo, como o sal e a desidratação (Gonçalves *et al.*, 2018). Consequentemente, o pH, atividade da água e concentrações de sal, podem favorecer o seu crescimento (Andretta *et al.*, 2019).

Assim sendo, a resistência e o contributo das condições intrínsecas do queijo, permitiram o crescimento/presença de população de estafilococos durante a maturação dos queijos dos vários lotes em estudo.

A composição fúngica do leite cru pode ser influenciada por diversos fatores (estado fisiológico dos animais, alimentação dos animais, entre outros) (Quigley *et al.*, 2013). A contaminação de produtos lácteos, como queijos, é devido à presença destes organismos nos ambientes das fábricas de queijos (Torkar and Vengušt, 2008).

A presença de algumas leveduras nos produtos lácteos pode deteriorá-los e originar sabores desagradáveis, no entanto, a maioria das leveduras podem ser relevantes na formação de sabores (Freitas *et al.*, 1995). A presença de bolores nos produtos lácteos pode também melhorar o sabor e aroma dos produtos, no entanto determinados bolores podem produzir micotoxinas, prejudiciais à saúde do consumidor (Delavenne *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013).

Neste trabalho, a contagem de leveduras e bolores foi realizada em conjunto, sendo por isso, contabilizado o número de colônias totais existentes no meio YGCA. Assim sendo, na contagem de leveduras e bolores nas amostras alimentares, foi possível observar que estes fungos estavam presentes, porém, eles apresentaram uma diminuição da sua população durante o processo de a maturação do queijo. Contudo, nos lotes 1 e 3, a contagem de leveduras e bolores apresentou um aumento de 3,69 log ufc/mL de leite de cabra cru para 7,49 log ufc/g de queijo no lote 1, e de 4,92 log ufc/mL de leite de cabra cru para 5,57 log ufc/g de queijo no lote 3, nos primeiros 5 dias de maturação. Por conseguinte no lote 1, durante a maturação do queijo, as populações de leveduras e bolores mantiveram os seus valores, na ordem de 10^6 ufc/g de queijo, tendo apresentado uma diminuição acentuada aos 31 dias de maturação, obtendo-se uma contagem final de leveduras e bolores de 3,41 log ufc/g de queijo. No entanto, no lote 3 foi verificado uma diminuição constante de leveduras e bolores, até ao último dia de maturação, com contagens finais de 4,19 log ufc/g.

No lote 2, foram obtidas as maiores contagens de leveduras e bolores no leite de cabra cru, em relação aos outros lotes, tendo sido contabilizadas cerca de 6,55 log ufc/mL. Seguidamente e durante o processo de maturação as populações de leveduras e bolores diminuíram até ao final do tempo de maturação, com contagens de 3,45 log ufc/g de queijo.

Observando outros resultados de trabalhos anteriores em amostras de leite de cabra cru a presença de fungos surge na maioria das amostras analisadas, com valores no entre 10^3 ufc/mL e 10^5 ufc/mL, intervalo de valores que inclui a contagem de leveduras e bolores observada nos lotes 1 e 3 (Picon *et al.*, 2016; Pino *et al.*, 2018). Por conseguinte, noutros trabalhos, vários autores em leite de cabra cru determinaram contagens

inferiores às determinadas nos leites de cabra cru dos vários lotes, com contagens entre 10^1 ufc/mL e 10^2 ufc/mL de leite (Faccia *et al.*, 2015; Pino *et al.*, 2018).

Comparando os resultados obtidos nas amostras de queijos de leite de cabra cru com outros autores, alguns estudos apresentaram contagens finais semelhantes às determinadas nos lotes 1 e 2 (cerca de 10^3 ufc/g) (Picon *et al.*, 2016; Pino *et al.*, 2018), contudo, num estudo em amostras de queijo de leite de vaca cru (Alegria *et al.*, 2009), foram observadas contagens mais elevadas, na ordem das 10^6 ufc/g de queijo, relativamente às determinadas nos queijos dos vários lotes.

Em relação aos resultados obtidos da contagem de leveduras e bolores em queijos de leite de cabra cru por Faccia *et al.*, (2015), foram verificados melhores resultados, uma vez que, as contagens finais foram mais baixas às verificadas em todos os queijos dos vários lotes, apresentando contagens de 10^2 ufc/g de queijo, que podem estar associadas à abordagem tecnológica utilizada. Assim, a variabilidade de valores das contagens de leveduras e bolores encontrados pelos vários autores nos diversos tipos de queijo, podem derivar do processo de fabrico, dos valores de pH e da atividade da água, tempo de maturação, entre outros. Para além disso, as elevadas populações de leveduras e bolores podem surgir como consequência das más condições higiénicas do processamento, visto as leveduras e bolores, como organismos deteriorantes, habitualmente entrarem no leite e no queijo como contaminantes presentes nos equipamentos, ar, água, ambiente dos laticínios, entre outros (Torkar and Vengušt, 2008). Desta forma, as contagens verificadas no leite de cabra cru, comparativamente às contagens dos queijos com 5 dias de maturação, principalmente no lote 1 e 3, aumentaram ligeiramente, o que provavelmente pode ser uma consequência da contaminação do ambiente envolvente no fabrico de queijos, por estes microrganismos (Torkar and Vengušt, 2008).

Por outro lado, a diminuição observada em todos os lotes nas contagens de leveduras e bolores ao longo do processo de maturação, poderá ter ocorrido pela desvantagem competitiva das leveduras entre a crescente compactação da matriz dos queijos ao longo da maturação, que reduz a difusão de oxigénio molecular necessário para a multiplicação das leveduras, embora a maioria das leveduras também possam crescer com baixas taxas de oxigénio (Marino *et al.*, 2003). No entanto, visto a contagem destas populações fúngicas ser o número de colónias totais de leveduras e bolores, a diminuição verificada ao longo o processo de maturação, também pode ter sido influenciada pela inibição de bolores no queijo, através dos ácidos gordos livres (Freitas *et al.*, 1995).

Por conseguinte, a presença destas populações microbianas em todos os queijos dos vários lotes, pode derivar das características fisiológicas e bioquímicas que as leveduras possuem, uma vez que têm a capacidade de utilizar a lactose ou galactose, de crescerem a baixas temperaturas e por tolerarem elevadas concentrações de sal (Quigley *et al.*, 2013). Assim como, pela capacidade de proliferação dos bolores nas paredes e prateleiras da sala de maturação e ainda pela sua propagação nas superfícies do queijo.

De modo a evitar a sua propagação e controlar o crescimento de bolores, é importante a limpeza rigorosa da sala de maturação, assim como, a lavagem periódica das superfícies dos queijos é recomendada (Freitas *et al.*, 1995; Marino *et al.*, 2003).

