

Microbiota de leite cru e de Queijos DOP da Região Centro: Beira Baixa, Rabaçal e Serra da Estrela

Joana Teixeira Dias

Relatório de estágio curricular realizado no Centro de Apoio Tecnológico Agro-
Alimentar (CATAA) para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Dra. Cristina Miguel Pintado
Professora Doutora Fernanda Domingues

outubro de 2021

Agradecimentos

Com a conclusão deste trabalho, quero agradecer a todos os que me apoiaram ao longo da sua realização.

Em primeiro lugar à minha orientadora, Dra. Cristina Miguel Pintado, por me ter aceiteado como sua estagiária e me ter guiado durante este último ano. O seu rigor, visão crítica e conhecimento científico foram fundamentais para concretização deste trabalho. À Prof.^a Doutora Fernanda Domingues que, ao longo da Licenciatura e Mestrado, me passou o “bichinho” da microbiologia e me levou a procurar um estágio na área.

Agradeço às Eng.^{as} Ana Silveira e Ana Riscado e ao Eng.^o Mário Cristóvão por me terem acompanhado no Laboratório de Microbiologia e recolha de amostras, por todos os conhecimentos transmitidos, companheirismo e o apoio que me deram. Trabalhar ao lado dos três foi um enorme privilégio e ensinou-me muito sobre trabalhar em equipa.

De seguida ao Centro Apoio Tecnológico Agro-Alimentar e ao seu Diretor Técnico Científico, Prof. Doutor António Moitinho Rodrigues, por me ter permitido realizar o estágio nas suas instalações e a todos os seus colaboradores, que me receberam tão bem.

À Sofia, Rodrigo, Rita e Pedro, por todo o apoio e força durante as alturas mais difíceis.

Um obrigada gigante aos meus pais, ao meu irmão e aos meus padrinhos, por todos os sacrifícios e obstáculos superados durante o meu percurso académico, este trabalho é para vocês.

Por último o agradecimento mais importante, ao meu Luís. Por teres lido este trabalho tantas vezes quanto eu, pelo apoio incondicional e por me fazeres querer ser a melhor versão de mim todos os dias. Devo-te tudo.

Muito obrigada.

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



Resumo

Este trabalho, integrado no Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro, teve como objetivos avaliar a qualidade do leite cru utilizado no fabrico de queijos e dos Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo (QBB), Queijo Rabaçal DOP (QR) e Queijo Serra da Estrela DOP (QSE).

Nas unidades produtoras de leite foram recolhidas 406 amostras de leite cru (363 de ovelha e 43 de cabra), 56 queijos (17 QBB, 11 QR e 28 QSE) e realizados questionários para as caracterizar sumariamente. A avaliação da qualidade microbiológica de leite cru incluiu contagens de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) de mesófilos, psicotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli* β -glucuronidase positiva, leveduras e bolores. Por sua vez, a caracterização da microbiota das crostas e massas dos Queijos DOP da Região Centro incluiu a quantificação de bactérias lácticas, psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β -glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positivas, *Clostridium perfringens*, leveduras e bolores, e da pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*.

No que concerne ao leite cru produzido nas regiões definidas, todas as médias geométricas das amostras com origem no Rabaçal (4,8 log UFC mL⁻¹), 92% (5,0 log UFC mL⁻¹) Serra da Estrela e 67% para Beira Baixa (5,5 log UFC mL⁻¹) estavam em conformidade com o limite legal ($\leq 5,7$ log UFC mL⁻¹, Regulamento (CE) N.º 1662/2006), existindo oportunidade para a melhoria da qualidade microbiológica dos leites produzidos para o fabrico de QSE e QBB. Os resultados obtidos para psicotróficos mostraram qualidade microbiológica satisfatória (3,7-4,7 log UFC mL⁻¹), enquanto que para coliformes (2,5-3,4 log UFC mL⁻¹) e *E.coli* (1,0-2,1 log UFC mL⁻¹) indiciam a necessidade de implementação de boas práticas de higiene.

Os resultados da análise dos Queijos DOP da Região Centro indicam conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1441/2007. Os microrganismos predominantes na crosta e na massa dos queijos foram as bactérias lácticas (8,4 log UFC g⁻¹), seguidas de psicotróficos (8,0 e 7,6 log UFC g⁻¹, respetivamente), enterobactérias (5,0 e 4,7 log UFC g⁻¹), bactérias coliformes (5,1 e 4,4 log UFC g⁻¹) e leveduras (5,7 e 4,1 log UFC g⁻¹). Os valores médios encontrados para a crosta e para a massa foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$), excetuando as contagens de leveduras (5,7 e 4,1 log UFC g⁻¹) e de bolores (2,8 e 1,6 log UFC g⁻¹), com preponderância significativa ($p < 0,05$) na crosta (5,7 e 2,8 log UFC g⁻¹).

Palavras-chave:

Qualidade microbiológica; leite cru; queijos produzidos com leite cru; Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo; Queijo Rabaçal DOP; Queijos Serra da Estrela DOP

Abstract

This curricular internship report is intended to present the work done at the microbiology laboratory of the Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), in Castelo Branco, which was integrated into the Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro. This work has been aimed at assessing the quality of raw milk used in the manufacture of cheese and of the Beira Baixa DOP tipo Amarelo cheese (QBB), Rabaçal DOP cheese (QR) and Serra da Estrela DOP cheese (QSE).

Were collected on raw milk producing farms 406 samples of raw milk (363 sheep and 43 goat), 56 cheeses (17 QBB, 11 QR and 28 QSE) and questionnaires were carried out to summarize them. The assessment of the microbiological quality of raw milk included colony forming units (CFU) counts of mesophilic microorganisms, psychrotrophic, *Pseudomonas* spp., coliform bacteria, *Escherichia coli* β -glucuronidase positive, yeasts and molds. The characterization of PDO Cheeses from the Central Region was carried out through the quantification of lactic acid bacteria, psychrotrophic microorganisms, enterobacteria, coliform bacteria, *E.coli* β -glucuronidase positive, coagulase positive staphylococci, *Clostridium perfringens*, yeasts and moulds, and detection *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

With regard to raw milk produced in the defined regions, all geometric means of samples originating in Rabaçal ($4.8 \log \text{CFU mL}^{-1}$), 92% ($5.0 \log \text{CFU mL}^{-1}$) of Serra da Estrela and 67% of Beira Baixa ($5.5 \log \text{CFU mL}^{-1}$) were in compliance with the legal limit ($\leq 5.7 \log \text{CFU mL}^{-1}$, Regulation (EC) No. 1662/2006), so there is an opportunity to improve the microbiological quality of milk produced for the manufacture of QSE and QBB. The results obtained for psychrotrophics showed satisfactory microbiological quality ($3.7\text{-}4.7 \log \text{CFU mL}^{-1}$), while for coliforms ($2.5\text{-}3.4 \log \text{CFU mL}^{-1}$) and *E.coli* ($1.0\text{-}2.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$), indicate the need to implement good hygiene practices.

The results of the analysis of the PDO cheeses from the Center Region indicate conformity with Regulation (EC) No 1441/2007. The microorganisms predominant in the rind and mass of these cheeses were lactic bacteria ($8.4 \log \text{UFC g}^{-1}$), followed by psychrotrophics (8.0 and $7.6 \log \text{UFC g}^{-1}$ respectively), enterobacteria (5.0 and $4.7 \log \text{UFC g}^{-1}$) and coliform bacteria (5.1 and $4.4 \log \text{UFC g}^{-1}$). The average values found for rind and mass were statistically similar ($p \geq 0.05$), except yeast counts (5.7 and $4.1 \log \text{UFC g}^{-1}$) and moulds (2.8 and $1.6 \log \text{UFC g}^{-1}$), with significant preponderance ($p < 0.05$) in the rind (5.7 and $2.8 \log \text{UFC g}^{-1}$).

Keywords:

Microbiological quality; raw milk; cheeses made from raw milk; Beira Baixa PDO tipo Amarelo cheese; Rabaçal PDO cheese; Serra da Estrela PDO cheeses

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - LOCAL DE ESTÁGIO E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	3
2.1. Laboratório de Microbiologia.....	3
2.2. Atividades desenvolvidas	4
2.2.1. Organização do material de laboratório	4
2.2.2. Monitorização da qualidade do ar, da água e da eficácia da limpeza das superfícies	4
2.2.3. Preparação de meios de cultura	5
2.2.4. Determinações microbiológicas	6
CAPÍTULO 3 - ENQUADRAMENTO TEÓRICO	10
3.1 Queijos DOP da Região Centro	10
3.1.1. Produção, comercialização e consumo.....	11
3.1.2. Áreas geográficas de produção	14
3.1.3. Matérias-primas.....	16
3.1.4. Processo de fabrico.....	19
3.1.5. Características dos queijos.....	25
3.2 Diversidade microbiológica em leite cru e queijo	30
3.2.1. Qualidade microbiológica em leite cru	37
3.2.2. Qualidade microbiológica em queijo fabricado com leite cru	42
CAPÍTULO 4 - OBJETIVOS	47
CAPÍTULO 5 - MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. Caracterização sumária das explorações leiteiras	48
5.2. Qualidade microbiológica de leite cru e de queijo	48
5.2.1 Recolha de amostras de leite cru e de queijo.....	48
5.2.2. Análises microbiológicas em amostras de leite cru e de queijo.....	52
5.3. Tratamento estatístico dos dados.....	55
CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56

6.1. Caracterização sumária das explorações leiteiras	56
6.2. Qualidade microbiológica do leite cru.....	57
6.2.1. Microrganismos mesófilos em leite cru.....	57
6.2.2 Outros indicadores microbiológicos de qualidade em leite cru	62
6.2.3 Qualidade microbiológica do leite cru de ovelha	66
6.2.4 Boas práticas para melhorar a qualidade microbiológica do leite.....	70
6.3. Qualidade microbiológica dos Queijos DOP da Região Centro	71
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES	82
CAPÍTULO 8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA	86
ANEXO I	98
ANEXO II.....	100
ANEXO III.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Testes API® 20E: exemplos de resultados negativos e positivos.	9
Figura 3.1 - Áreas geográficas definidas para produção do Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.	15
Figura 3.2 - Fluxograma de fabrico de queijo.	19
Figura 3.3 - Selos que constam nos rótulos dos Queijos DOP da Região Centro.	24
Figura 5.1 - Recipiente utilizado na recolha de amostras de leite.	49
Figura 5.2 - Recolha de amostra de leite no tanque de refrigeração com agitação.	49
Figura 5.3 - Localização das explorações agrícolas onde foram recolhidas as amostras de leite.	50
Figura 6.1 - Média geométrica das contagens de mesófilos em leite cru utilizado no fabrico de queijos DOP da Região Centro.	59
Figura 6.2 - Valores médios e desvios padrão da média geométrica das contagens de mesófilos e das contagens de mesófilos em leite cru, utilizado no fabrico de Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.	60
Figura 6.3 - Percentagem de amostras com contagem de mesófilos igual ou inferior a 5,7 log UFC mL ⁻¹ , considerando a média geométrica, de pelo menos duas contagens em dois meses, e as contagens.	61
Figura 6.4 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de psicrotróficos, <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , leveduras e bolores em leite cru, utilizado no fabrico de Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.	62
Figura 6.5 - Contagens de microrganismos psicrotróficos em leite cru, recolhido nas regiões da Beira Baixa, Rabaçal e Serra da Estrela.	63
Figura 6.6 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de psicrotróficos, <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , leveduras e bolores em leite cru de ovelha utilizado no fabrico nos Queijos DOP da Região Centro.	67
Figura 6.7 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro.	74

Figura 6.8 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na crosta de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, de Queijo do Rabaçal DOP e de Queijo Serra da Estrela DOP.....	75
Figura 6.9 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na massa de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, de Queijo do Rabaçal DOP e de Queijo Serra da Estrela DOP.....	76
Figura 6.10 - Contagens de <i>E.coli</i> em crosta e massa de Queijos DOP da Região Centro.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Testes de confirmação microbiológicos.....	7
Tabela 3.1 - Número de explorações abastecedoras de leite, de queijarias e produção de Queijos DOP da Região Centro de Portugal.....	12
Tabela 3.2 - Mercado de destino de Queijos DOP da Região Centro de Portugal.....	12
Tabela 3.3 - escoamento dos Queijo DOP da Região Centro de Portugal no mercado nacional.....	13
Tabela 3.4 - Preço de queijos da Região Centro de Portugal: queijo certificado <i>versus</i> queijo não certificado.	13
Tabela 3.5 - Matérias-primas utilizadas no fabrico de Queijos DOP da Região Centro.	16
Tabela 3.6 - Temperatura e período de coagulação dos Queijos DOP da Região Centro.	21
Tabela 3.7 - Temperatura, humidade e período mínimo de cura dos Queijo DOP da Região Centro.....	23
Tabela 3.8 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo.....	25
Tabela 3.9 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco.	26
Tabela 3.10 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante.....	27
Tabela 3.11 - Principais características do Queijo Rabaçal DOP.	28
Tabela 3.12 - Principais características do Queijo Serra da Estrela DOP.....	29
Tabela 3.13 - Parâmetros microbiológicos observados em amostras de leite cru: mesófilos, bactérias lácticas, psicrotróficos, <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , leveduras e bolores.	40
Tabela 3.14 - Parâmetros microbiológicos observados em amostras de queijos fabricados com leite cru: estafilococos coagulase positiva, bactérias lácticas, enterobactérias, bactérias coliformes e leveduras.....	45
Tabela 5.1 - Planificação de recolha de amostras de leite e de queijo.....	51
Tabela 5.2 - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de leite cru.....	53

Tabela 5.3 - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de queijo.....	54
Tabela 6.1 - Coeficientes de <i>Pearson</i> para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados em leite cru: mesófilos, psicrotróficos, <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , leveduras e bolores.....	65
Tabela 6.2 - Coeficientes de <i>Pearson</i> para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados em leite cru de ovelha: mesófilos, psicrotróficos, <i>Pseudomonas</i> spp., bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , leveduras e bolores.....	70
Tabela 6.3 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de estafilococos coagulase positiva, em crosta e massa, e resultados das pesquisas de <i>Salmonella</i> spp. e de <i>Listeria monocytogenes</i> nos Queijos DOP da Região Centro.	72
Tabela 6.4 - Coeficientes de <i>Pearson</i> para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na crosta dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos, leveduras e bolores.	79
Tabela 6.5 - Coeficientes de <i>Pearson</i> para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na massa dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos, leveduras e bolores.	80
Tabela 6.6 - Coeficientes de <i>Pearson</i> para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, <i>E.coli</i> , estafilococos, leveduras e bolores.....	80

LISTA DE ACRÓNIMOS

ANCOSE	Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela
APQDCB	Associação dos Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco
APRORABAÇAL	Associação de Produtores Rabaçal
a_w	Atividade da água
BP+RPF	<i>Baird-Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen Agar</i> ;
CATAA	Centro Apoio Tecnológico Agro-Alimentar
CE	Comissão Europeia
COAPE	Cooperativa Agro-pecuária dos Agricultores de Mangualde
DGADR	Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DG18	<i>Dichloran Glycerol Chloramphenicol Agar</i>
DOP	Denominação de Origem Protegida
DR	Diário da República
DRBC	<i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i>
EstrelaCOOP	Cooperativa dos Produtores de Queijo Serra da Estrela
ETG	Especialidade Tradicional Garantida
IGP	Indicação Geográfica Protegida
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
LBB1 – LBB5	Leite da Beira Baixa (produtores de 1 a 5)
LR1 – LR2	Leite Rabaçal (produtores 1 e 2)
LSE1 – LSE9	Leite Serra da Estrela (produtores de 1 a 9)
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe Agar</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PPA	<i>Penicillin and Pimaricin Agar</i> ;
QBB1	Queijo da Beira Baixa

QR1	Queijo Rabaçal
QSE1 – QSE3	Queijo Serra da Estrela (produtores de 1 a 3)
TBX	<i>Tryptone Bile Agar</i>
TSC	<i>Tryptose Sulfite Cycloserine Aga</i>
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colónia
VRBG	<i>Violet Red Bile Glucose</i>
VRBL	<i>Violet Red Bile Lactose Agar</i>

LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Coautoria de poster apresentado na International Conference on Multidisciplinary Research: Pintado, C. M., Resende, A. M., Silveira, A., Beato, H., **Dias, J.**, Cristóvão, M., Riscado, A., Paulo, L., Rodrigues, A. M. (2021). Assessment of raw sheep milk quality used in the production of protected designation of origin cheeses in the center region of Portugal. *Millenium*, 2(ed espec nº8), 94-94. (Anexo I).

Capítulo 1 - Introdução

O estágio final de Mestrado em Biotecnologia foi realizado no Laboratório de Microbiologia no Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), em Castelo Branco, sob orientação da Doutora Cristina Miguel Pintado. O CATAA fornece apoio tecnológico, desenvolvimento e inovação ao sector agroalimentar, dispondo de três unidades laboratoriais (Microbiologia, Físico-química e Análise Sensorial) e quatro unidades piloto (Lácteos, Cárneos, Azeites e Hortofrutícolas).

Integrado no Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro, que tem como objetivo principal “sustentar e alavancar a tendência crescente no mercado pela procura de produtos agroalimentares de qualidade diferenciada, dotando a fileira do queijo das competências e meios necessários ao aumento da produção certificada (Denominação de origem Protegida - DOP)”, o estágio centrou-se na caracterização da microbiota de leite cru utilizado na produção de Queijos DOP da Região Centro e da microbiota desses queijos, em particular o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.

Paralelamente, este momento do percurso académico visa promover uma experiência em contexto laboral, permitindo a aquisição e aprofundamento de competências práticas e transversais relacionadas com a área da Biotecnologia e a valorização do *curriculum vitae*. A sua realização teve o propósito de adquirir e consolidar competências, aplicar conhecimentos adquiridos, comunicar de forma oral e escrita de modo eficiente, gerir e procurar informação útil para o desenvolvimento de competências, adaptar a novas situações, trabalhar para obter autonomia nas tarefas a desenvolver, trabalhar em grupo e garantir preocupação com a qualidade do trabalho a realizar.

Numa primeira fase do estágio, realizou-se o Enquadramento teórico, envolvendo as temáticas Queijos DOP da Região Centro e Diversidade microbiológica em leite cru e queijo, que decorreu, maioritariamente, num período de mobilidade condicionada decorrente da pandemia da COVID-19. De seguida, surgiu a etapa de acompanhamento de Recolha de amostras de leite e de queijo e de realização de um questionário para Caracterização sumária das unidades de produção de leite. Já no Laboratório de Microbiologia, foram analisadas amostras de leite e de queijo, inicialmente sob a supervisão atenta das técnicas e, posteriormente, de forma autónoma. Os dados recolhidos antes do estágio e durante este período foram objeto de tratamento estatístico.

No decorrer do estágio, foi redigido o presente relatório em que também são apresentados Resultados e Discussão e Conclusões.

Capítulo 2 - Local de Estágio e Atividades Desenvolvidas

Este trabalho desenvolveu-se no Laboratório de Microbiologia do Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar (CATAA) em Castelo Branco, no âmbito do Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro, com o objetivo específico de avaliar a qualidade microbiológica dos Queijos DOP da Região Centro e do leite cru usado na sua produção.

A Associação Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar de Castelo Branco, constituída em julho de 2010, é uma associação detida pelo Município de Castelo Branco, Instituto Politécnico de Castelo Branco e Associação do Cluster Agroindustrial do Centro (InovCluster), que faz a gestão do CATAA - Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar e do CEi - Centro de Empresas Inovadoras. O CATAA tem três unidades laboratoriais (Microbiologia, Físico-química e Análise Sensorial) e quatro unidades piloto (Lácteos, Cárneos, Azeites e Hortofrutícolas), que apoiam a prestação de serviços à comunidade e a participação em linhas de investigação aplicada no desenvolvimento de produtos.

2.1. Laboratório de Microbiologia

O Laboratório de Microbiologia é constituído por áreas bem definidas, designadamente de preparação de meios de cultura, preparação de alimentos, sementeira, incubação, leitura de resultados e lavagem e descontaminação de material. A conceção desta unidade laboratorial teve em conta um *layout* que cumpre o princípio da marcha em frente, de forma a minimizar a ocorrência de contaminações cruzadas, complementado por filtros de ar HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) e sistema de contenção de contaminações por pressão diferencial. Entre outros equipamentos, este laboratório está equipado com máquina para lavar material de laboratório, unidade de produção de água purificada tipo II, balanças, autoclaves, banho termostaticado, câmaras de fluxo laminar de segurança biológica classe II, agitador peristáltico e estufas. Preferencialmente, as metodologias implementadas para pesquisas e contagens de microbiota em géneros alimentícios e superfícies são as definidas pela *International Standardization Organization* (ISO).

Durante o estágio, ocorreu um envolvimento em todas as tarefas da marcha analítica, desde controlos ambientais, preparação de meios de cultura de amostras, de diluições decimais sucessivas, inoculações, incubações, contagens, testes de confirmação, identificações bioquímicas de microrganismos (galerias API® - Analytical Profile Index), limpeza e organização do laboratório.

2.2. Atividades desenvolvidas

2.2.1. Organização do material de laboratório

O material utilizado no Laboratório de Microbiologia passa sempre pela sala de descontaminação e lavagem, equipada com autoclave, máquina para lavar material de laboratório, unidade de produção de água com dispensador e estufa de secagem. Qualquer material que contacte com amostras é submetido a descontaminação, em autoclave, antes de ser lavado na máquina, com detergentes ácidos e alcalinos e enxaguamento final com água purificada tipo II, seguido de secagem na estufa. Após a secagem, no caso de ser necessária esterilização, o material é encaminhado para a sala de preparação dos meios de cultura, local onde é devidamente embalado em sacos de esterilização individuais, identificado e submetido a novo ciclo em autoclave. Após o ciclo de esterilização, o material é seco na estufa e arrumado nos respetivos armários e gavetas, que se encontram devidamente identificados, nas diferentes salas do laboratório.

Para a verificação da eficiência do ciclo de esterilização são utilizados indicadores biológicos e químicos. O indicador biológico (ampola) é colocado na autoclave no primeiro ciclo diário de esterilização e posteriormente incubado a 60°C. Se o ciclo de esterilização for adequado não se dá alteração da cor do indicador. Caso o ciclo não seja eficaz, dá-se uma mudança de cor de violeta para amarelo-alaranjado. O indicador químico consiste numa fita adesiva listada, que muda de cor branca para preta quando sujeita à esterilização.

2.2.2. Monitorização da qualidade do ar, da água e da eficácia da limpeza das superfícies

Diariamente, realizam-se controlos ambientais da qualidade do ar nas áreas de trabalho utilizadas, como câmaras de fluxo laminar e salas de preparação de meios e de alimentos, através da exposição de uma placa de Petri com meio de cultura durante 30 min, para a

enumeração de microrganismos a 30°C. Adicionalmente, executam-se controlos ambientais mensais, através da contagem de microrganismos a 30°C e contagem de bolores e leveduras a 25°C.

O laboratório está equipado com um sistema de produção de água purificada tipo II e dois dispensadores (Elix® Advantage V e E-POD®, Millipore) que combina a filtração, a osmose inversa, a eletrodesionização e a radiação ultravioleta (254 nm), produzindo água adequada à preparação de meios de cultura. Mensalmente, a qualidade da água é avaliada através da contagem de microrganismos a 22°C e leitura da resistividade.

Mensalmente, verifica-se a eficácia da limpeza das superfícies das bancadas de cada sala, nas câmaras de fluxo laminar (parede e superfície de trabalho) e estufas, através de recolha de amostras com zaragatoa e inoculação em meio de cultura não seletivo, para a contagem de microrganismos mesófilos.

2.2.3. Preparação de meios de cultura

No Laboratório de Microbiologia do CATAA, a preparação de meios de cultura inicia-se com a organização da folha de acompanhamento, onde constam os meios a preparar, o lote, o volume do frasco a utilizar, a quantidade a medir e o volume de água necessário para a hidratação de cada meio. Antes de iniciar a tarefa, realiza-se a desinfeção das superfícies com álcool etílico 70% (v/v), a verificação da balança, através da verificação do nivelamento, do zero e de uma massa calibrada, e a preparação e identificação de todo o material necessário. Os recipientes onde são preparados os meios de cultura são identificados com o indicador químico, onde se escreve a sigla do meio de cultura (definida pelo laboratório) e o lote de preparação (ano, mês e dia). Após a pesagem e hidratação, os meios são sujeitos a um ciclo de esterilização na autoclave (geralmente 121°C durante 20 minutos). Posteriormente, os meios de cultura seguem para um banho de água (44-47°C), onde podem permanecer no máximo quatro horas, antes de serem inoculados ou distribuídos em tubos ou placas de Petri. No caso dos meios de cultura com substância termolábeis, que não podem ir à autoclave, são preparados no microondas em frascos esterilizados; no laboratório foi definida uma folha de instrução em que constam o tempo e potência a utilizar para cada meio de cultura. Realiza-se o controlo de qualidade do meio de cultura, considerando a apreciação visual, a medição do pH e a execução de controlos microbiológicos.

2.2.4. Determinações microbiológicas

Durante o estágio realizaram-se determinações microbiológicas em leite e queijo, recorrendo a metodologias definidas pela *International Standardization Organization* (ISO). Na receção das amostras, é introduzida a informação no sistema de gestão e procede-se à sua codificação e medição da temperatura. Na sala de preparação de alimentos, equipada com balança, bicos de Bunsen, agitador peristáltico e todo o material necessário, faz-se a preparação da suspensão inicial. Na sala da sementeira são efetuadas as diluições decimais sucessivas das amostras e as respetivas inoculações, através de técnicas como incorporação (por camada simples ou dupla), por espalhamento à superfície e por esgotamento com ansa. Após inoculação, as placas de Petri seguem para a sala de incubação, equipada com várias estufas a diferentes temperaturas. Por fim, é feita a contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), de acordo com a ISO de cada parâmetro microbiológico, seguida da validação dos valores obtidos nas diluições decimais consideradas e nos ensaios paralelos (ISO 7218:2007). Os resultados são expressos em UFC mL⁻¹, quando a matriz é líquida, e em UFC g⁻¹, quando esta não é líquida; a validação final do resultado é da proficiência do Responsável Técnico.

Na matriz leite foram realizadas determinações microbiológicas de microrganismos mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva, leveduras e bolores. Já para a matriz queijo realizaram-se contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β-glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positivas (previsto no Regulamento (CE) N.º 1441/2007), leveduras, bolores e *Clostridium perfringens*. Efetuou-se ainda a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Regulamento (CE) N.º 1441/2007) nas amostras de queijo.

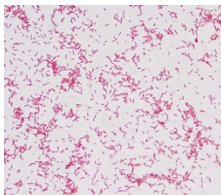
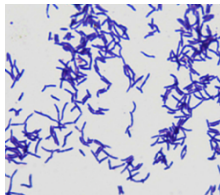
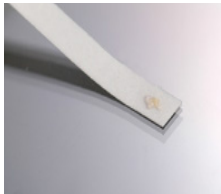
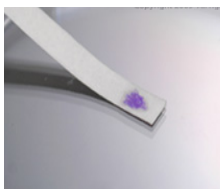



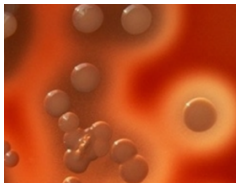

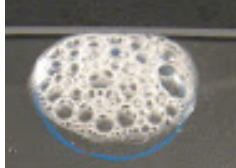
Alguns parâmetros microbiológicos executados carecem de testes de confirmação de colónias previamente isoladas, como coloração Gram, testes oxidase, fermentação da glucose, hemólise e catalase (Tabela 2.1) e identificação através das galerias API® (*Analytical Profile Index*), algumas das quais foram efetuadas ao longo deste período de trabalho no Laboratório de Microbiologia no CATAA.

A coloração diferencial Gram, que depende da parede celular das bactérias e da camada de peptidoglicano presente, determina se a colónia testada é Gram positiva ou Gram negativa. Para a sua execução, prepara-se um esfregaço numa lâmina com água destilada (ou solução salina a 0,85%) e a colónia a testar, fazendo-se a adição consecutiva de reagentes: cristal de violeta, soluto de Lugol, etanol a 90% e safranina. A coloração

rosa/vermelho confirma uma bactéria Gram negativa e a coloração azul/violeta revela uma bactéria Gram positiva.

O teste de oxidase determina a presença ou ausência da enzima citocromo C oxidase. Com uma ansa esfrega-se uma colônia na tira e após o período definido pelo fabricante observa-se se existiu alteração de cor; caso haja uma alteração de cor (por exemplo, para roxo-acastanhado) o resultado é positivo, mas se não houver mudança de cor o resultado é negativo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Testes de confirmação microbiológicos.

Teste de confirmação	Negativo	Positivo
Coloração Gram		
Oxidase		
Fermentação da glucose		
Hemólise		
Catalase		

Fontes das imagens (accedidas a 2/07/2021): <https://microbiologyinfo.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-pictures/>; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>; <http://microbesinfo.com/2013/05/catalase-test-a-test-to-differentiate-staphylococcus-and-streptococcus/>.