Em síntese, devido à multiplicação de bactérias e à retenção de microrganismos na coalhada após a drenagem do soro de leite (Picon *et al.*, 2016; Zárate *et al.*, 1997) e através das contagens dos microrganismos realizadas neste estudo, foi possível observar, que a maioria dos grupos aumentaram o número logarítmico das ufc/mL do leite para os queijos com 5 dias de maturação. O aumento do número logarítmico durante a maturação, foi acompanhado pela diminuição do pH, como consequência da produção de ácido láctico, produzido pelas bactérias lácticas presentes no queijo (Figura 12). Estes acontecimentos estão em concordância com outros autores no fabrico de queijos produzidos com leite de cabra cru (Zárate *et al.*, 1997). Apesar do elevado número de bactérias de diferentes grupos microbianos, é possível concluir que, as BAL (principalmente lactococos e lactobacilos), tornaram-se dominantes durante o processo de maturação do queijo, uma vez que, apresentaram unidades logarítmicas superiores aos restantes grupos. A dominância destas bactérias, também foi concluída no estudo realizado por Zárate *et al.* (1997).

A presença das BAL no queijo, influenciam o seu processo de maturação de diversas maneiras, pela produção de ácido láctico, pela diminuição do potencial de oxidação-redução, pela diminuição do pH e pela atividade proteolítica e lipolítica (Adams and Moss, 2008; Marino *et al.*, 2003; Zárate *et al.*, 1997).

Desta forma, pode-se fazer uma associação entre estas bactérias com os valores de pH obtidos neste trabalho, uma vez que o pH tende a diminuir com o aumento dos lactococos e dos lactobacilos (Figura 16).

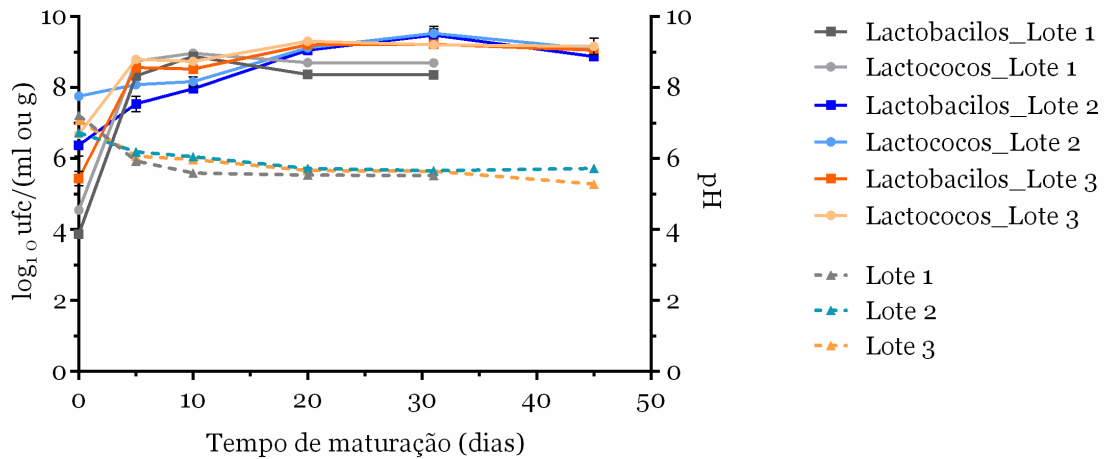


Figura 16: Relação inversamente proporcional entre os valores de pH (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Porém uma outra associação pode ser feita entre as concentrações de ácido láctico, uma vez que o aumento destas bactérias durante maturação do queijo permite aumentar a produção de ácido láctico (Figura 17A). Assim, o aumento da concentração de ácido láctico produzido pelas BAL, pode ter contribuído para a diminuição de grupos microbianos no interior do queijo durante a maturação do queijo (Zárate *et al.*, 1997). Por outro lado, o aumento do ácido acético também pode estar relacionado com o aumento das contagens de BAL (Figura 17B) (Pereira *et al.*, 2010), pelo que está dependente do tipo de fermentação que estas bactérias executam (homo ou heterofermentativa) (Ayyash and Shah, 2010).

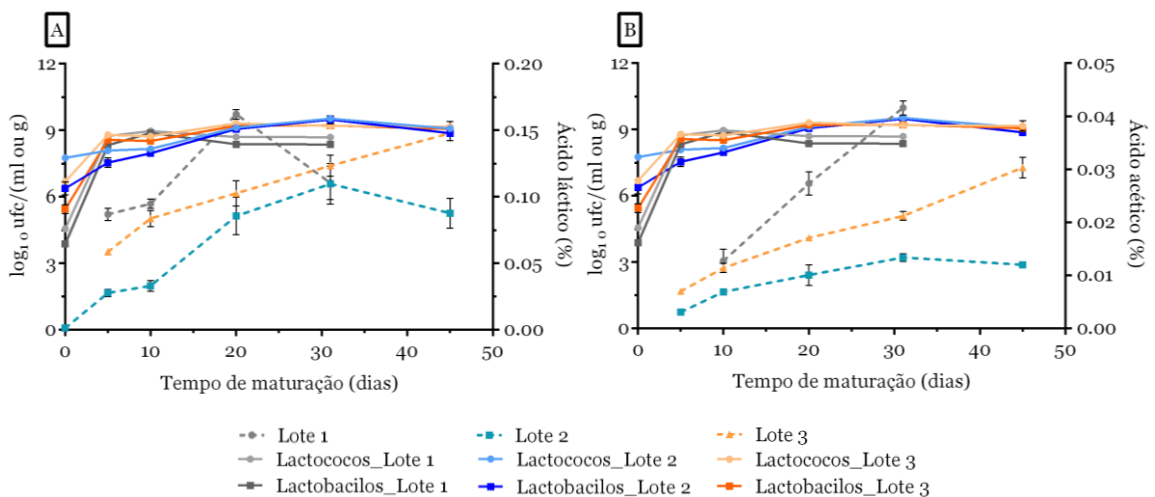


Figura 17: Relação diretamente proporcional entre as concentrações de ácido láctico (A) e acético (B) (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Do mesmo modo, outra associação pode ser feita entre as populações BAL e o aumento da taxa de proteólise. Assim sendo, o aumento de lactococos e lactobacilos, com consequente aumento das suas enzimas proteolíticas, permitiram hidrolisar as proteínas tendo como consequência o aumento da liberação de grupos α -amino livres, que por sua vez evidenciaram o aumento da taxa de proteólise (Figura 18). Assim, as populações microbianas e a taxa de proteólise foram relacionadas, no geral, como verificado no trabalho desenvolvido por Pereira *et al.*, (2010). Por conseguinte, a taxa de proteólise também pode ser afetada por enzimas proteolíticas de determinados microrganismos dentro da população de enterococos, enterobactérias não patogênicas, leveduras e bolores, estafilococos coagulase-negativa, que podem contribuir para as propriedades organoléticas do queijo, contudo existem outros, como as bactérias psicrotróficas e as *Pseudomonas spp.* onde as suas enzimas proteolíticas atuam de forma negativa no queijo.