A prova de fermentação da glucose, teste também baseado em mudança de cor, é realizada em tubos com meio de cultura, confirmando-se positividade se houver uma mudança de cor de roxo para amarelo, como apresentado na Tabela 2.1. Para este teste, o tubo é inoculado com uma colónia através de uma ansa introduzida no centro do tubo, seguindo-se a incubação cujo tempo e temperatura estão dependentes do microrganismo a testar. A alteração da cor do meio confirma a capacidade da fermentação da glucose pelo microrganismo testado.

Outra prova de confirmação executada foi a hemólise, que se confirma se ocorrer a lise das hemácias do meio de cultura e se se formar um halo translúcido em volta da colónia. Este teste é realizado em placas com sangue e, como se vê na Tabela 2.1, se for positivo é possível observar a formação de halo (zona translúcida) em torno das colónias.

Para realizar o teste da catálase, utiliza-se peróxido de hidrogénio; se ocorrer a formação de gás o resultado é positivo. Este teste baseia-se na presença da enzima catalase que realiza metabolismo aeróbio, clivando o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio.

A identificação através das galerias API[®] é feita através da realização de uma série de testes bioquímicos que permite obter um perfil comparável com uma base de dados. Em cada teste é avaliado se a reacção é positiva (+) ou negativa (-) e os valores positivos são somados para obter um perfil numérico que será comparado com a base de dados. Para a realização do teste API[®] 20E (para identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos não fastidiosos) foi primeiramente feito o isolamento das colónias a testar em meio de cultura apropriado para o seu crescimento, sendo aconselhada a utilização de cultura recentes (18-24h). De seguida foi efetuada a suspensão de uma colónia bem isolada e por fim procedeu-se à inoculação das galerias de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação da galeria a 36°C, durante 18 a 24h, foi feita a leitura e interpretação dos resultados, de acordo com o quadro de leitura facultado pelo fornecedor. Na Figura 2.1 pode observar-se um exemplo de teste API[®] 20E com todos os testes bioquímicos com resultados negativos e positivos.



Figura 2.1 - Testes API® 20E: exemplos de resultados negativos e positivos.

Fonte das imagens (accedidas a 2/07/2021):

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwis7p32_b3yAhWXQkEAHSwbDIIQFnoECACQAQ&url=https%3A%2F%2Fmedia.tghn.org%2Farticles%2FBacterial_Identification_API_Kits.docx&usg=AOvVaw38TaHTFriUUpXYljWe9-Jg

Capítulo 3 - Enquadramento Teórico

3.1 Queijos DOP da Região Centro

A produção de queijos com leite cru de pequenos ruminantes faz parte da herança cultural de países como Portugal, particularmente em zonas rurais empobrecidas e com uma população reduzida (Freitas e Malcata 2000). A União Europeia (UE) desenvolveu uma política de qualidade, com o intuito de proteger os produtos tradicionais e promover as características únicas ligadas à sua origem geográfica, bem como ao saber-fazer tradicional.

Foram instituídos regimes de qualidade, Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG), que visam garantir uma proteção uniforme das denominações, o direito de propriedade intelectual e uma valorização justa para os agricultores e produtores, tendo em conta as qualidades e características de um dado produto ou do seu modo de produção (CE 2012; DGADR 2019). Estas denominações podem ser um fator contributivo para a promoção destes produtos, através da garantia aos consumidores sobre as suas características e origem, que lhe conferem uma mais-valia, sendo também um apoio para as zonas rurais menos favorecidas, através do incremento dos lucros dos produtores e da fixação de população nestas zonas, aumentando assim a procura de mão de obra especializada (CE 2012; Tibério e Diniz 2012; Tedeschi et al. 2013).

Em fevereiro de 2021 estavam registados na UE 185 Queijos DOP, dos quais 13 eram portugueses (CE 2021), fazendo parte destes os Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, tipo Castelo Branco e tipo Picante, o Queijo Rabaçal DOP e o Queijo Serra da Estrela DOP.

No caso dos Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, tipo Castelo Branco e tipo Picante o estatuto DOP foi atribuído no Decreto Regulamentar 22/88 de 5 de maio, o Queijo Rabaçal DOP adquiriu o estatuto no Despacho 12/94 do Diário da República de Janeiro de 1994 e o Queijo Serra da Estrela DOP no Decreto Regulamentar 42/85 de 5 de junho. O primeiro registo na União Europeia ocorreu em 1996, no Regulamento (CE) N^o 1107/96, decretando que estes Queijos DOP apenas podem ser produzidos numa zona geográfica delimitada, de acordo com os costumes locais e cumprindo a regulamentação sanitária em vigor. Cada um destes produtos tem um Caderno de Especificações, onde consta a sua descrição, a área geográfica e as condições de produção; estes cadernos são

redigidos por Agrupamentos de Produtores e o seu cumprimento permite que o produto receba o selo de certificação e seja comercializado com a autenticação DOP.

Os Agrupamentos de Produtores fazem os pedidos de registo de denominações, redação e possíveis alterações nos Cadernos de Especificações, desenvolvem atividades relacionadas com a fiscalização e proteção das denominações registadas, verificam a conformidade da produção de acordo com os Cadernos de Especificações e promovem as denominações registadas (CE 2012). Estão também nomeados organismos de controlo que têm como função, efetuar o acompanhamento e realizar o controlo periódico dos produtos certificados. Relativamente aos Queijos da Beira Baixa DOP, os produtores de leite pertencem à Associação dos Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco (APQDCB) e a Beira Tradição é o organismo de controlo. O Queijo Serra da Estrela DOP é controlado pela Beira Tradição e os produtores são associados da Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela (ANCOSE), da Cooperativa Agro-pecuária dos Agricultores de Mangualde (COAPE) ou da Cooperativa dos Produtores de Queijo Serra da Estrela (EstrelaCOOP). Já os produtores do Queijo Rabaçal DOP são associados da Cooperativa de Produtores do Queijo Rabaçal (APRORABAÇAL) e o organismo de controlo é a Codimaco - Certificação e Qualidade, Lda.

3.1.1. Produção, comercialização e consumo

Em 2018, na UE, foram transformados 156,8 milhões de toneladas de leite em produtos lácteos e produzidos 10,3 milhões de toneladas de queijo. A Alemanha foi o maior produtor de queijo entre os Estados-Membros (2,2 milhões de toneladas, 22% do total da UE), seguida da França (1,9 milhões de toneladas, 19% do total da UE) e da Itália (1,3 milhões de toneladas, 13% do total da UE) (Eurostat 2020). Em 2019, Portugal ocupava o 22º lugar na lista de produtores de queijo na União Europeia, tendo sido o 5º maior produtor de queijo de ovelha (ficando atrás da Itália, Espanha, França e Bulgária), e o 6º maior produtor de queijo de cabra (atrás da França, Espanha, Holanda, Bélgica e Itália) (Eurostat 2019).

O sector dos queijos e produtos à base de leite perfazem 2% da produção nacional de produtos DOP/IGP. Das 83 972 toneladas de queijo produzido em Portugal, em 2019, 1 952 toneladas (2%) foram de Queijos DOP, correspondente a uma receita de 15 743 612€ (DGADR 2019). No que concerne a Região Centro, 46% corresponde a Queijo Serra da Estrela DOP, 28% a Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, 13% a Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco, 9% a Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante e 4% a Queijo Rabaçal DOP. O Queijo Serra da Estrela DOP foi o que apresentou maior número

de explorações leiteiras (134) e de queijarias em funcionamento (38), totalizando uma produção de 129 603 kg (Tabela 3.1) (DGADR 2019).

Tabela 3.1 - Número de explorações abastecedoras de leite, de queijarias e produção de Queijos DOP da Região Centro de Portugal.

Queijos DOP da Região Centro		Número de explorações abastecedoras de leite	Número de Queijarias	Produção (kg)
Queijo da Beira Baixa DOP	tipo Amarelo	96	5	78 803
	tipo Castelo Branco	70	5	36 255
	tipo Picante	96	5	26 075
Queijo Rabaçal DOP		11	4	11 612
Queijo Serra da Estrela DOP		134	38	129 603

Fonte: DGADR (2019).

A comercialização dos Queijos DOP da Região Centro destina-se, preferencialmente, ao mercado nacional (90%) e apenas 2-5% é comercializado no concelho de produção. A exportação de cada tipologia do Queijo da Beira Baixa DOP representa 5% da comercialização total e está direcionada para França. No caso do Queijo Serra da Estrela DOP, a exportação perfaz 8% da comercialização e está direcionada para Reino Unido, Espanha, Luxemburgo e Brasil, para além da França (Tabela 3.2). A fonte consultada não apresentava informações relativas ao Queijo Rabaçal (DGADR 2019).

Tabela 3.2 - Mercado de destino de Queijos DOP da Região Centro de Portugal.

Queijos DOP da Região Centro		Mercado (%)			Países de exportação
		Local ¹	Nacional ²	Internacional	
Queijo da Beira Baixa DOP	tipo Amarelo	5	90	5	França
	tipo Castelo Branco	5	90	5	França
	tipo Picante	5	90	5	França
Queijo Rabaçal DOP		-	-	-	-
Queijo Serra da Estrela DOP		2	90	8	França, Reino Unido, Espanha, Luxemburgo, Brasil

¹Local – concelhos de produção; ²Nacional - exterior ao local; Fonte: DGADR (2019).

No mercado nacional, a comercialização dos Queijo DOP da Região Centro é feita, na sua maioria, através de grandes superfícies, representando 90% para o Queijo da Beira Baixa DOP e 81% para o Queijo Serra da Estrela DOP (Tabela 3.3) (DGADR 2019).

Tabela 3.3 - escoamento dos Queijo DOP da Região Centro de Portugal no mercado nacional.

Queijos DOP da Região Centro		Modalidades de escoamento				
		Grandes superfícies	Comércio tradicional	Feiras	Venda direta consumidor	Intermediários
Queijo da Beira Baixa DOP	tipo Amarelo	90	5	0	5	0
	tipo Castelo Branco	90	5	0	5	0
	tipo Picante	90	5	0	5	0
Queijo Rabaçal DOP		-	-	-	-	-
Queijo Serra da Estrela DOP		81	0	3	0	15

Fonte: DGADR (2019).

A certificação dos queijos como DOP leva à prática de preços mais elevados do que os queijos que não apresentam certificação (Tabela 3.4). Por exemplo, em 2019, a certificação de Queijo Serra da Estrela DOP permitiu ao produtor obter mais 4,13 €/kg e a do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante um acréscimo de 0,60€/kg. A fonte consultada não apresentava informações relativas ao Queijo Rabaçal (DGADR 2019).

Tabela 3.4 - Preço de queijos da Região Centro de Portugal: queijo certificado *versus* queijo não certificado.

Queijos DOP da Região Centro		Produto certificado (€/kg)	Produto não certificado (€/kg)
Queijo da Beira Baixa DOP	tipo Amarelo	11,37	9,37
	tipo Castelo Branco	12,23	10,82
	tipo Picante	11,90	11,30
Queijo Rabaçal DOP		-	-
Queijo Serra da Estrela DOP		17,13	13,00

Fonte: DGADR (2019).

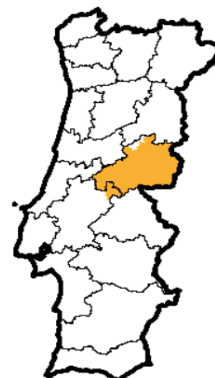
Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2019, o consumo anual de queijo per capita foi de 13,8 kg/ habitante, sendo este o valor anual mais elevado dos últimos 10 anos em Portugal (INE 2021). Embora o consumo de queijo assuma especial relevância nas populações de áreas mais empobrecidas, por ser uma fonte de proteínas, de cálcio e de aminoácidos (Gwandu et al. 2018), os Queijos DOP são também considerados como produtos alimentares de elevada qualidade, com propriedades sensoriais específicas e características únicas (Scintu e Piredda 2007; Cunha et al. 2016).

Acompanhando as tendências de consumo, é importante ter em mente as preferências dos consumidores, como intolerância à lactose ou vegetarianismo, considerações religiosas (por exemplo, Judaísmo e Islamismo) e oposições à utilização de microrganismos geneticamente modificados. Estas preferências abrem novas oportunidades de mercado, principalmente para os queijos produzidos com coalhos de origem vegetal (Roseiro et al. 2003; Gatti et al. 2014; Manuelian et al. 2020). Para além disso, é importante sublinhar os benefícios que o consumo de queijo oferece. Num estudo recente, Mozaffarian (2019) afirmou que o consumo controlado de produtos lácteos não provoca aumento de peso, não está associado a um aumento do risco cardiovascular e que pode ser um fator protetor contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2. A existência de péptidos bioativos e probióticos na sua constituição podem ter efeitos na redução da pressão arterial, atividade anti-carcinogénica, anti-inflamatória e antimicrobiana e na redução do colesterol (Quigley et al. 2013; Mehta 2015; McSweeney et al. 2017; Choi et al. 2020).

3.1.2. Áreas geográficas de produção

A certificação DOP identifica um produto com origem num local ou região específicos, que esteja diretamente relacionado com a qualidade/características e cuja produção tenha toda lugar nessa mesma área geográfica demarcada (CE 2012). Na Figura 3.1 são apresentadas as áreas geográficas de produção definidas para o Queijo da Beira Baixa DOP (Caderno de Especificações - Queijo da Beira Baixa DOP 2016), Queijo Rabaçal DOP (Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP 1994) e Queijo Serra da Estrela DOP (Caderno de Especificações - Queijo Serra Da Estrela DOP 2011).

**Queijo da Beira Baixa
DOP**



Queijo Rabaçal DOP



**Queijo
Serra da Estrela DOP**

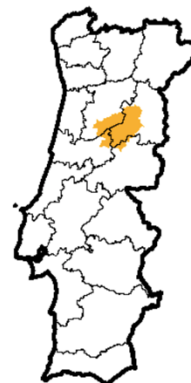


Figura 3.1 - Áreas geográficas definidas para produção do Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.

Fonte: <https://www.dgadr.gov.pt>, acessado em 20/09/2020.

No Caderno de Especificações do Queijo da Beira Baixa DOP (2016), Queijo Rabaçal DOP (1994) e Queijo Serra da Estrela DOP (2011) é dada relevância às condições edafoclimáticas, ao conhecimento passado entre gerações sobre o manejo dos animais e

à produção do queijo com base em tradições muito antigas alocadas às áreas geográficas delimitadas. Todos estes fatores, combinados, permitem a produção queijos com características únicas que o relacionam, inequivocamente, com o meio natural onde é produzido e permitindo ao consumidor distingui-lo de outros queijos.

3.1.3. Matérias-primas

O leite cru, de ovelha e de cabra, estreme ou mistura, o coalho (animal ou vegetal) e o sal são as matérias-primas utilizadas na produção dos Queijos DOP da Região Centro (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Matérias-primas utilizadas no fabrico de Queijos DOP da Região Centro.

Queijos DOP da Região Centro		Matérias-primas
Queijo da Beira Baixa DOP ¹	tipo Amarelo	Leite cru de ovelha ou mistura de leites de ovelha e de cabra Coalho animal Sal
	tipo Castelo Branco	Leite cru de ovelha Coalho vegetal (<i>Cynara cardunculus</i> L.) Sal
	tipo Picante	Leite cru, de ovelha ou de cabra, ou mistura de leites de ovelha e de cabra Coalho animal Sal
Queijo Rabaçal DOP ²		Mistura de leites de ovelha e de cabra Coalho animal Sal
Queijo Serra da Estrela DOP ³		Leite cru de ovelha Coalho vegetal (<i>Cynara cardunculus</i> L.) Sal

Fonte: ¹ Caderno de Especificações -Queijo da Beira Baixa DOP (2016); ² Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP (1994); ³ Caderno de Especificações - Queijo Serra da Estrela DOP (2011).

Para o fabrico do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco utiliza-se leite cru de ovelha Merina ou outras raças de ovelhas adaptadas à região. Os Queijos da Beira Baixa

DOP tipo Amarelo e Picante são fabricados com leite cru de ovelha Merina (ou outras raças) e leite cru de cabra raça Charnequeira (ou outras raças de cabras bem-adaptadas à região) (Caderno de Especificações - Queijo Da Beira Baixa DOP 2016). O Queijo Rabaçal DOP fabrica-se com leite de ovelha e cabra proveniente de efetivos existentes em explorações situadas na área geográfica referida, sem referência a raças específicas (Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP 1994). O leite usado para a obtenção do Queijo Serra da Estrela DOP é proveniente unicamente de ovelhas da Raça Ovina Bordaleira Serra da Estrela e da Raça Ovina Churra Mondegueira. Estas raças têm um elevado potencial leiteiro e estão perfeitamente adaptadas às condições de pastoreio inerentes à serra: estão habituados à tradição antiga da transumância, na qual o pastor percorria longas distâncias com os rebanhos à procura de alimento. Nos dias de hoje, esta movimentação tem uma dimensão menor, sendo feita a subida à Serra da Estrela por alguns rebanhos (Caderno de Especificações - Queijo Serra Da Estrela DOP 2011).

De acordo com os respetivos Cadernos de Especificações, os Queijos da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco (2016) e Serra da Estrela DOP (2011) são produzidos com leite cru de ovelha estreme. O Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, pode ser utilizado leite cru de ovelha ou mistura de leites de ovelha e de cabra, em que a mistura pode ter um máximo de 50% de leite de cabra. Já o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante, pode ser produzido com leite cru de ovelha (0-100%) ou de cabra (0-100%), tal como uma mistura de ambos. O Caderno de Especificações do Queijo Rabaçal DOP (1994) recomenda duas partes leite de ovelha para uma parte leite de cabra, embora se possa produzir com proporções iguais.

As características distintivas dos Queijos DOP da Região Centro podem ser parcialmente atribuídas ao facto dos rebanhos serem criados com acesso a pastagens espontâneas, num regime de produção ao ar livre e, em épocas de escassez, pode ser fornecido alimento conservado (fenos e palha) produzido na região (Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP 1994; Caderno de Especificações - Queijo Serra Da Estrela DOP 2011; Caderno de Especificações - Queijo Da Beira Baixa DOP 2016). O Caderno de Especificações do Queijo Rabaçal DOP (1994) realça, especificamente, a existência abundante de um tomilho espontâneo ("Santa Maria"), que serve de alimento aos rebanhos e que confere um sabor distintivo a este queijo.

O fabrico dos Queijos DOP da Região Centro baseia-se nas características únicas do leite utilizado, sem que seja feita a adição de qualquer cultura comercial de iniciação (Tavaria et al. 2006). Assim, a qualidade microbiológica do leite cru usado na produção destes queijos é fundamental para a obtenção de um produto seguro e de qualidade. Esta

microbiota é caracterizada por uma multiplicidade de grupos que desenvolvem um ecossistema dinâmico (Reis e Malcata 2011) e devido ao seu elevado teor nutricional, o leite cru possui uma biodiversidade microbiana elevada, constituindo a base da tipicidade e da singularidade do produto final (Beresford et al. 2001; Scintu e Piredda 2007; Quigley et al. 2013).

São utilizados agentes coagulantes de origem animal nos Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo e tipo Picante e Queijo Rabaçal DOP, e coalho de origem vegetal no Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco e no Queijo Serra da Estrela DOP. O coalho animal é obtido a partir do abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerros lactentes, que contêm quimosina e pepsina, duas proteases que coagulam o leite (Manuelian et al. 2020). O coalho vegetal contém cardosinas e provém de uma planta nativa da zona mediterrânica (*Cynara cardunculus* L.), pertencente à família da Asteraceae-Cardueae, conhecida como cardo selvagem (Roseiro et al. 2003).

Para além do leite e do agente coagulante, o sal termina a lista de matérias-primas. No fabrico do queijo, o sal participa na coagulação do leite, na formação da crosta, na inibição do crescimento dos microrganismos, na textura, no sabor e na conservação (McSweeney 2007; IDF 2014). O sal pode ser adicionado em conjunto com o coalho, auxiliando a extração das proteases que vão realizar a coagulação do leite (Araújo-Rodrigues et al. 2020). Pode também ser incorporado após o dessoramento, facilitando este processo através da diminuição da atividade da água (a_w). Esta diminuição, em combinação com a redução gradual do pH, vai ser responsável pela formação da crosta e controlo do crescimento microbiano, promovendo a segurança do produto final e contribuindo para o prolongamento do seu período de vida útil (Freitas et al. 1996; Beresford et al. 2001; Guinee e Sutherland 2011; McSweeney et al. 2017; Araújo-Rodrigues et al. 2020). Desempenha também um papel potenciador do sabor, influenciando o aroma e as sensações trigeminais (IDF 2014).

A grande diversidade das características dos queijos depende das matérias-primas e dos processos de fabrico utilizados (Beresford et al. 2001; Martins 2001), sendo a qualidade e segurança das matérias-primas fulcral para garantir a obtenção de um produto final seguro e de qualidade (Martins 2001).

3.1.4. Processo de fabrico

O processo de fabrico de queijo decorre, de uma forma geral, segundo as etapas expostas na Figura 3.2, que são transversais aos Queijos DOP da Região Centro.

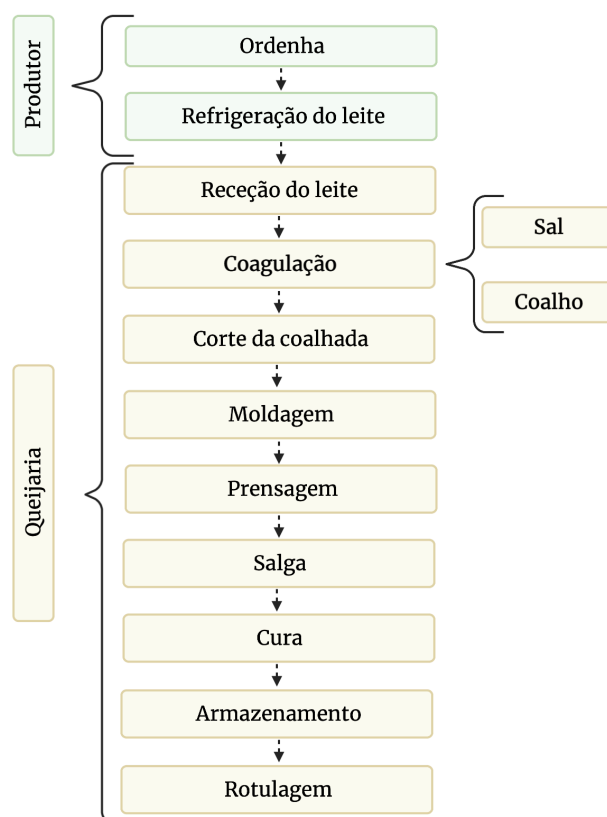


Figura 3.2 - Fluxograma de fabrico de queijo.

A ordenha, ou seja, a obtenção do leite, é o ponto inicial de todo o processo, sendo a qualidade tecnológica e segurança alimentar do leite fundamentais para todo o processo, estando dependentes da sua composição físico-química e microbiológica. O leite deve ser rico em proteína (caseína), gordura e deve ter um bom equilíbrio mineral, garantindo bom rendimento queijeiro (Martins 2001). A segurança alimentar está diretamente relacionada com as condições higiénicas e sanitárias praticadas nas explorações leiteiras, bem como com a saúde do animal. O leite cru utilizado deve ter uma qualidade microbiológica elevada; por um lado, deve apresentar microrganismos benéficos para o processo de transformação, por outro lado deve ser seguro, livre de patógenos, inibidores ou contaminantes químicos, que possam influenciar a atividade microbiana essencial ao desenvolvimento das características do produto ou ter consequências na saúde do consumidor (Beresford et al. 2001; Martins 2001; Farkye 2014; Araújo-Rodrigues et al. 2020). A microbiota do leite cru, constituída principalmente por bactérias, bolores e leveduras, tem um papel tecnológico importante (Mallet et al. 2012; Bianchini et al. 2014). Boas práticas, como a limpeza e desinfeção dos úberes, antes e

depois da ordenha, e dos equipamentos utilizados para realizar esta atividade são indispensáveis para garantir a segurança microbiológica do leite (Martins 2001; Bianchini et al. 2014). Alguns autores mencionam que a condição sanitária do leite cru, associada ao processo de fabrico do queijo, tem um efeito mais significativo na qualidade final do queijo do que as condições de cura utilizadas (Macedo et. al. 1996).

Imediatamente após a ordenha, o leite deve ser refrigerado. Segundo o Regulamento (CE) N.º 1662/2006, se o leite não for recolhido nas duas horas seguintes à ordenha, deve ser arrefecido a uma temperatura igual ou inferior a 8°C no caso de recolha diária; ou a 6°C, se a recolha não for diária. Durante o transporte para a queijaria, a temperatura do leite arrefecido não deve exceder 10°C. Também no Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela DOP (2011) é mencionado que o processo de transformação deve ser feito o mais rapidamente possível após a ordenha, não devendo ser ultrapassado um período de 3 horas, a não ser que exista refrigeração adequada.

Na queijaria apenas deve ser aceite leite produzido na área delimitada para a respetiva DOP, em perfeitas condições sanitárias e que cumpra os critérios aplicáveis ao leite cru definidos no Regulamento (CE) N.º 1662/2006.

Posteriormente, no início da laboração do queijo, o leite é aquecido até alcançar a temperatura ótima do agente coagulante (27-36°C), com vista a iniciar a coagulação. O período de coagulação depende das características do agente coagulante, das condições de coagulação e das características do produto final que se deseja obter (Tabela 3.6). Na fase de coagulação, é também adicionada uma parte do sal, que vai ajudar na extração das enzimas proteolíticas (McSweeney 2007). As quantidades de agente coagulante e sal usadas no fabrico dos Queijos DOP são empíricas, estando associadas ao saber tradicional, transmitido entre gerações (Araújo-Rodrigues et al. 2020). Para o Queijo da Beira Baixa DOP (Caderno de Especificações - Queijo da Beira Baixa DOP 2016) é referido que, no tipo Castelo Branco, a coagulação finda quando a coalhada se solta das paredes do recipiente; para o Queijo Serra da Estrela DOP a coagulação está concluída quando a coalhada for firme quando perfurada com o dedo (Caderno de Especificações - Queijo Serra da Estrela DOP 2011).

Ainda nesta fase, o agente coagulante vai interagir com as caseínas, conduzindo a uma clivagem do domínio hidrofílico da k-caseína, que provoca uma alteração na superfície das micelas de caseína, permitindo a sua agregação. Segue-se o aumento da viscosidade do leite, provocando a sua gelificação, ou seja, a formação da coalhada (McSweeney et al. 2017). Como a quimosina e a cardosina têm uma atividade ótima em ambientes ácidos, as bactérias lácticas, que estão naturalmente presentes no leite cru, vão ser fundamentais

para induzir uma diminuição do pH no meio, através da fermentação (Kongo e Malcata 2015). Esta acidificação é fulcral para todo o processo, afetando a atividade do coalho, o dessoramento e a cura, e, por conseguinte, a composição final e qualidade sensorial do queijo. A redução do pH contribui também para a segurança microbiana, através da inibição do crescimento de microrganismos patogénios (Freitas e Malcata 2000; McSweeney 2007; Farkye 2014; Cheung e Mehta 2015; Kongo e Malcata 2015).

Tabela 3.6 - Temperatura e período de coagulação dos Queijos DOP da Região Centro.

Queijos DOP da Região Centro		Condições de coagulação	
		Temperatura (°C)	Período (min)
Queijo da Beira Baixa DOP ¹	tipo Amarelo	27 – 36	30 – 60
	tipo Castelo Branco	28 – 36	40 – 90
	tipo Picante	27 – 36	30 – 60
Queijo Rabaçal DOP ²		30	45 – 60
Queijo Serra da Estrela DOP ³		28 – 32	45 – 60

Fonte: ¹ Caderno de Especificações - Queijo da Beira Baixa DOP (2016); ² Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP (1994); ³ Caderno de Especificações - Queijo Serra da Estrela DOP (2011).

Finda a coagulação, a coalhada é trabalhada fazendo o seu corte com uma lira, com o objetivo de reduzir a sua granulometria e iniciar o dessoramento. Quando se atinge a granulometria apropriada, é colocada em moldes e iniciada a prensagem, por forma a continuar o esgotamento do soro (Araújo-Rodrigues et al. 2020). O dessoramento influencia algumas características do produto final, como textura e sabor (Martins 2001; McSweeney 2007). Nesta fase, a microbiota é principalmente constituída por bactérias lácticas (Beresford et al. 2001; Araújo-Rodrigues et al. 2020). A prensagem evita o desenvolvimento de fendas no queijo (Macedo et al. 1993), sendo referido no Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela DOP (2011) que se aplica um peso de 4-5 kg sobre os queijos, durante cerca de 6 horas.

O soro, obtido durante o corte da coalhada/dessoramento/prensagem, é um subproduto que pode ser transformado de forma a garantir uma gestão sustentável, confluindo simultaneamente para a circularidade da economia. Pode ser utilizado na produção de requeijão, suplementos alimentares, biopolímeros (como o polihidroxialcanoato) e biocombustíveis, entre outros (Roseiro et al. 2003; Rosa 2018; Lappa et al. 2019; Asunis et al. 2020).