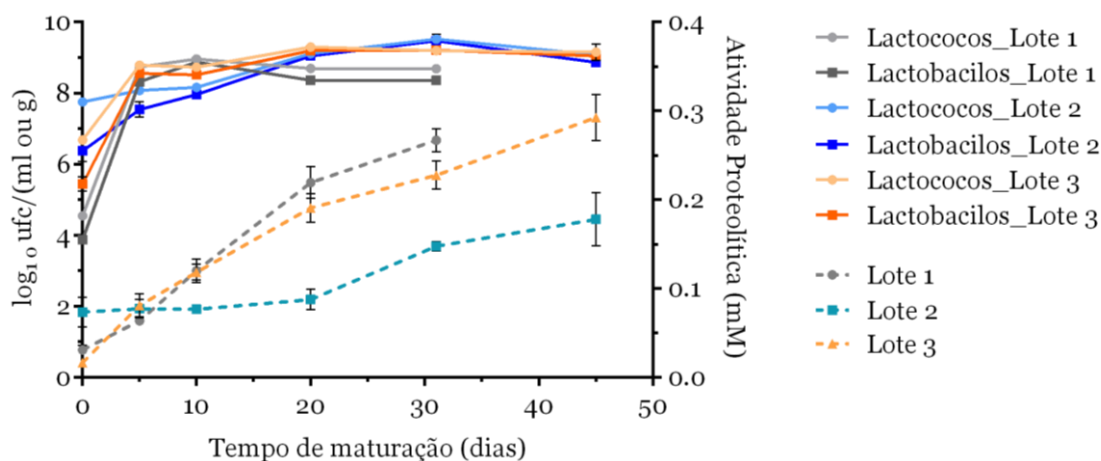


Figura 18: Relação diretamente proporcional entre a atividade proteolítica (linhas a tracejado) e as populações lácticas (linhas a cheio), verificada ao longo do processo de maturação dos queijos dos vários lotes. Resultados apresentados em valores médios \pm desvio padrão.

Assim, ao longo da maturação dos queijos dos vários lotes existe um sinergismo entre as populações lácticas e os valores de pH, concentrações de ácido lático e a taxa de proteólise, que por sua vez influenciam o processo de maturação do queijo. A formação do ácido lático e a sua contribuição na diminuição do pH aumentam a segurança do produto e dessa forma o prazo de validade do mesmo (Adams and Moss, 2008; Marino *et al.*, 2003). Por sua vez o processo de proteólise, determina a formação da textura e do sabor do queijo (Bontinis *et al.*, 2012; Galiou *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2018; Kongo *et al.*, 2009).

No entanto, a presença das BAL representa cerca de 20 a 30% das contagens totais de bactérias no leite cru, porém as condições de produção, a estação do ano, a criação e a

origem animal do leite influenciam a diversidade e a sua abundância (Delavenne *et al.*, 2012).

Relativamente ao número de populações indicadoras de higiene, estas apresentaram valores elevados durante todo o processo de maturação do queijo, no entanto, esta generalidade está dependente do microrganismo. A abundância destes microrganismos, pode ser solucionada através da introdução de medidas mais rigorosas durante o processo de ordenha, transporte de leite e de fabrico (Abriouel *et al.*, 2008). Além disso, é importante destacar que, como é mostrado na tabela 10, ao final do tempo de maturação, os microrganismos indesejáveis apresentam contagens mais baixas relativamente às suas contagens iniciais, verificando-se algumas exceções. Estas ocorrências, como já discutido acima, poderão derivar da resistência dos microrganismos às condições intrínsecas do queijo (Gonçalves *et al.*, 2018).

Assim é essencial controlar o crescimento destes microrganismos durante o armazenamento do queijo de forma a prolongar o prazo de validade e a segurança do produto alimentar, mas também considerando que estes organismos têm a capacidade de alterar a qualidade do queijo (Faccia *et al.*, 2015).

É de referir que, o pH e o teor de sal são os fatores fundamentais, que atuam como uma pressão seletiva sobre a microbiota, favorecendo o crescimento de espécies microbianas resistentes a essas condições (Irlinger *et al.*, 2015).

4.3 Avaliação sensorial

Neste trabalho era importante perceber quais os pontos fortes e fracos do queijo de cabra cru e a sua aceitabilidade, pelos seus consumidores, assim, realizou-se um teste relativamente a vários parâmetros sensoriais (aparência, odor, textura, sabor e teor de sal), numa escala hedónica de 1 a 9 valores (1 - Não gosto e 9- Gosto extremamente), e um outro teste relativamente à sua intenção de compra, numa escala de 1 a 5 valores (1- certamente não compraria a 5- certamente compraria) (Anexo I).

A prova sensorial foi realizada quando o período de maturação mínimo dos queijos de leite de cabra cru foi considerado, ou seja, com 45 dias de maturação, dos respetivos lotes, exceto o lote 1 que maturou só até aos 31 dias. Os resultados da análise dos cinco atributos sensoriais e da intenção de compra dos consumidores estão representados na figura 19.

Dos atributos sensoriais, a avaliação da aparência foi realizada aos consumidores de queijo de cabra cru. A partir dos resultados obtidos (Figura 19A) constata-se que a

aparência do queijo do lote 3 foi a que mais agradou aos consumidores, pelo facto de 27 consumidores terem avaliado a aparência como “gosto muito” (8 valores). Não querendo isto dizer que os consumidores não gostaram da aparência obtida nos queijos do lote 1 e 2, pois nestes lotes também as maiores classificações ocorreram para 7 e 8 valores.

A aparência do queijo, pode ser relacionada com a cor que estes adquirirem ao final da maturação, uma vez que a avaliação da aparência é influenciada pela sua cor, sendo a cor um dos primeiros atributos sensoriais apercebidos pelos consumidores (Ariceaga *et al.*, 2019).

Relativamente ao odor dos queijos (Figura 19B) dos três lotes, a maioria dos consumidores avaliaram o odor dos queijos com uma classificação de “gosto muito” (8 valores). No entanto, no lote 2 o número de consumidores que avaliaram o odor como “gosto muito” foi igual àqueles que avaliaram o odor como “gosto moderadamente” (7 valores), assim sendo este lote manifestou 2 classificações maioritárias. Por conseguinte, a avaliação do odor agradou à maioria dos consumidores.

Na avaliação da textura dos queijos (Figura 19C), a classificação mais atribuída pelos consumidores foi a de 8 valores “gosto muito”, para todos os queijos dos vários lotes. No entanto, no lote 1 mais consumidores gostaram da textura do queijo com essa classificação em comparação com os outros lotes, tendo cerca de 25 consumidores apreciado muito a textura do queijo.