A salga dos Queijos DOP da Região Centro é efetuada de acordo com o saber tradicional, por espalhamento de sal sobre toda a superfície após a prensagem, ou por imersão em salmoura. O tempo de permanência na salmoura depende do teor em sal da mesma, do tamanho dos queijos e das características do produto final.

Segue-se a cura, etapa de fabrico em que se desenvolvem as principais características sensoriais do queijo (Reis e Malcata 2011). A cura dos Queijos DOP da Região Centro é feita numa dependência da queijaria, sob condições de humidade e temperatura descritas na Tabela 3.7. Para o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante, segundo o Caderno de Especificações (2016), numa primeira fase os queijos são dispostos em “Castelo” e cobertos de sal até apresentarem uma consistência ótima, de seguida são colocados numa “cama” de palha de centeio ao “cutelo”(em galga, unidos, face com face). Relativamente ao período mínimo de cura: para os Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo e tipo Castelo Branco deve ser de 40 dias; para os queijos tipo Amarelo Velho e tipo Castelo Branco Velho deve ser de 90 dias; para o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante, o período mínimo de cura deve ser de 120 dias. Quanto ao Queijo Rabaçal DOP a cura decorre no mínimo em 20 dias. Por sua vez, para o Queijo Serra da Estrela DOP e para o Queijo Serra da Estrela Velho DOP são referidos 30 e 120 dias como período mínimo de cura, respetivamente.

O cumprimento do período mínimo de cura é importante para garantir as características organolépticas e a segurança alimentar do produto final. Durante esta fase, a crosta e a massa do queijo apresentam uma microbiota distinta, não só pela diferença na disponibilidade de oxigénio e humidade, como pela exposição ao ambiente envolvente durante o período de cura, levando à existência de uma microbiota mais diversa na crosta. Esta diversidade pode ser influenciada pelo ambiente da sala de cura, o tempo de cura, pela salga e manipulações do queijo. A crosta funciona também como uma barreira, que protege o interior do queijo de microrganismos patogénicos e deteriorantes (Irlinger et al. 2014; Choi et al. 2020).

No início da cura, a colonização rápida da crosta por leveduras que metabolizam o lactato produzido pelas bactérias lácticas promove o aumento do pH na superfície do queijo, formando-se um biofilme (a crosta) que fomenta o desenvolvimento de uma comunidade bacteriana sensível ao ácido e tolerante a elevadas concentrações de sal. Estas leveduras são capazes de crescer em condições de pH baixos, baixas temperaturas, baixa a_w e elevadas concentrações de sal (Fröhlich-Wyder et al. 2019).

Tabela 3.7 - Temperatura, humidade e período mínimo de cura dos Queijo DOP da Região Centro.

Queijos DOP da Região Centro		Condições de cura		
		Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Período mínimo (dias)
Queijo da Beira Baixa DOP ¹	tipo Amarelo	10-18	50-70	40
	tipo Amarelo Velho			90
	tipo Castelo Branco	8-14	80-90	40
	tipo Castelo Branco Velho			90
	tipo Picante	10-18	70-80	120
Queijo Rabaçal DOP ²		10-15	70-85	20
Queijo Serra da Estrela DOP ³		6-12	85-90	30
Queijo Serra da Estrela Velho DOP ³				120

Fonte: ¹ Caderno de Especificações -Queijo da Beira Baixa DOP (2016); ² Caderno de Especificações Queijo Rabaçal DOP (1994); ³ Caderno de Especificações – Queijo Serra da Estrela DOP (2011).

Segundo o Caderno de Especificações do Queijo da Beira Baixa DOP (2016), estes devem ser armazenados em ambiente refrigerado (0-5°C), transportados a temperaturas entre 0 e 10°C e, no local de venda/retalho, o produto deve estar entre 0 e 12°C. A congelação do Queijo da Beira Baixa tipo Amarelo e Castelo Branco pode ser efetuada a temperaturas inferiores a -1°C, por longos períodos. Para os Queijos da Beira Baixa tipo Amarelo Velho e Castelo Branco Velho é admitida a sua preservação através da aplicação de uma pasta de azeite e colorau em toda a superfície (Despacho N.º 10518/2007). De acordo com o Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela DOP (2011), este deve ser conservado a uma temperatura não superior a 22°C e, para longos períodos, utilizar temperaturas inferiores a 1°C. Também o Despacho 12/94 do Diário da República de Janeiro de 1994, que complementa o Caderno de Especificações – Queijo Rabaçal DOP (1994), menciona condições de armazenamento (0-5°C), transporte (0 e 12°C) e de permanência no retalhista (0-10°C).

Por fim, no que concerne ao rótulo de queijos DOP, a informação deve ser complementada com a designação do queijo (conforme o respetivo Caderno de Especificações), indicação DOP e respetivo símbolo e referência ao Organismo de Certificação (Figura 3.3).

Símbolo DOP- Denominação de Origem Protegida

“Denominação que identifique um produto originário de um local ou região determinados, ou, em casos excepcionais, de um país; cuja qualidade ou características se devam essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os seus fatores naturais e humanos; e cujas fases de produção tenham todas lugar na área geográfica delimitada.”



Queijo da Beira Baixa DOP – selo de certificação



Queijo Rabaçal DOP – selo de certificação



Queijo Serra da Estrela DOP:

- Holograma produzido pela Casa da Moeda que garante a autenticidade



- Marca de caseína com número de série que garante a rastreabilidade.



Figura 3.3 - Selos que constam nos rótulos dos Queijos DOP da Região Centro.

Fontes das imagens (accedidas a 25/03/2021): <https://www.dgadr.gov.pt/sustentavel/dop-igp-etg>;
https://ptqc.drapc.gov.pt/documentos/queijo_beira_baixa.htm; <https://dre.pt/application/file/a/66108421>;
<https://estrelacoop.pt>.

3.1.5. Características dos queijos

Nas Tabelas 3.8 – 3.10 estão descritas as principais características que os Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, tipo Castelo Branco e tipo Picante devem apresentar, estando as mesmas expostas no Caderno de Especificações do Queijo da Beira Baixa DOP (2016) e Despacho N.º 10518/2007.

Para o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, pode também fabricar-se uma “merendeira” (0,32 - 0,5 kg, diâmetro de 7 a 10 cm e com uma altura de 3 a 4 cm), segundo o Caderno de Especificações do Queijo da Beira Baixa DOP (2016).

Tabela 3.8 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo.

Características	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo Velho
Massa (kg)	0,6 - 1,0	0,6 - 0,9
Diâmetro (cm)	12 - 16	12 -16
Altura (cm)	3 - 5	3 - 5
Forma	Cilindro baixo (prato), regular, abaulamento lateral e abaulamento ligeiro na face superior, sem bordos definidos	Cilindro baixo (prato), regular, sem bordos definidos, sendo habitual uma concavidade na face superior
Crosta	Semidura, bem formada, fina e inteira	Maleável e dura, regular, medianamente lisa a rugosa, bem formada e relativamente uniforme
Textura da pasta	Fechada ou com alguns olhos irregulares, medianamente amanteigada, untuosa	Fechada ou com alguns olhos irregulares, ligeiramente quebradiça e seca, untuosa
Aroma e sabor	Aroma intenso e agradável, sabor limpo e ligeiramente acidulado	Aroma agradável e persistente, sabor limpo, forte, levemente picante e salgado
Gordura (%)	45 - 60	49 - 56
Humidade (%)	54 - 69	45 - 60

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

Na Tabela 3.9 estão expostas as características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco (massa, dimensões, composição química (gordura, humidade, proteína, cinzas) e atributos sensoriais), como descrito no Despacho N.º 10518/2007 e na seu Caderno de Especificações.

De acordo com o Caderno de Especificações do Queijo da Beira Baixa DOP (2016), para o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco também pode haver uma “merendeira” (0,35 - 0,55 kg, diâmetro de 8 a 10 cm e com uma altura de 4 a 6 cm).

Tabela 3.9 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco.

Características	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Castelo Branco Velho
Massa (kg)	0,8 - 1,3	0,6 - 1,1
Diâmetro (cm)	12 - 16	12 - 16
Altura (cm)	5 - 8	5 - 8
Forma	Cilindro baixo (prato), regular, abaulamento lateral e abaulamento ligeiro na face superior, sem bordos bem definidos	Cilindro baixo (prato), regular, sem bordos definidos, sendo habitual uma concavidade na face superior
Crosta	Maleável no início, passando a dura, inteira, bem formada e lisa	Relativamente maleável e dura, regular, medianamente lisa a rugosa, bem formada e relativamente uniforme
Textura da pasta	Fechada, medianamente amanteigada, deformável ao corte, bem ligada, untuosa, com alguns olhos pequenos	Fechada ou com alguns olhos irregulares, de ligeiramente quebradiça e seca, untuosa
Cor	Amarelo-palha a amarelo-torrado uniforme	Amarelo-torrado a castanho-alaranjado
Aroma e sabor	Aroma e sabor acentuados	Aroma agradável e persistente, sabor limpo, forte a ligeiramente forte e levemente picante
Gordura (%)	45 - 60	49 - 56
Humidade (%)	54 - 69	49 - 56

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

O Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante apresenta um aspeto, aroma e sabor peculiares, como se descreve na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Principais características do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante.

Características	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante
Massa (kg)	0,4 - 1,0
Diâmetro (cm)	10 - 15
Altura (cm)	3 - 5
Forma	Cilindro baixo (prato), com faces direitas, lisas e bordos definidos
Crosta	Sem crosta, sem olhos ou com pequenos olhos irregulares
Textura da pasta	Fechada
Cor	Branco-sujo a branco-acinzentado
Aroma e sabor	Aroma ativo e característico, sabor forte e acentuadamente picante
Gordura (%)	35 - 60
Humidade (%)	45 - 63

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

O Queijo Rabaçal DOP é o que apresenta menos informação disponível, mantendo-se praticamente inalterado desde a publicação do regime DOP no Despacho 12/94 do Diário da República de Janeiro de 1994. Na Tabela 3.11 estão resumidas as características que o definem, reunidas a partir do Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP (1994) e do Despacho 12/94.

Tabela 3.11 - Principais características do Queijo Rabaçal DOP.

Características	Queijo Rabaçal DOP
Massa (kg)	0,3 - 0,5
Diâmetro (cm)	10 - 12
Altura (cm)	3,3 - 4,2
Forma	Cilindro, firme, provocando um som maciço à precursão
Crosta	Inteira, bem formada e sem revestimento exterior, lisa, seca ou ligeiramente untuosa
Textura da pasta	Semidura a dura, com poucos ou nenhuns olhos pequenos e irregulares, firme
Cor	Branco-amarelado a amarelo-palha, uniforme
Gordura (%)	≥ 45
Humidade (%)	52-60

Adaptado de: Despacho 12/94 do Diário da República de Janeiro de 1994; Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP (1994).

O Queijo Serra da Estrela DOP é o mais antigo de todos os queijos portugueses, conhecido por todo o mundo. No seu Caderno de Especificações - Queijo Serra da Estrela DOP (2011) e no Regulamento (UE) N.º 562/2013 estão expostas as suas características, como massa, dimensões, composição química (gordura, humidade, proteína, cinzas) e atributos sensoriais, que estão resumidas na Tabela 3.12.

Tabela 3.12 - Principais características do Queijo Serra da Estrela DOP.

Características	Queijo Serra da Estrela DOP	Queijo Serra da Estrela DOP Velho
Massa (kg)	0,5 - 1,7	0,7 - 1,2
Diâmetro (cm)	9 - 20	11 - 20
Altura (cm)	4 - 6	3 - 6
Forma	Cilindro baixo (prato), regular com abaulamento lateral e um pouco na face superior, sem bordos definidos	Cilindro baixo (prato), regular com abaulamento lateral não pronunciado ou inexistente, ausência de arestas
Crosta	Lisa e semimole	Lisa a ligeiramente enrugada e de consistência dura a extradura
Textura da pasta	Fechada, com poucos ou nenhuns olhos, medianamente amanteigada, deformável ao corte, bem ligada, cremosa e untuosa	Fechada ou com alguns olhos, massa ligeiramente quebradiça e seca, untuosa
Cor	Branca ou ligeiramente amarelada	Amarelada a alaranjada/acastanhada, com a coloração a desenvolver-se da periferia para o centro
Aroma e sabor	Bouquet suave, limpo e ligeiramente acidulado	Bouquet agradável e persistente, limpo, forte a ligeiramente forte e levemente picante/salgado
Gordura (%)	45 - 60	> 60
Humidade (%)	61 - 69	49 - 56
Proteína (%)	26 - 33	36 - 43
Cinzas (%)	5 - 6,5	7 - 8

Adaptado de: Regulamento (UE) N.º 562/2013; Caderno de Especificações - Queijo Serra da Estrela DOP (2011).

3.2 Diversidade microbiológica em leite cru e queijo

O leite, pela sua riqueza nutricional (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerais e aminoácidos), pH quase neutro e elevado teor de água, proporciona um meio propício para o desenvolvimento de uma grande variedade de microrganismos (Chambers 2002; Quigley et al. 2013).

Quando ainda presente no úbere de uma fêmea saudável, o leite encontra-se esterilizado, sendo a ordenha e manipulações consequentes que levam à presença de microrganismos, provenientes do contacto com o animal e equipamento de ordenha. Estes microrganismos podem facilitar a fermentação láctica (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*), causar deterioração (*Pseudomonas*, *Clostridium* e *Bacillus*), promover a saúde (lactobacilos e bifidobactérias) ou causar doenças (*Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter*) (Quigley et al. 2013). A falta de condições de higiene durante o manuseamento do leite e de todo o equipamento com que este entra em contacto influencia a sua qualidade microbiológica, sendo a aplicação de boas práticas de higiene um ponto chave para garantir a sua qualidade e segurança (Quigley et al. 2013; Bianchini et al. 2014; Perin et al. 2018).

As bactérias lácticas, grupo que fermenta lactose em ácido láctico, constituem a população dominante no leite cru, sendo as mais comuns *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Quigley et al. 2013; Kongo and Malcata 2016). A refrigeração do leite cria um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos, incluindo *Pseudomonas* spp., sendo este outro grupo com uma presença marcada no leite cru (Quigley et al. 2013; McSweeney et al. 2017). Outros microrganismos também presentes no leite cru são bactérias coliformes, enterobactérias, leveduras e bolores.

A tipicidade do queijo advém da biodiversidade das estirpes envolvidas em todo o processo de produção, logo a microbiota dos queijos típicos depende da microbiota dos leites que lhe dão origem (Kongo and Malcata 2016). Os queijos produzidos com leite cru têm uma microbiota particularmente complexa que, quando combinadas com métodos tradicionais de fabrico, se tornam a chave para o desenvolvimento de características específicas, incluindo baixo risco patogénico e características organoléticas únicas (Beresford et al. 2001; Montel et al. 2014). Esta biodiversidade permite a produção de queijos típicos com qualidades organoléticas superiores a queijos produzidos com leite pasteurizado (Kongo and Malcata 2016). Alguns grupos de microrganismos, em contagens elevadas, podem também causar um impacto negativo na qualidade do leite e na sua capacidade de produção de queijo, ou até na saúde do consumidor. Um exemplo

desta situação são os psicrotróficos que, ao produzirem lípases e proteases extracelulares, podem criar alterações no leite e conseqüentemente no queijo (Quigley et al. 2013).

Devido à temperatura a que se dá a coagulação do leite para a produção do queijo (27 a 36°C), a maioria das bactérias lácticas presentes no queijo são mesófilas (Farkye 2014; Kongo and Malcata 2016). O seu papel é realizar a fermentação da lactose e ajudar no processo de cura. Os microrganismos secundários são constituídos por outras bactérias, bolores e leveduras, e têm um papel importante durante a cura do queijo, influenciando a sua textura e sabor (Beresford et al. 2001; Quigley et al. 2013; Farkye 2014).

Microrganismos mesófilos

Os microrganismos mesófilos podem pertencer aos domínios Bacteria, Eukarya e Archaea e a sua temperatura ótima de crescimento é entre 30°C e 39°C, podendo crescer a temperaturas entre 25°C e 45°C. Os principais géneros de microrganismos mesófilos que podem estar presentes no leite são: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, bolores, leveduras, entre outros (Chambers 2002).

Os mesófilos, quando presentes em elevadas concentrações no leite, são indicadores de práticas de higiene inadequadas. Estes microrganismos fazem parte da microbiota natural do leite, estando presentes no úbere, equipamentos de ordena, água e ar das explorações (Perin et al. 2018). A sua quantificação, legislada pelo Regulamento (CE) N.º 1662/2006, tem como objetivo avaliar a qualidade do leite cru produzido, assegurando o cumprimento de boas práticas de higiene em todas as fases de recolha e manipulação do mesmo (Perin et al. 2018; INSA 2019).

A contagem de microrganismos mesófilos não faz distinção entre a microbiota natural, microrganismos deteriorantes e microrganismos patogénios, mas é relevante para avaliar as condições a que o leite esteve sujeito até ao momento da análise. As bactérias lácticas são um grupo que constitui uma elevada percentagem dos microrganismos mesófilos presentes no leite, sendo um exemplo do motivo pelo qual não se deve avaliar a qualidade do leite/queijo unicamente pela presença de contagens elevadas de mesófilos, pois estas bactérias têm um papel tecnológico fundamental e não são patogénicas (Robinson 2002; INSA 2019). No caso do leite e queijo é importante comparar as contagens de bactérias lácticas com as contagens mesófilas, para garantir

uma correta interpretação dos dados obtidos (Health Protection Agency 2009; INSA 2019).

Bactérias lácticas

Lactobacillales é uma ordem de bactérias gram-positivas, com o nome comum bactéria do ácido láctico, das quais fazem parte as famílias Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Streptococcaceae. As bactérias lácticas podem ser mesófilas (entre 25°C e 40°C) ou termófilas (entre 45°C e 65°C), de acordo com a sua temperatura ótima de crescimento, e os principais géneros são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoccus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Perin et al. 2018; McSweeney et al. 2017).

As bactérias lácticas induzem alterações no leite e queijo através da fermentação, na fase inicial do processo de fabrico com consequente acidificação do meio, e através de alterações bioquímicas durante a cura, que promovem o desenvolvimento de aromas característicos no queijo (Perin et al. 2018; McSweeney et al. 2017; INSA 2019), podendo constituir aproximadamente 50% de todos os microrganismos presentes no leite cru (Montel et al. 2014; Picon et al. 2016; Parente et al. 2020). A fermentação da lactose em ácido láctico durante o fabrico do queijo leva à diminuição do pH do meio, promovendo a coagulação e o dessoramento. Durante a cura, as bactérias lácticas convertem aminoácidos em compostos aromáticos (Beresford et al. 2001), podendo também produzir bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) que, tal como o pH baixo, vão inibir o crescimento de microrganismos patogénios, contribuindo para a segurança microbiológica dos queijos produzidos com leite cru (Farkye 2014; McSweeney et al. 2017; Perin et al. 2018).

Microrganismos psicrotróficos

Os microrganismos psicrotróficos são atualmente considerados um dos principais agentes alterantes do leite cru e deteriorantes em queijo (Chambers 2002; Perin et al. 2018). Estes têm a capacidade de crescer a temperaturas entre 0°C e 7°C e incluem vários géneros, sendo os principais *Pseudomona* e *Bacillus*. Algumas destas bactérias produzem enzimas extracelulares, que podem contribuir para o desenvolvimento de um sabor a ranço no leite e defeitos sensoriais no queijo (Chambers 2002; Walstra et al. 2006; Perin et al. 2018). As principais fontes de contaminação de microrganismos psicrotróficos são o equipamento de ordenha e água contaminada. Aplicando boas

práticas de higiene antes da ordenha e durante todo o manuseamento do leite, este grupo pode constituir cerca de 10% da microbiota do leite cru, podendo, no entanto, atingir 75% da microbiota se este for obtido em condições de higiene deficientes (Chambers 2002; Perin et al. 2018).

Pseudomonas spp., um dos principais agentes deteriorantes do leite (Montel et al. 2014), são um género de bactérias gram-negativas que pertence à família *Pseudomonadaceae*, sendo o psicrotrófico predominante, devido à sua temperatura metabólica ótima de 4°C, embora possam crescer a temperaturas entre 4°C e 42°C (Verraes et al. 2015; Perin et al. 2018). As espécies mais frequentes em leite e queijos são *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas lundensis* (Quigley et al. 2013). Estas bactérias podem provocar lipólise e proteólise causando uma diminuição da gordura no leite e originando um sabor a ranço no queijo (Robinson 2002).

Garantir uma refrigeração apropriada do leite cru é indispensável para controlar o desenvolvimento de psicrotróficos e *Pseudomonas* spp., sendo aconselhado um período curto entre a ordenha e a utilização do leite, para diminuir a possibilidade de contaminação do mesmo (D'Amico et al. 2008).

Enterobactérias

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias gram-negativas coliformes (algumas psicrotróficas) que abrange espécies provenientes de plantas, do ambiente e do trato intestinal de animais e humanos, incluindo espécies patogénicas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Walstra et al. 2006; Perin et al. 2018). Uma vez que esta família inclui tanto coliformes como outros tipos de bactérias que não fermentam lactose, a sua presença pode ser indicadora de contaminação ocorrida durante a ordenha, permitindo avaliar o estado higiénico geral num género alimentício (Perin et al. 2018; INSA 2019).

Bactérias coliformes

As bactérias coliformes, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são microrganismos mesófilos gram-negativos que têm a capacidade de fermentar lactose, estando presentes no solo, água não tratada, equipamento de ordenha e fezes. Embora sejam relativamente ubíquos no ambiente, a sua presença no leite cru pode ser útil para avaliar a qualidade da água utilizada na exploração leiteira, ou a ausência de práticas de higiene adequadas durante a ordenha (Gwandu et al. 2018). Os géneros *Escherichia*, *Klebsiella*,

Enterobacter e *Citrobacter* pertencem ao grupo das bactérias coliformes, mas apenas *E.coli* está presente no trato intestinal de humanos e de animais. Alguns gêneros, como *Enterobacter*, são psicrotróficos (Chambers 2002; Perin et al. 2018).

A presença de bactérias coliformes era diretamente associada à contaminação de origem fecal, indicando a possível presença de outros microrganismos patogênicos e fecais. Atualmente, é reconhecido que a sua quantificação em leite cru não é evidência inequívoca de contaminação fecal direta, mas pode ajudar a identificar deficiências sanitárias no processo de ordenha. Contudo, uma contagem esporádica de coliformes elevada pode indicar a existência de mastite nos animais do rebanho (Chambers 2002; Perin et al. 2018). As bactérias coliformes também são úteis para identificar práticas de higiene inadequadas do equipamento, uma vez que são altamente sensíveis a detergentes e produtos de limpeza de origem química (McSweeney 2007).

Escherichia coli

E.coli é uma bactéria coliforme anaeróbia facultativa, colonizadora natural do trato intestinal humano e de animais (McSweeney et al. 2017). Algumas estirpes conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7°C e 46°C, mas a temperatura ótima de crescimento é entre 35°C e 40°C. A sua presença no leite tem origem em úberes sujos durante a ordenha ou infecção do animal (mastite) (Chambers 2002; McSweeney et al. 2017; Perin et al. 2018). Esta bactéria, geralmente de origem fecal, tem sido usada como um indicador de falta de higiene (Metz et al. 2020), mas recentemente a sua presença deixou de ser considerada um indicador fiável de que tenha ocorrido contaminação fecal, e a sua ausência não garante a ausência de patogênicos entéricos (INSA 2019). Mesmo assim, continua a ser considerado um bom indicador para avaliação das práticas de higiene aplicadas e, Metz et al. (2020), refere que continua a ser o indicador de contaminação fecal mais usado.

E.coli enterohemorrágica (O157:H7) e *E.coli* STEC (STEC - Shiga Toxin-producing *E.coli*) são um pequeno grupo de bactérias que produzem toxinas e podem causar doença grave. A sua dose infecciosa é muito baixa (inferior a 10 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)) e os ruminantes, em especial os caprinos e ovinos, são considerados o principal reservatório do STEC. As doenças associadas a *E.coli* STEC e enterohemorrágica variam de diarreia sanguinolenta, à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica-urémica (Farrokh et al. 2013; Yoon et al. 2016; Brom et al. 2020).

***Salmonella* spp.**

Salmonella spp. são bactérias anaeróbias facultativas, pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e são um indicador de contaminações fecais. Podem crescer em condições desfavoráveis, como baixa temperatura, baixa humidade e alta salinidade (Yoon et al. 2016). Estão presentes nos tratos gastrointestinais de animais de sangue quente, incluindo os humanos. Há mais de 2.500 serotipos de *Salmonella* reportados, todos eles considerados patogénios (Brom et al. 2020). A sua presença no leite deve-se à falta de higiene durante a ordenha e transformação do leite. A principal fonte de contaminação são as fezes ou equipamento contaminado, mas também pode ocorrer diretamente por um animal infetado (Brom et al. 2020).

Estafilococos coagulase positiva

Staphylococcus pertence à família Staphylococcaceae e é um género de bactéria gram-positiva mesófila. A espécie mais comum de estafilococos coagulase positiva é *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que causa intoxicação alimentar pela produção de enterotoxinas nos alimentos (Food Safety Authority of Ireland 2020). É um patógeno ubíquo no ambiente (água, poeira, animais) e pode ser considerado como um comensal na pele humana (McSweeney et al. 2017). É um dos principais agentes causadores de mastite, podendo contaminar o leite durante a ordenha, contacto com equipamento contaminado, manuseamento do leite ou através da pele do operador (Perin et al. 2018; Brom et al. 2020).

Durante o período de cura, as contagens de *S. aureus* podem baixar, devido a condições desfavoráveis, mas isso não garante que as enterotoxinas estafilocócicas não estejam presentes no queijo. O seu crescimento é estimulado na presença de 4 % NaCl, mas também podem crescer quando o meio apresenta 20 % de NaCl e a_w até 0,83 (McSweeney et al. 2017; Brom et al. 2020). O pH baixo, elevados níveis de NaCl e a presença natural de bactérias lácticas no leite cru e queijo, são fatores que demonstraram reduzir o crescimento de *S. aureus* (Yoon et al. 2016; Food Standards Scotland 2018).

Leveduras e bolores

As leveduras são microrganismos unicelulares do domínio *Eukarya*, pertencentes ao reino Fungi, sendo *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, entre outras, as principais espécies presentes em leite cru (Quigley et al. 2013). O seu

crescimento é favorecido por pH, humidade e temperaturas baixas e concentrações de NaCl elevadas (Beresford et al. 2001). As leveduras podem metabolizar o ácido láctico do queijo na presença de concentrações elevadas de NaCl que, durante o início da cura, auxiliando a desacidificação da sua superfície (Beresford et al. 2001; Kongo and Malcata 2016). Devido à produção de metabolitos, algumas estirpes específicas contribuem para o sabor e textura do queijo (Kongo and Malcata 2016).

Os bolores são fungos multicelulares filamentosos. São um grupo taxonómico diverso que pode incluir géneros comuns em queijos produzidos com leite cru, como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Penicillium*. Estão normalmente presentes em menor quantidade que as leveduras, apresentando a capacidade de influenciar o sabor/aroma e alterar a textura do queijo, através da proteólise e lipólise (Kongo and Malcata 2016; McSweeney et al. 2017).

As leveduras e bolores presentes nos queijos promovem o desenvolvimento de características organolépticas e alterações bioquímicas durante o período de cura, sendo os principais colonizadores da crosta do queijo durante os primeiros dias de cura. A sua presença em leite e queijo tem origem no ar, equipamento, água e no ambiente das salas de cura, como paredes e prateleiras de madeira (Torkar and Vengušt 2008). Já foram identificadas mais de 40 espécies de bolores e 70 espécies de leveduras em queijos (McSweeney et al. 2017; Montel et al. 2014).

Devido à diferença dos níveis de oxigénio, processo de cura, humidade e ambiente envolventes, a crosta e a massa do queijo têm microbiotas distintas (Irlinger et al. 2014; Choi et al. 2020). Como a massa do queijo apresenta um ambiente relativamente anaeróbico, alguns microrganismos aeróbicos apenas proliferam na crosta. Durante o período de cura as interações entre a superfície do queijo e o ambiente envolvente ajudam a desenvolver uma crosta natural, sendo a sua diversidade microbiológica influenciada pelo nível de humidade (Choi et al. 2020).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa, pertencente ao filo Firmicutes e que se pode adaptar a ambientes hostis. É a causa de uma doença alimentar (listeriose), que apresenta uma prevalência baixa, mas uma taxa de mortalidade entre 20 e 30 % (McSweeney et al. 2017). A sua temperatura ótima de crescimento é entre 0 e 45°C, valores de a_w entre 0,90 e 0,97 e pH entre 4,3 e 10, podendo proliferar em concentrações de NaCl até 26 % (McSweeney et al. 2017). Tem a capacidade de sobrevivência em condições de stress ambiental (concentração de sal elevada, pH baixo

e temperaturas baixas), tornando este patógeno difícil de controlar e extremamente persistente (Food Standards Scotland 2018). A contaminação do leite cru pode dar-se através de fezes do animal, falta de higiene durante a ordenha ou por contaminação direta por animais portadores de listeriose ou mastite (Brom et al. 2020; Yoon et al. 2016).