A análise sensorial da textura pode ser relacionada com as propriedades mecânicas obtidas na avaliação da reologia do queijo, pelo facto destas propriedades se relacionarem com as propriedades sensoriais (Plante and Brookfield, 2018).

As propriedades mecânicas avaliadas como a dureza e/ou dureza de penetração e a adesividade podem ser relacionados com as propriedades sensoriais, uma vez que em termos sensoriais a avaliação da dureza, é caracterizada pela força necessária para comprimir um alimento entre os molares durante a sua mastigação e a adesividade é caracterizada pela força necessária para eliminar as forças atrativas entre os alimentos e as superfícies com os quais o alimento entra em contacto, como, língua, dentes, palato, entre outros (Cankurt, 2019; Plante and Brookfield, 2018; Zheng, *et al.*, 2016).

Desta forma, pela avaliação sensorial resultante da análise dos três lotes, o queijo do lote 1 foi o mais preferido pelos consumidores, isto permite concluir que os mesmos preferem um queijo menos duro, mais suave e com pouca adesividade, como foi

possível observar pelas características obtidas no final do tempo de maturação (Figura 14).

Na avaliação do sabor dos queijos dos três lotes (Figura 19D), foi verificado que o sabor recebeu pontuações satisfatórias pela maioria dos consumidores, atribuindo ao sabor 8 e 9 valores, no entanto a classificação de “gosto muito” (8 valores) foi a mais atribuída pelos consumidores. Assim, o sabor dos queijos avaliados no geral, foram muito apreciados pelos consumidores, visto terem sido obtidas classificações similares entre os lotes.

Por fim, o último atributo sensorial avaliado nos queijos dos vários lotes foi o teor de sal (Figura 19E). Pelos resultados obtidos, constata-se que a percepção do teor de sal nos queijos, que mais agradou os consumidores foi o queijo do lote 2, uma vez que foi o lote que apresentou mais consumidores a classificarem o queijo como “gosto muito”, cerca de 21 consumidores. Por conseguinte, no lote 1, a avaliação da percepção do teor de sal também foi satisfatória, tendo sido classificada com 8 valores (gosto muito). Contrariamente, no lote 3, a avaliação diferiu observando-se a classificação de 6 valores como a mais atribuída pelos consumidores, demonstrando assim um gosto ligeiro do teor de sal do queijo pelos consumidores. Esta classificação não era esperada uma vez que, este lote apresentou uma concentração de sal semelhante ao lote 2 (Figura 9). Da mesma forma, a classificação atribuída ao queijo do lote 1 não era esperada uma vez que o lote 1 e 2, em que ambos apresentaram as maiores classificações para 8 valores, apresentaram concentrações de sal muito diferentes, tendo o queijo do lote 1 apresentado menor concentração de sal no queijo (Figura 9). Estes resultados contraditórios, são resultantes provavelmente pelo painel de provadores, uma vez que os estudantes, professores e funcionários da Universidade da Beira Interior que participaram nesta análise, não foram sempre os mesmos, causando por isso, diferenças na classificação dos atributos sensoriais, essencialmente no teor de sal.

Relativamente aos resultados obtidos da análise sensorial dos queijos de cabra cru dos diferentes lotes, os consumidores no geral, atribuíram aos queijos pontuações satisfatórias, tendo sido assim as classificações mais atribuídas pela maioria dos consumidores de 7 valores (gosto moderadamente) e 8 valores (gosto muito), para os vários parâmetros analisados, à exceção do atributo do teor de sal, uma vez que no lote 3 os queijos foram mais classificados como “gosto ligeiramente” (6 pontos).

Desta forma, como a avaliação sensorial foi bastante satisfatória para os diversos parâmetros nos diferentes lotes, na análise dos resultados sobre a intenção de compra de queijos de cabra cru pelos consumidores, demonstrado na figura 19F, os

consumidores manifestaram interesse pelo produto, tendo como propósito a sua compra, como seria de esperar.

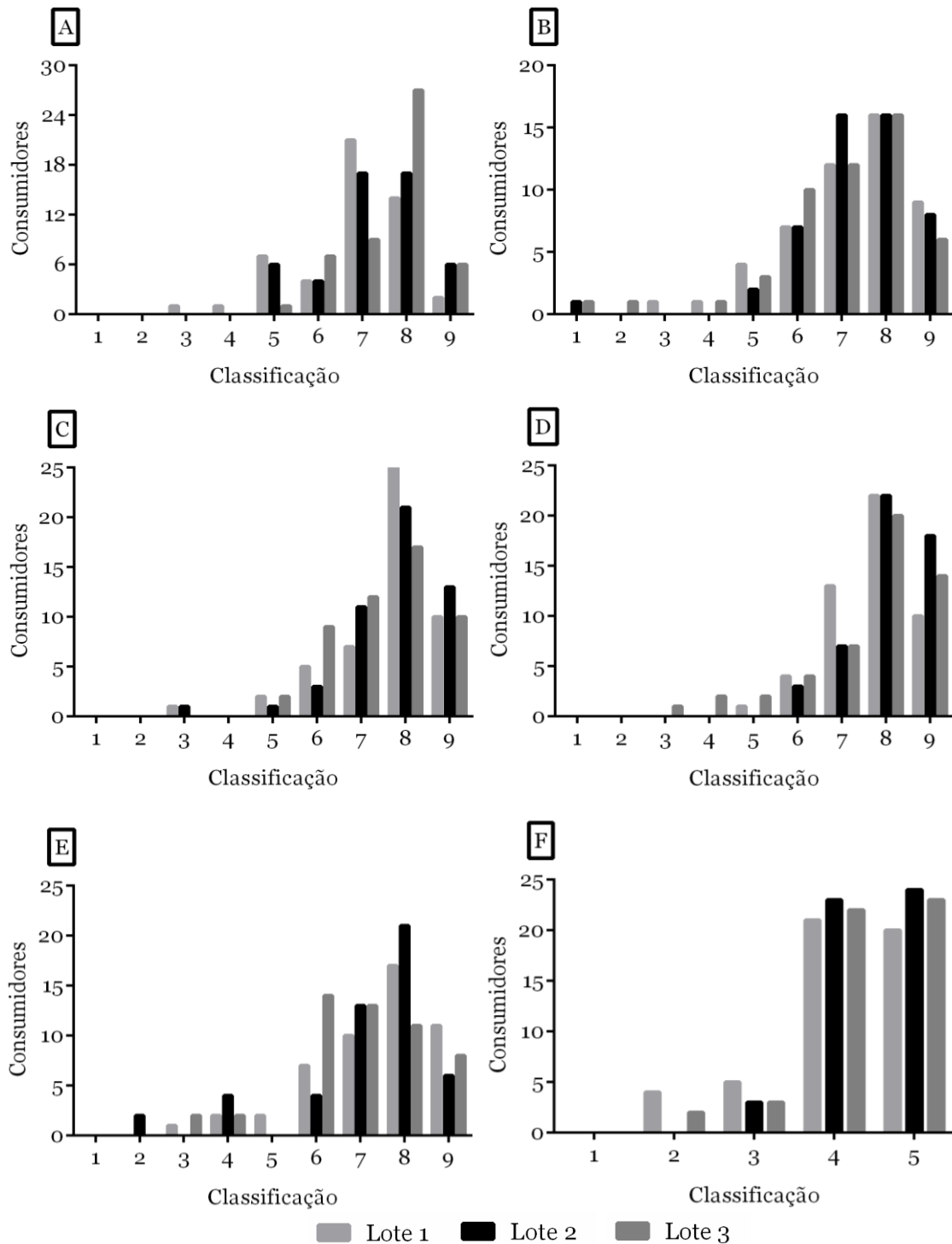


Figura 19: Avaliação dos queijos de cabra cru, dos três lotes em estudo. Resultados apresentados de acordo com as classificações atribuídas pelos consumidores, através de uma escala hedônica de 9 pontos para avaliação sensorial e através de uma escala de 5 pontos para a avaliação da intenção de compra, sendo (A) Aparência, (B) Odor, (C) Textura, (D) Sabor, (E) Teor de sal e (F) Intenção de compra.

As propriedades sensoriais como a textura, o *flavour* (aroma + sabor) e o aroma do queijo dependem diretamente da sua composição, relativamente à humidade, proteína, gordura e conteúdo mineral, assim como, do pH da coalhada e das condições de maturação (temperatura, percentagem de humidade e extensão da contaminação microbiana do queijo, no interior e no exterior) (Macedo *et al.*, 1993).

Por conseguinte, o *flavour* (aroma + sabor), a textura e a aparência, são os principais atributos que mais influenciam na preferência de um alimento, pelo consumidor (Bertuzzi *et al.*, 2018; Jo *et al.*, 2018).

O desenvolvimento do *flavour* no queijo, está associado à qualidade do leite, às operações de processamento e principalmente à atividade microbiana, que desencadeia inúmeras reações químicas levando à formação de compostos voláteis importantes na formação do aroma e sabor do queijo (Bertuzzi *et al.*, 2018). Do ponto de vista do consumidor, o *flavour* do queijo, é dos primeiros atributos sensoriais apercebidos, assim como, é a característica mais relevante que influencia a sua aceitação e preferência (Bozoudi *et al.*, 2018; Picon *et al.*, 2019).

Capítulo 5 – Conclusão e perspectivas futuras

O leite de cabra cru, assim como os seus derivados, são importantes na nutrição humana, especialmente para pessoas alérgicas ao leite de vaca e com distúrbios gastrointestinais, e para além disso, os derivados deste leite, como o queijo, são muito valorizados pelas suas características organolépticas, pela sua melhor digestibilidade, alcalinidade e pelos seus efeitos benéficos na saúde. A produção de queijo com leite cru é um processo complexo e dinâmico, não só pelas diversas reações que ocorrem durante a maturação, mas também pela consistência das características de qualidade e pela segurança do queijo. Desta forma toda a sua dinâmica torna-se um interesse de estudo. Considerando a qualidade do queijo fabricado a partir de leite cru, o trabalho desenvolvido teve como propósito caracterizar o perfil físico-químico e monitorizar a população microbológica durante o processo de produção e de maturação de queijo de leite de cabra cru, em três lotes distintos.

De forma a avaliar a evolução do perfil físico-químico durante o processo de produção e de maturação, vários parâmetros foram analisados. A análise do pH nos três lotes, demonstrou que o pH diminuiu desde a primeira medição (leite cru) até ao final da maturação dos queijos, causando uma ligeira acidificação dos queijos. Na avaliação do teor de humidade não foi possível estabelecer uma relação entre a perda de peso verificada ao longo do tempo.

Na avaliação do teor de sal, pôde-se concluir que o tempo de maturação interferiu com a difusão de sal no queijo, contudo as diferenças encontradas entre os lotes podem ter derivado da distribuição não homogénea do sal no queijo.

Na monitorização da taxa de proteólise, foi verificado em todos os lotes, que potencialmente terá ocorrido sinergismo entre as enzimas coagulantes e as enzimas bacterianas que contribuíram para o aumento da mesma. Para além disso, a ocorrência de proteólise é fundamental na formação da textura dos queijos.

Na análise dos ácidos orgânicos no leite e no queijo, o ácido cítrico (apenas quantificado no leite), ácido láctico e ácido acético foram quantificados. Esta análise, pôde ser correlacionada com a diminuição do pH, causada principalmente pelas concentrações de ácido láctico presente nas amostras. Desta forma, a cooperação existente pode contribuir na qualidade e segurança dos queijos.

Relativamente à avaliação da reologia do leite de cabra cru, foi observado em todos os lotes, que a viscosidade do mesmo exibiu um comportamento não newtoniano, de natureza pseudoplástica, derivando da possível redução da resistência do fluido da

matriz do leite ao seu fluxo e/ou composição do leite. Na análise da textura dos queijos foi possível verificar que no final do processo de maturação, os queijos apresentaram-se menos duros e mais adesivos, por consequência da alteração da matriz proteica, resultante do processo proteolítico. Contudo no lote 3, os resultados obtidos na avaliação da dureza e suavidade não foram coerentes, suspeitando-se ter existido um fator externo que possa ter interferido nas medições. Estas características adquiridas pelos queijos terão resultado principalmente da atividade proteolítica.

Na avaliação da cor dos queijos, conclui-se que o tempo de maturação afetou a cor dos mesmos, revelando uma coloração mais amarelada na parte externa relativamente à parte interna, contudo menos luminosa.

Na análise microbiológica foi demonstrado que a dinâmica microbiana dos três lotes, apresentou algumas diferenças, sendo o resultado expectável uma vez que a microflora do leite cru não é padronizada. As contagens obtidas nos queijos maturados de leite de cabra cru dos três lotes foram muito similares, exceto para as contagens de *Pseudomonas* spp. e de enterobactérias obtidas no lote 1. Foi evidenciado ainda que, as contagens elevadas observadas de bactérias psicrófilas aeróbias, enterococos, estafilococos verificadas nos três lotes, assim como de *Pseudomonas* spp. e de enterobactérias (verificadas apenas no lote 1) poderão estar associadas às condições higiénicas e possível resistência das bactérias às condições adversas encontradas durante a maturação dos queijos, porém, estas evidências poderão ser corrigidas pelo melhoramento de práticas de higiene. Contudo, as contagens elevadas de BAL (principalmente de lactococos e lactobacilos) verificadas durante o processo de maturação permitiu concluir que estas bactérias se tornaram dominantes tendo a sua presença contribuído no processo de maturação dos queijos. No geral, verificou-se uma influência da microflora nativa do leite de cabra cru, e da sua evolução ao longo da maturação nas características físico-químicas do queijo. Também foi possível observar uma relação entre diferentes parâmetros físico-químicos. Assim, foi demonstrada a complexidade das reações que ocorrem e a forma como estas são influenciadas pelas condições de processamento e de maturação.