O queijo é um meio ideal para o crescimento de *Listeria monocytogenes*, uma vez que este patógeno cresce a baixas temperaturas e o período de cura dos queijos é relativamente longo (Brom et al. 2020). Um estudo realizado por Chon et al. (2020) demonstrou que 60 dias de cura não são suficientes para eliminar *Listeria monocytogenes* de queijo produzidos com leite cru, nomeadamente aos níveis de contaminação médio (3 log UFC g⁻¹) ou elevados (5 log UFC g⁻¹). O uso de salmoura para o processo de salga do queijo é uma das fontes de contaminação, sendo necessário o controlo e manutenção da solução para garantir a sua segurança (50 % de saturação recomendada) (Food Standards Scotland 2018).

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica, formadora de esporos, do género *Clostridium* e família Clostridiaceae, estando associada a alimentos crus. *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* são as bactérias patogénicas de maior relevância, devido à produção de esporos e toxinas termorresistentes (Paludetti et al. 2018).

A presença de *Clostridium perfringens* e dos seus esporos em leite cru ocorre através da contaminação na superfície do úbere, com solo, poeiras ou fezes. Estes apresentam a capacidade de produzir vários tipos de toxinas, que podem causar doenças gastrointestinais graves (Walstra et al. 2006), e são um indicador de contaminação fecal (Robinson 2002).

3.2.1. Qualidade microbiológica em leite cru

O Regulamento (CE) N.º 1662/2006 refere que “se se pretender utilizar leite cru de espécies diferentes da vaca no fabrico de produtos feitos com leite cru por um processo que não inclua nenhum tratamento térmico, os operadores de empresas do sector alimentar devem tomar as medidas necessárias para assegurar que” o leite cru apresente valores para contagem em placas a 30°C (que referimos como **mesófilos** neste trabalho) iguais ou inferiores a 5x10⁵ UFC mL⁻¹ (5,7 log UFC mL⁻¹), considerando a “média geométrica constatada ao longo de um período de dois meses, com, pelo menos, duas

colheitas mensais”. Esta média geométrica tem em consideração possíveis variações, representando um indicador mais robusto e minimizando a interferência de valores (D’Amico e Donnelly 2010). Na Tabela 3.13 estão expostos resultados obtidos por diversos autores neste parâmetro.

D’Amico et al. (2008), ao analisar a qualidade geral de leite cru de vaca, cabra e ovelha, destinado à produção de queijos artesanais, obteve médias geométricas de 2,8 log UFC mL⁻¹ para leite de vaca, e 3,4 log UFC mL⁻¹ para leite de ovelha e de cabra. No seguimento desse trabalho, D’Amico e Donnelly (2010) encontraram médias geométricas de 3,1 log UFC mL⁻¹ para leite de vaca e cabra e 3,3 log UFC mL⁻¹ para leite de ovelha. Estes estudos concluíram que existem diferenças significativas entre as contagens de mesófilos em leite cru de vaca e leite cru de pequenos ruminantes. Além disso, concluiu que as contagens não foram significativamente afetadas pelo momento em que foi recolhida a amostra, realçando ainda que o cumprimento do limite para mesófilos não exclui a possível presença de microrganismos patogênicos.

Foschino et al. (2002), com o objetivo de determinar a qualidade microbiológica de leite cru de cabra destinado à produção de queijo, e de compreender a influência do período de lactação, obteve um valor médio de contagens de mesófilos de 4,7 log UFC mL⁻¹, não detetando diferenças significativas entre os períodos de amostragem. Por sua vez, Friker et al. (2019) registou contagens médias de mesófilos de 3,8 log UFC mL⁻¹, em leite cru de ovelha e de cabra para consumo. Pisano et al. (2006), ao analisar o leite cru de ovelha utilizado no fabrico de Queijo Fiore Sardo DOP, alcançou um valor médio para a contagem de mesófilos de 5,7 log UFC mL⁻¹. Já Sanjuan et al. (2003), ao estudar a incidência e a evolução a 6°C de diferentes grupos de microrganismos de interesse tecnológico em leite cru de ovelha, registou um valor médio de 5,5 log UFC mL⁻¹. D’Amico et al. (2008) e D’Amico e Donnelly (2010) observaram contagens médias de 5,4 e 4,2 log UFC mL⁻¹ em leite cru de cabra, e médias de 5,4 e 3,5 log UFC mL⁻¹, em leite cru de ovelha, respetivamente.

Na literatura consultada, para além da contagem de microrganismos mesófilos, são também utilizados outros parâmetros para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru, como bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores. A Tabela 3.13 resume os resultados obtidos por diversos autores nestes parâmetros (Foschino et al. 2002; Sanjuan et al. 2003; Pisano et al. 2006; D’Amico et al. 2008; D’Amico e Donnelly 2010; Fotou et al. 2011; Yamazi et al. 2013; Picon et al. 2016; Friker et al. 2019).

As **bactérias lácticas** desempenham um papel tecnológico essencial na produção de queijo, pela fermentação na fase inicial do processo de fabrico e pelas alterações bioquímicas durante a cura, promovendo o desenvolvimento de aromas característicos no queijo (Perin et al. 2018; McSweeney et al. 2017). Picon et al. (2016) obteve contagens que variaram entre 5,4 e 6,1 log UFC mL⁻¹, em leite de cabra, e realçou que este grupo representava quase metade da microbiota do leite cru recolhido em Cádiz e Málaga.

No que diz respeito a microrganismos **psicrotróficos**, Walstra et al. (2006) indica que se o leite cru for armazenado a baixas temperaturas e por curtos períodos de tempo, os defeitos ao nível do sabor do leite não são perceptíveis para contagens iguais ou inferiores a 7 log UFC mL⁻¹. Segundo o Regulamento (CE) N.º 1662/2006, o leite deve ser arrefecido imediatamente após a ordenha a uma temperatura não superior a 8°C, no caso de a recolha ser feita diariamente, ou não superior a 6°C, caso a recolha não seja feita diariamente. Já McSweeney (2007), recomenda como limite higiénico contagens de psicrotróficos inferiores a 6 log UFC mL⁻¹ em leite cru, pois terão pouco efeito na produção de queijo. Assim, neste trabalho, será adotado o limite de 6 log UFC mL⁻¹ para avaliar a qualidade do leite relativamente à quantificação de psicrotróficos.

Yamazi et al. (2013) obteve um valor médio de 4,1 log UFC mL⁻¹ ao caracterizar o leite cru de cabra produzido no Brasil e o efeito da refrigeração prolongada. Para determinar a qualidade microbiológica e a segurança do leite cru de ovelha na Grécia, Fotou et al. (2011) quantificou microrganismos psicrotróficos, que variaram entre 2,7 e 4,7 log UFC mL⁻¹, concluindo que é importante arrefecer rapidamente o leite cru e armazená-lo não mais do que o tempo necessário, para garantir contagens que não influenciem a qualidade do leite e conseqüentemente a do queijo.

Pseudomonas spp. constitui um dos principais agentes deteriorantes do leite devido à sua atividade proteolítica e lipolítica (Robinson 2002; Montel et al. 2014). Sanjuan et al. (2003) registou uma contagem média de 4,1 log UFC mL⁻¹, ao estudar a microflora de interesse tecnológico em leite cru ovino para consumo, refrigerado a 6°C; Fotou et al. (2011) relatou contagens inferiores ao limite de quantificação em todas as amostras de leite cru de ovelha analisadas.

Tabela 3.13 - Parâmetros microbiológicos observados em amostras de leite cru: mesófilos, bactérias lácticas, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores.

Parâmetros microbiológicos	Tipo de leite	Contagens (log UFC mL ⁻¹)	n	Referência bibliográfica	
Média geométrica de mesófilos	Vaca	2,8	67	D'Amico et al. (2008)	
		3,1	12	D'Amico e Donnelly (2010)	
	Cabra	3,4	49	D'Amico et al. (2008)	
		3,1	5	D'Amico e Donnelly (2010)	
	Ovelha	3,4	22	D'Amico et al. (2008)	
		3,3	4	D'Amico e Donnelly (2010)	
Mesófilos	Cabra e ovelha	3,8	123	Friker et al. (2019)	
		Cabra	5,4	67	D'Amico et al. (2008)
			4,2	5	D'Amico e Donnelly (2010)
	4,7		60	Foschino et al. (2002)	
	Ovelha	5,7	11	Pisano et al. (2006)	
		5,5	16	Sanjuan et al. (2003)	
		5,4	67	D'Amico et al. (2008)	
		3,5	4	D'Amico e Donnelly (2010)	
	Bactérias lácticas	Cabra	5,4 - 6,1	22	Picon et al. (2016)
	Psicrotróficos	Cabra	4,1	61	Yamazi et al. (2013)
		Ovelha	2,7 - 4,7	240	Fotou et al. (2011)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cabra e ovelha	2,0 - 4,7	-	Montel et al. (2014)
Ovelha			4,1	16	Sanjuan et al. (2003)
		<1	240	Fotou et al. (2011)	
Bactérias coliformes	Vaca	3,9	12	D'Amico e Donnelly (2010)	
		2,5	67	D'Amico et al. (2008)	
	Cabra	3,3	5	D'Amico e Donnelly (2010)	
		2,3	49	D'Amico et al. (2008)	
	Ovelha	3,5	11	Pisano et al. (2006)	
		2,3	16	Sanjuan et al. (2003)	
<i>Escherichia coli</i>	Cabra + Ovelha	1,5	123	Friker et al. (2019)	
	Cabra	1,7 - 2,8	61	Yamazi et al. (2013)	
	Ovelha	0,45	16	Sanjuan et al. (2003)	
Leveduras	Cabra + Ovelha	1 - 4	-	Montel et al. (2014)	
	Cabra	2,4	60	Foschino et al. (2002)	
	Ovelha	2,5	11	Pisano et al. (2006)	
Bolores	Cabra	2,1	60	Foschino et al. (2002)	

n – número de amostras analisadas.

No que diz respeito às **bactérias coliformes**, diversos autores referem como limite higiénico em leite cru $2 \log \text{UFC mL}^{-1}$ (McSweeney 2007; D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010), referindo ainda que contagens superiores são indicadoras de práticas de higiene inadequadas, possível contaminação fecal ou devido à presença de mastites no efetivo leiteiro (McSweeney et al. 2017). Gwandu et al. (2018) alerta para o facto de que a água usada para limpeza de todo o equipamento que entra em contacto com o leite, poder ser uma fonte de contaminação por coliformes, especialmente se esta não for tratada (furos e poços).

Trabalhos desenvolvidos por D'Amico et al. (2008) e D'Amico e Donnelly (2010) em leite cru de vaca e cabra utilizado para a produção de queijo, apresentaram valores médios para as contagens de coliformes de 2,5 e 3,9 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ para leite de vaca e 2,3 e 3,3 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ para leite de cabra. Por sua vez Sanjuan et al. (2003) concluiu que o valor médio das contagens de coliformes de 2,3 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ indicava contaminação moderada do leite durante a ordenha, propondo a melhoria das condições de higiene, especialmente limpeza dos úberes e controlo de mastites. Pisano et al. (2006), ao analisar o leite cru de ovelha utilizado no fabrico de Queijo Fiore Sardo DOP, obteve um valor médio de 3,5 $\log \text{UFC mL}^{-1}$, tendo mais tarde observado uma diminuição significativa das contagens coliformes no queijo, entre as 48h e 1 mês de maturação.

A presença de ***E.coli* β -glucuronidase** em leite cru pode ser resultado de práticas de higiene inadequadas, contaminações ambientais ou fecais (Perin et al. 2018; Bohnlein et al. 2021), estando fortemente associada à ausência de higienização dos úberes antes da ordenha ou à presença de mastites no efetivo leiteiro (McSweeney et al. 2017), como anteriormente referido para as bactérias coliformes. Em leite de cabra, Yamazi et al. (2013), apresentou o valor médio de 1,7 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ ao estudar o efeito de um período longo de armazenamento a baixa temperatura, concluindo que o armazenamento do leite por períodos superiores a 48 h provoca um aumento das contagens de *E.coli* para 2,8 $\log \text{UFC mL}^{-1}$. Friker et al. (2019) registou valores médios de 1,5 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ em leite cru de cabra e de ovelha para consumo; Sanjuan et al. (2003) obteve uma contagem média de 0,45 $\log \text{UFC mL}^{-1}$ ao estudar a microflora de interesse tecnológico em leite cru ovino para consumo, tendo detetado uma diminuição das contagens ao longo do período de refrigeração.

Os **bolores** tendem a estar presentes em menor quantidade que as **leveduras**, sendo que Quigley et al. (2013) menciona que as contagens de leveduras podem apresentar valores compreendidos entre 2 e 4 $\log \text{UFC mL}^{-1}$. Foschino et al. (2002), ao analisar a qualidade microbiológica de leite cru de cabra destinado à produção de queijo, registou

valores médios de leveduras de 2,4 log UFC mL⁻¹ e Pisano et al. (2006), também em leite de cabra, obteve contagens médias de leveduras de 2,5 log UFC mL⁻¹.

A contaminação do leite cru pode ocorrer em diversas fases do processo, desde a presença de mastites, ausência de higienização dos úberes sujos antes da ordenha, equipamento em condições de higiene deficientes, uso de água contaminada ou refrigeração inadequada (Martins 2001; McSweeney 2007; Quigley et al. 2013; McSweeney et al. 2017; Gwandu et al. 2018).

Para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru da Região Centro serão realizadas, para além da contagem de microrganismos mesófilos previstas na legislação, contagens de psicrótróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores, à semelhança dos trabalhos anteriores (Foschino et al. 2002; Sanjuan et al. 2003; Pisano et al. 2006; D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010; Fotou et al. 2011; Yamazi et al. 2013; Picon et al. 2016; Friker et al. 2019).

3.2.2. Qualidade microbiológica em queijo fabricado com leite cru

Em queijos produzidos com leite cru, o Regulamento (CE) N.º 1441/2007 prevê a quantificação de estafilococos coagulase positiva e as pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*.

A quantificação de **estafilococos coagulase positiva**, cuja principal presença é a de *Staphylococcus aureus*, constitui um critério para avaliação da higiene dos processos, que, segundo o Regulamento supramencionado, deve ser avaliado “durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”. Embora a legislação não o especifique, segundo McSweeney et al. (2017), este momento é imediatamente após o fabrico. A legislação refere a recolha de cinco amostras de queijo do mesmo lote e - no caso de resultado insatisfatório, com contagens superiores a 10⁵ UFC g⁻¹ (5 log UFC g⁻¹) - recomenda a “melhoria da higiene na produção e da seleção de matérias-primas”. É também mencionado neste Regulamento que “se se detetarem valores superiores a 10⁵ UFC g⁻¹, o lote de queijo deve ser testado para deteção de enterotoxinas estafilocócicas” (CE 2007).