Por fim, o último objetivo proposto foi a avaliação sensorial em queijos maturados de leite de cabra cru, tendo os resultados dos vários parâmetros sensoriais sido satisfatórios. Desta forma, e como seria de esperar a aceitabilidade dos queijos dos três lotes foi muito boa, tendo sido manifestado interesse pelos consumidores.

Com este trabalho foi concluído que as reações bioquímicas, microbiológicas que ocorrem durante o processo de maturação, assim como, as condições de produção e

maturação interferem no perfil dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Apesar de terem sido encontradas semelhanças entre lotes de produto analisado, foi possível observar variações em todos os parâmetros analisados. Assim, com este trabalho salientou-se a importância da padronização do leite cru e dos processos de produção de forma a conseguir manter as propriedades físico-químicas e organolépticas que sejam mais apreciadas pelos consumidores.

De forma a obter um maior conhecimento acerca do queijo produzido por leite de cabra cru, seria também importante em trabalhos futuros analisar outros parâmetros físico-químicos e microbiológicos, como por exemplo: analisar o teor de gordura; quantificar a taxa de lipólise; determinar os compostos voláteis existentes nas amostras; descrever de forma mais completa a microflora do queijo, identificando as espécies microbianas mais predominantes por métodos moleculares.

Capítulo 6 – Referências bibliográficas

Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008) "Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods", *International Journal of Food Microbiology*, 127, pp. 200–208.

Adams M. R., and Moss, M. (2008) "Food Microbiology", Third Edition, Guildford, UK: University of Surrey.

Aktypis, A., Christodoulou, E. D., Manolopoulou, E., Georgala, A., Daferera, D., and Polysiou, M. (2018) "Fresh ovine cheese supplemented with saffron (*Crocus sativus* L.): Impact on microbiological, physicochemical, antioxidant, color and sensory characteristics during storage", *Small Ruminant Research*, 167, pp. 32–38.

Alegría, Á., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., and Mayo, B. (2009) "Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk", *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp. 44–51.

Alexandraki, V., and Moatsou, G. (2018) "Para- κ -casein during the ripening and storage of low-pH, high-moisture Feta cheese", *Journal of Dairy Research*, 85, pp. 226–231.

Almeida, G., Figueiredo, A., Rôla, M., Barros, R. M., Gibbs, P., Hogg, T., and Teixeira, P. (2007) "Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety", *Journal of Food Protection*, 70, pp. 1710–1716.

Alvarenga, N., Canada, J., and Sousa, I. (2011) "Effect of freezing on the rheological, chemical and colour properties of Serpa cheese", *Journal of Dairy Research*, 78, pp. 80–87.

Andretta, M., Almeida, T. T., Ferreira, L. R., Carvalho, A. F., Yamatogi, R. S., and Nero, L. A. (2019) "Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil", *Journal of Dairy Science*, 102, pp. 10790–10798.

Ariceaga, C. C. G., Afzal, M. I., Umer, M., Abbas, S., Ahmad, H., Sajjad, M., Parvaiz, F., Imdad, K., Imran, M., Maan, A. A., Khan, M. K. I., Ullah, A., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., De Gante, A. V., Jacquot, M., and Cailliez-Grimal, C. (2019)

"Physicochemical, sensorial and microbiological characterization of PoroCheese, an artisanal Mexican cheese made from raw milk", *Foods*, 8, pp. 509

Ayyash, M. M., and Shah, N. P. (2010) "Effect of partial substitution of NaCl with KCl on Halloumi cheese during storage: Chemical composition, lactic bacterial count, and organic acids production", *Journal of Food Science*, 75, pp. 525–529.

Ball, S., Bullock, S., Lloyd, L., Mapp, K., and Ewen, A. (2011) "Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids: Agilent Hi-Plex Columns Analysis of Organic Acids in Dairy Products", *Agilent Technologies*.

Bertuzzi, A. S., McSweeney, P. L. H., Rea, M. C., and Kilcawley, K. N. (2018) "Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, pp. 371–390.

Bevilacqua, A. E., and Califano, A. N. (1989) "Determination of Organic Acids in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography", *Journal of Food Science*, 54, pp. 1076–1077.

Bontinis, T. G., Mallatou, H., Pappa, E. C., Massouras, T., and Alichanidis, E. (2012) "Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening", *Small Ruminant Research*, 105, pp. 193–201.

Bouzas, J., Kantt, C. A., Bodyfelt, F., and Torres, J. A. (1991) "Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Cheddar Cheese by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Food Science*, 56, pp. 276–278.

Bozoudi, D., Kondyli, E., Claps, S., Hatzikamari, M., Michaelidou, A., Biliaderis, C. G., and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2018) "Compositional characteristics and volatile organic compounds of traditional PDO Feta cheese made in two different mountainous areas of Greece", *International Journal of Dairy Technology*, 71, pp. 673–682.

Bradley, R. L. (2010) "Moisture and Total Solids Analysis", *Food analysis*, Chapter 6, pp. 85–104.

Cancino-Padilla, N., Fellenberg, M. A., Franco, W., Ibáñez, R. A., and Vargas-Bello-Pérez, E. (2017) " Foodborne bacteria in dairy products: Detection by molecular techniques", *Ciencia e Investigación Agraria*, 44, pp. 215–229.

Cankurt, H. (2019) "The effects of adding different stabilizers in brine on the

physicochemical, sensory, microbiological and textural properties of White cheese", *Foods*, 8, pp. 133

Correia, P., Vitor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Pinto, A., Correia, P., Madanelo, J., Vacas, M., and Guiné, R. (2014) "Influence of Different Processing Parameters in Physical and Sensorial Properties of Serra De Estrela Cheese", *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 8, pp. 135–140.

D'amico, D. J. (2014) "Microbiological Quality and Safety Issues in Cheesemaking", *Microbiology Spectrum*, 2, pp. 1-10.

Decimo, M., Cabeza, M. C., Ordóñez, J. A., De Noni, I., and Brasca, M. (2018) "Volatile organic compounds associated with milk spoilage by psychrotrophic bacteria", *International Journal of Dairy Technology*, 71, pp. 593–600.

Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., and Le Blay, G. (2012) "Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period", *International Journal of Food Microbiology*, 155, pp. 185–190.

Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., and Ramírez, R. (2011) "Proteolysis, texture and colour of a raw goat milk cheese throughout the maturation", *European Food Research and Technology*, 233, pp. 483–488.

Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., and Roa, I. (2010) "Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening", *International Journal of Food Science and Technology*, 45, pp. 512–519.

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

Duhan, N., Sahu, J. K., and Naik, S. N. (2018) "Temperature dependent steady and dynamic oscillatory shear rheological characteristics of Indian cow milk (*Desi*) ghee", *Journal of Food Science and Technology*, 55, pp. 4059–4066.

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

- Faccia, M., Trani, A., Gambacorta, G., Loizzo, P., Cassone, A., and Caponio, F. (2015) "Production technology and characterization of Fior di latte cheeses made from sheep and goat milks", *Journal of Dairy Science*, 98, pp. 1402–1410.
- Farkye, N.Y. (2003) "Cheeses: Chemistry and Microbiology of Maturation", *Elsevier Science*, pp. 1062–1066.
- Farkye, N. Y. (2004) "Cheese technology", *International Journal of Dairy Technology*, 57, pp. 91–98.
- Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Barros, L., Mendonça, Á., Ferreira, I. C. F. R., and De Sousa, F. S. (2018) "Chemical and physicochemical changes in Serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods", *LWT - Food Science and Technology*, 87, pp. 33–39.
- Freitas, A. C., Pais, C., Malcata, F. X., and Hogg, T. A. (1995) "Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese", *Journal of Food Protection*, 59, 155–160.
- G, Getaneh., A, Mebrat., A, Wubie., and H, Kendie (2016) "Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value", *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3, pp. 1–10.
- Gabas, A. L., Cabral, R. A. F., De Oliveira, C. A. F., and Telis-Romero, J. (2012) "Density and rheological parameters of goat mil", *Food Science and Technology*, 32, pp. 381–385.
- Galiou, O., Zantar, S., Bakkali, M., and Laglaoui, A. (2013) "Lipolysis and Proteolysis During the Ripening of Fresh Moroccan Goats' Milk Cheese", *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 8, pp. 201–206.
- Gomes, J. J. L., Duarte, A. M., Batista, A. S. M., De Figueiredo, R. M. F., De Sousa, E. P., De Souza, E. L., and Queiroga, R. C. R. E. (2013) "Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks", *LWT - Food Science and Technology*, 54, pp. 18–24.
- Gonçalves, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. G., Egas, C., Merchán, A. V., Galván, A. I., and Ruiz-Moyano, S. (2018) "Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-throughput Sequencing Analysis", *Journal of Food Science*, 83, pp. 1333–1341.

Guinee, T. P. (2004) "Salting and the role of salt in cheese", *International Journal of Dairy Technology*, 57, pp. 99–109.

Guo, M. (2003) "Goat: Milk", *Elsevier Science*, pp. 2944–2949.

Hantsis-Zacharov, E., and Halpern, M. (2007) "Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits", *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 7162–7168.

Hayaloglu, A. A., Yasar, K., Tolu, C., and Sahingil, D. (2013) "Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese", *Small Ruminant Research*, 113, pp. 187–194.

Hekken, D. L. V., Tunick, M. H., and Park, Y. W. (2004) "Rheological and proteolytic properties of Monterey Jack goat's milk cheese during aging", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 5372–5377.

Holle, M. J., Ibarra-Sánchez, L. A., Liu, X., Stasiewicz, M. J., and Miller, M. J. (2018) "Microbial analysis of commercially available US Queso Fresco", *Journal of Dairy Science*, 101, pp. 7736–7745.

Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., and Dugat-Bony, E. (2015) "Cheese rind microbial communities: Diversity, composition and origin", *FEMS Microbiology Letters*, 362, pp. 1–11.

Jo, Y., Benoist, D. M., Ameerally, A., and Drake, M. A. (2018) "Sensory and chemical properties of Gouda cheese", *Journal of Dairy Science*, 101, pp. 1967–1989.

Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., and Farag, M. A. (2019) "Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment", *Trends in Food Science and Technology*, 88, pp. 343–360.

Kinik, O., Kesenkaş, H., Ergönül, P., and Akan, E. (2017) "The effect of using pro and prebiotics on the aromatic compounds, textural and sensorial properties of symbiotic goat cheese", *Mljekarstvo*, 67, pp. 71 – 85

Kondyli, E., Pappa, E. C., and Svarnas, C. (2016) "Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese", *Small Ruminant Research*, 145, pp. 1–6.

Kongo, J. M., and Malcata, F. X. (2016a) "Cheese: Chemistry and Microbiology", *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 735–740.

Kongo, J. M., and Malcata, F. X. (2016b) "Cheese: Types of Cheeses - Hard" *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 763–767.

Kongo, J. M., Gomes, A. M., Malcata, F. X., and McSweeney, P. L. H. (2009) "Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge - a raw milk cheese from the Azores (Portugal)", *Food Chemistry*, 112, pp. 131–138.

Kuchroo, C. N., Rahilly, J., and Fox, P. F. (1983) "Assessment of Proteolysis in Cheese by Reaction with Trinitrobenzene Sulphonic Acid", *Irish Journal of Food Science and Technology*, 7, pp. 129–133.

Laguna, L., Farrell, G., Bryant, M., Morina, A., and Sarkar, A. (2016) "Relating rheology and tribology of commercial dairy colloids to sensory perception", *Food and Function*, 8, pp. 563–573.

Lima, F. (2019) "Estatísticas Agrícolas 2018", Edição anual, Lisboa, Portugal: Instituto Nacional de Estatística, I.P.

Macedo, A. C., Malcata, F. X., and Oliveira, J. C. (1993) "The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese: A Review", *Journal of Dairy Science*, 76, pp. 1725–1739.

Marino, M., Maifreni, M., and Rondinini, G. (2003) "Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria", *FEMS Microbiology Letters*, 229, pp. 133–140.

Marsili, R. T., Ostapenko, H., Simmons, R. E., and Green, D. E. (1981) "High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products", *Journal of Food Science*, 46, pp. 52–57.

McSweeney, P. L. H (2004) "Biochemistry of cheese ripening", *International Journal of Dairy Technology*, 57, pp. 127–144.

Medeiros, E. J. L., Queiroga, R. C. R. E., Medeiros, A. N., Bomfim, M. A. D., Batista, A. S. M., Félex, S. S. S., and Madruga, M. S. (2013) "Sensory profile and physicochemical parameters of cheese from dairy goats fed vegetable oils in the semiarid region of Brazil", *Small Ruminant Research*, 113, pp. 211–218.

- Meng, L., Liu, H., Dong, L., Zheng, N., Xing, M., Zhang, Y., Zhao, S., and Wang, J. (2018) "Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures", *Journal of Dairy Science*, 101, pp. 2897–2905.
- Miloradovic, Z., Kljajevic, N., Miocinovic, J., Tomic, N., Smiljanic, J., and Macej, O. (2017) "High heat treatment of goat cheese milk. The effect on yield, composition, proteolysis, texture and sensory quality of cheese during ripening", *International Dairy Journal*, 68, pp. 1–8.
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., and Berthier, F. (2014) "Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits", *International Journal of Food Microbiology*, 177, pp. 136–154.
- Panikuttira, B., O'Shea, N., Tobin, J. T., Tiwari, B. K., and O'Donnell, C. P. (2018) "Process analytical technology for cheese manufacture", *International Journal of Food Science and Technology*, 53, pp. 1803–1815.
- Park, Y. W., Jeanjulien, C., and Siddique, A. (2017) "Factors Affecting Sensory Quality of Goat Milk Cheeses: A Review", *Advances in Dairy Research*, 5, pp. 13–15.
- Park, Y. W. (2007) "Rheological characteristics of goat and sheep milk", *Small Ruminant Research*, 68, pp. 73–87.
- Pazzola, M., Stocco, G., Dettori, M. L., Bittante, G., and Vacca, G. M. (2019) "Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production", *Journal of Dairy Science*, 102, pp. 3947–3955.
- Pereira, C. I., Franco, M. I., Gomes, A. M. P., and Malcata, F. X. (2011) "Microbiological, rheological and sensory characterization of Portuguese model cheeses manufactured from several milk sources", *LWT - Food Science and Technology*, 44, pp. 2244–2252.
- Pereira, C. I., Neto, D. M., Capucho, J. C., Gião, M. S., Gomes, A. M. P., and Malcata, F. X. (2010) "How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants", *Journal of Dairy Science*, 93, pp. 1335–1344.
- Picon, A., López-Pérez, O., Torres, E., Garde, S., and Nuñez, M. (2019) "Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses",

International Journal of Food Microbiology, 299, pp. 8–22.

Picon, A., Garde, S., Ávila, M., and Nuñez, M. (2016) "Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses", *International Dairy Journal*, 58, pp. 14–22.

Pino, A., Liotta, L., Randazzo, C. L., Todaro, A., Mazzaglia, A., De Nardo, F., Chiofalo, V., and Caggia, C. (2018) "Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese", *Food Microbiology*, 70, pp. 143–154.

Plante, J., and Brookfield, D. "AMETEK Brookfield Product Catalog", *Brookfield Ametek*.

Polychroniadou, A. (1988) "A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese", *Journal of Dairy Research*, 55, pp. 585–596.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. (2013) "The complex microbiota of raw milk" *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp. 664–698.

Real, H., Barbosa, M., and Carvalho, T. (2018) "Queijos, dos frescos aos curados", E-book n° 48, Porto, Portugal: Associação Portuguesa de Nutrição.

Regulamento CE N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 "Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios", *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338.

Settanni, L., and Moschetti, G. (2010) "Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits", *Food Microbiology*, 27, pp. 691–697.

Silva, V., and Costa, M. (2017) "Rheology Applied to Dairy Products", *OMICS International*, 1, pp. 1–2.

Silva, D. V., Carlot, M., Pakroo, S., Tarrah, A., Lombardi, A., Santiago, H., Corich, V., and Giacomini, A. (2020) "Comparative evaluation of cheese whey microbial composition from four Italian cheese factories by viable counts and 16S rRNA gene amplicon sequencing", *International Dairy Journal*, 104, pp. 104656.

Shiota, M., Iwasawa, A., Suzuki-Iwashima, A., and Iida, F. (2015) "Effects of Flavor and Texture on the Sensory Perception of Gouda-Type Cheese Varieties during Ripening

Using Multivariate Analysis", *Journal of Food Science*, 80, pp. C2740–C2750.

Tabet, E., Mangia, N. P., Mouannes, E., Hassoun, G., Helal, Z., and Deiana, P. (2016) "Characterization of goat milk from Lebanese Baladi breed and his suitability for setting up a ripened cheese using a selected starter culture", *Small Ruminant Research*, 140, pp. 13–17.

Tidona, F., Meucci, A., Povolò, M., Pelizzola, V., Zago, M., Contarini, G., Carminati, D., and Giraffa, G. (2018) "Applicability of *Lactococcus hircilactis* and *Lactococcus laudensis* as dairy cultures", *International Journal of Food Microbiology*, 271, pp. 1–7.

Tirloni, E., Stella, S., and Bernardi, C. (2014) "Concerns about the microbiological quality of traditional raw milk cheeses: a worldwide issue", *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety*, 1, pp. 24–31.

Togay, S. O., Guneser, O., and Yuceer, Y. K. (2017) "Evaluation of physicochemical, microbiological, sensory properties and aroma profiles of goat cheeses provided from Canakkale", *International Journal of Dairy Technology*, 70, pp. 514–525.

Torkar, K. G., and Vengušt, A. (2008) "The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia", *Food Control*, 19, pp. 570–577.

Tornadijo, M. E., García, M. C., Fresno, J. M., and Carballo, J. (2001) "Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese", *Food Microbiology*, 18, pp. 499–509.

Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, and Febrisiantosa. A. (2014) "The role of lactic acid bacteria in milk fermentation", *Food and Nutrition Sciences*, 5, pp. 435–442.

Yoon, Y., Lee, S., and Choi, K. H. (2016) "Microbial benefits and risks of raw milk cheese", *Food Control*, 63, pp. 201–215.

Zárate, V., Belda, F., Pérez, C., and Cardell, E. (1997) "Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening", *International Dairy Journal*, 7, pp. 635–641.

Zhao, X., Zheng, Z., Zhang, J., Sarwar, A., Aziz, T., and Yang, Z. (2019) "Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine", *Food Science and Nutrition*, 7, pp. 1540–1550.

Zheng, Y., Liu, Z., and Mo, B. (2016) "Texture profile analysis of sliced cheese in

relation to chemical composition and storage temperature", *Journal of Chemistry*, 2016., pp. 1–10

Anexo I

Inquérito realizado aos estudantes, professores e funcionários da Universidade da Beira Interior

Análise sensorial - Queijo de Cabra (Lote 1,2,3)

Sexo: M ___ F ___ Idade: _____ Data: _____

Prove a amostra de queijo de cabra e classifique de acordo com a seguinte orientação para cada parâmetro:

- | | |
|----------------------------|------------------------|
| 1- Não gosto | 6- Gosto ligeiramente |
| 2- Não gosto muito | 7- Gosto moderadamente |
| 3- Não gosto moderadamente | 8- Gosto muito |
| 4- Não gosto um pouco | 9- Gosto extremamente |
| 5- Nem gosto, nem desgosto | |

• Aparência

1	2	3	4	5	6	7	8	9

• Odor

1	2	3	4	5	6	7	8	9

• Textura

1	2	3	4	5	6	7	8	9

• Sabor

1	2	3	4	5	6	7	8	9

• Teor de sal

1	2	3	4	5	6	7	8	9

• Comprava o produto

1	2	3	4	5

1- Certamente não compraria
2- Provavelmente não compraria
3- Talvez comprasse, talvez não comprasse
4- Provavelmente compraria
5- Certamente compraria

Obrigado pela sua disponibilidade!