A contaminação do queijo com estafilococos coagulase positiva ocorre pela contaminação do leite durante a ordenha ou com equipamento contaminado (Perin et al. 2018; Brom et al. 2020), mas o processo de salga, a diminuição do pH e a presença de bactérias lácticas no leite cru e queijo permitem reduzir o seu crescimento (Yoon et al. 2016; Food Standards Scotland 2018). As enterotoxinas estafilocócicas, quando

presentes em alimentos, podem causar intoxicações alimentares (Food Safety Authority of Ireland 2020) e a prevenção passa por rastrear a presença de mastite nos rebanhos e limitar o seu crescimento durante a refrigeração do leite cru, através do controlo da temperatura (<6 °C) (Brom et al. 2020). Tavararia e Malcata (1998) observaram, em Queijo Serra da Estrela DOP, valores entre 5,5 e 8,4 log UFC g⁻¹, possivelmente associados a más práticas de higiene durante a ordenha, falta de limpeza dos equipamentos, proximidade da sala de cura aos estábulos e ausência de controlo de temperatura e humidade nas salas de cura.

No que diz respeito a *Salmonella spp.*, o Regulamento (CE) N.º 1441/2007 refere que a mesma deve estar ausente em 25 g de queijo fabricado com leite cru, devendo realizar-se a pesquisa quando os queijos são “colocados no mercado durante o seu período de vida útil”. A pesquisa de *Salmonella spp.* é um critério para a avaliação da segurança dos géneros alimentícios, sendo que a sua ausência é um indicador da qualidade microbiológica do lote testado e de boas práticas de higiene. A manifestação mais comum de infeção com *Salmonella spp.* é a gastroenterite. A presença no leite deve-se à falta de higiene durante a ordenha e transformação do leite, sendo a principal fonte de contaminação as fezes ou equipamento contaminado, mas também pode ocorrer diretamente por um animal infetado (Brom et al. 2020).

Para *Listeria monocytogenes*, o Regulamento (CE) N.º 1441/2007 dita que em queijo fabricado com leite cru esta deve estar ausente em 25 g, sendo a pesquisa realizada “antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu”. A pesquisa de *Listeria monocytogenes* atesta a qualidade microbiológica do lote testado e as boas práticas de higiene nos processos, sendo um critério de avaliação da segurança dos géneros alimentícios. *Listeria monocytogenes* é um microrganismo que pode persistir em instalações de produção alimentar e contaminar os alimentos após a transformação, principalmente devido à sua capacidade de sobrevivência em condições de stress ambiental (concentração de sal elevada, pH baixo e temperaturas baixas) (Food Standards Scotland 2018). É a causa da listeriose, uma doença alimentar, que embora tenha uma prevalência baixa, tem uma taxa de mortalidade entre 20 e 30 % (McSweeney et al. 2017).

Resultados obtidos por Pisano et al. (2006), em Queijo Fiore Sardo DOP produzido com leite cru de ovelha em Itália, e Brooks et al. (2012), em queijo fabricado com leite cru nos Estados Unidos, revelaram ausência de *Salmonella spp.* e de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas. Brooks et al. (2012) concluiu ainda que 60 dias de cura para os

queijos produzidos com leite cru sem qualquer tipo de tratamento térmico aparenta ser um período adequado para a obtenção de produtos microbiologicamente seguros.

Para além dos parâmetros legislados, também são referidos na literatura indicadores da qualidade de um queijo as bactérias lácticas, enterobactérias, bactérias coliformes e leveduras (Freitas et al. 1996; Tavarina e Malcata 1998; Tavarina e Malcata 2000; Picon et al. 2006; Pisano et al. 2006; Tavarina et al. 2006; Pintado et al. 2008), como se resume na Tabela 3.14.

As **bactérias lácticas** desempenham um papel tecnológico relevante no processo de produção do queijo (Perin et al. 2018; McSweeney et al. 2017), sendo este grupo de microrganismos o predominante (7 a 9 log UFC g⁻¹), conforme observado na Tabela 3.14. Estudos com Queijos DOP portugueses, fabricados a partir de leite cru de pequenos ruminantes, observaram valores de bactérias lácticas entre 6 e 9 log UFC g⁻¹ (Freitas et al. 1996; Tavarina e Malcata 1998; Tavarina et al. 2006; Pintado et al. 2008). Em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante, Freitas et al. (1996) menciona contagens de 9 log UFC g⁻¹ aos zero dias de cura, 8 log UFC g⁻¹ aos 40 dias de cura e 6 log UFC g⁻¹ aos 180 dias de cura. Tavarina e Malcata (1998), em Queijo Serra da Estrela DOP, registou contagens de 7 log UFC g⁻¹ ao longo de todo o período de cura. Também em Queijo Serra da Estrela DOP, Tavarina et al. (2006) concluiu que as bactérias lácticas foram o grupo dominante em todos os períodos de cura em todas as queijarias; além disso, até aos 90 dias de cura, as contagens eram mais elevadas em queijos produzidos com leite não refrigerado do que com leite refrigerado.

A presença de contagens elevadas de **psicrotróficos** no leite pode levar a concentrações elevadas de enzimas extracelulares, que podem induzir a perda de qualidade ao nível de textura e sabor no queijo (Walstra et al. 2006).

A contagem de **enterobactérias** em queijos é um parâmetro que permite identificar se ocorreram más práticas de higiene, possibilitando avaliar o estado higiénico geral do queijo em análise (Perin et al. 2018; INSA 2019). Resultados obtidos por diversos autores mostram valores de enterobactérias desde <1 log UFC g⁻¹ até >8 log UFC g⁻¹ (Freitas et al. 1996; Tavarina e Malcata 1998; Tavarina e Malcata 2000; Pintado et al. 2008).

Em Queijo Serra da Estrela DOP, a literatura apresenta valores entre 6 e >8 log UFC g⁻¹ (Tavarina e Malcata 1998; Tavarina e Malcata 2000), associando contagens elevadas (6 a 8,5 log UFC g⁻¹) de enterobactérias a más práticas de higiene, observando-se um decréscimo das contagens durante o período de cura do queijo. Em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante este decréscimo das contagens durante o período de cura foi de 7 log UFC g⁻¹, aos 0 dias, para < 1 log UFC g⁻¹ após 180 dias de cura (Freitas et al. 1996).

Tabela 3.14 - Parâmetros microbiológicos observados em amostras de queijos fabricados com leite cru: estafilococos coagulase positiva, bactérias lácticas, enterobactérias, bactérias coliformes e leveduras.

Parâmetros microbiológicos	Queijo	Contagens (log UFC g ⁻¹)	Período de cura (dias)	Referência bibliográfica
Estafilococos coagulase positiva	Serra da Estrela DOP	5,5 - 8,4	30 - 60	Tavaria e Malcata (1998)
Bactérias lácticas	Beira Baixa DOP tipo Picante	6 - 9	0 - 180	Freitas et al. (1996)
	Serra da Estrela DOP	7 - 9	60 - 180	Tavaria et al. (2006)
		7	30 - 60	Tavaria e Malcata (1998)
	Terrincho DOP	9	30	Pintado et al. (2008)
Enterobactérias	Serra da Estrela DOP	6 - >8	60	Tavaria e Malcata (1998)
		6	60	Tavaria e Malcata (2000)
	Beira Baixa DOP tipo Picante	<1 - 7	0 - 180	Freitas et al. (1996)
	Terrincho DOP	6	30	Pintado et al. (2008)
Bactérias coliformes	Fiore Sardo DOP	<1 - 2,9	30 - 270	Pisano et al. (2006)
Leveduras	Serra da Estrela DOP	0,7 - 7	60	Tavaria e Malcata (1998)
		3 - 5	60	Tavaria e Malcata (2000)
	Beira Baixa DOP tipo Picante	>3 - 7	0 - 180	Freitas et al. (1996)
	Terrincho DOP	4 - 6	30	Pintado et al. (2008)
	Fiore Sardo DOP	0,7 - 2,5	30 - 270	Pisano et al. (2006)

A Food Standards Scotland (2018) sublinha a importância da quantificação de bactérias coliformes, como indicador das condições de higiene durante o fabrico, referindo a dificuldade em garantir a sua ausência em muitas tipologias de queijo. É ainda mencionado que esta quantificação deve ser complementada com a contagem de *E.coli*, que constitui um melhor indicador de contaminação fecal, e com a pesquisa de *L. monocytogenes*. Pisano et al. (2006), em Queijo Fiore Sardo DOP, observou contagens

de bactérias coliformes de 2,9 log UFC g⁻¹ aos 30 dias de cura e <1 log UFC g⁻¹ aos 270 dias de cura.

A quantificação de *E.coli* em queijo esteve contemplada na Diretiva 92/46/CEE, acabando por ser retirada, pois a sua presença deixou de ser considerada um indicador fiável de contaminação fecal e a sua ausência não garantia a ausência de patogénios entéricos (Parlamento Europeu 1992; INSA 2019). A Food Standards Scotland (2018) recomenda um limite higiénico de 2 log UFC g⁻¹ em queijo produzido com leite cru, referindo que *E.coli* pode até ser considerada como parte da microflora característica em algumas tipologias de queijo.

As **leveduras** desempenham um papel relevante no processo de cura do queijo e, por essa razão, são um parâmetro recorrentemente analisado (Kongo and Malcata 2016; McSweeney et al. 2017), com valores até 7 log UFC g⁻¹ (Tabela 3.14). Em Queijo Serra da Estrela, Tavaría e Malcata (1998) registaram contagens entre 0,7 e 7 log UFC g⁻¹ e Tavaría e Malcata (2000) obtiveram contagens entre 3 e 5 log UFC g⁻¹, aos 60 dias de cura, tendo sido significativamente afetadas pelo ano em que foi feita a sua quantificação. No estudo de Freitas et al. (1996), à semelhança do descrito para as enterobactérias, as contagens de leveduras diminuem com o avançar do período de cura (de 6 a <3 log UFC g⁻¹), sendo referido que, embora possam existir leveduras que causem deterioração e aromas desagradáveis, a maioria tem um papel crucial para o desenvolvimento do sabor/aroma, como descrito para o Queijo de Beira Baixa DOP tipo Picante. Pisano et al. (2006), em Queijo Fiore Sardo DOP registou contagens de 2,5 log UFC g⁻¹ aos 30 dias de cura e 0,7 log UFC g⁻¹ aos 270 dias de cura.

Neste trabalho, para a avaliação dos Queijos DOP da Região Centros, para além dos parâmetros contemplados na legislação (quantificação de estafilococos coagulase positiva e pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*), serão também incluídas contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β-glucuronidase positiva, leveduras, bolores e *Clostridium perfringens*, tal como os estudos realizados por outros autores (Freitas et al. 1996; Tavaría e Malcata 1998; Tavaría e Malcata 2000; Picon et al. 2006; Pisano et al. 2006; Tavaría et al. 2006; Pintado et al. 2008; Brooks et al. 2012).

Capítulo 4 - Objetivos

A realização deste estágio teve como principal objetivo obter contacto direto com a realidade laboral, a aquisição e aprofundamento de competências práticas e a obtenção de autonomia nas tarefas desenvolvidas. Estando integrado no Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro, este estágio focou-se na caracterização da microbiota de leite cru utilizado na produção de Queijos DOP da Região Centro e da microbiota desses queijos, em particular o Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.

Para cumprir o objetivo geral proposto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Análise microbiológica da matriz leite, de acordo com os parâmetros legislados pelo Regulamento (CE) N.º 1662/2006 (contagem em placas a 30°C) e com a literatura analisada (psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores);
- Realização de questionários às explorações leiteiras com o intuito de fazer a sua caracterização sumária e possibilitar a comparação com os resultados obtidos nas análises microbiológicas;
- Análise microbiológica da matriz queijo, de acordo com os parâmetros definidos no Regulamento (CE) N.º 1441/2007 (quantificação de estafilococos coagulase positiva e as pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*), complementando com as contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β-glucuronidase positiva, leveduras, bolores e *Clostridium perfringens* (estes últimos, à semelhança da literatura analisada).

Capítulo 5 - Material e Métodos

5.1. Caracterização sumária das explorações leiteiras

De forma a poder fazer uma caracterização sumária das explorações agrícolas nas quais foram recolhidas as amostras de leite, foi elaborado um questionário que abordou a Caracterização da exploração, Saúde dos animais, Alimentação e água, Condições do estábulo, da Ordenha e da Sala de armazenamento do leite (Anexo II).

5.2. Qualidade microbiológica de leite cru e de queijo

5.2.1 Recolha de amostras de leite cru e de queijo

A recolha de amostras de leite foi realizada seguindo as indicações da ISO 707/IDF50 (2008) e utilizando o copo de recolha de amostras da Figura 5.1. Primeiramente, procedeu-se à homogeneização do leite, utilizando os agitadores do tanque de refrigeração ou agitando com o copo de recolha da amostra (Figura 5.2). O copo de recolha da amostra desinfetou-se com álcool etílico 70% (v/v) antes e depois da recolha. A amostra foi recolhida em duplicado para recipientes esterilizados (copo de 180 mL), previamente codificados. Após a recolha, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia em condições de refrigeração (caixas isotérmicas com termoacumuladores).

No que concerne às amostras de queijo, foram recolhidos Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP. Os queijos recolhidos apresentavam-se embrulhados em papel vegetal e/ou saco de plástico, tendo sido transportados para o CATAA em condições de refrigeração, à semelhança do leite.

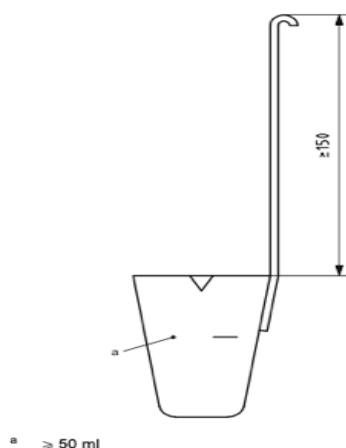


Figura 5.1 - Recipiente utilizado na recolha de amostras de leite.

A periodicidade da recolha de amostras foi quinzenal para as amostras de leite cru nos tanques de refrigeração das explorações e mensal para os queijos em queijarias. A recolha de amostras durante o estágio decorreu no horizonte temporal de setembro de 2020 a junho de 2021, mas esta tarefa do Projeto já se tinha iniciado em fevereiro de 2019, com uma interrupção durante o primeiro o Estado de Emergência Nacional devido à pandemia COVID-19, de março de 2020 a maio de 2020.



Figura 5.2 - Recolha de amostra de leite no tanque de refrigeração com agitação.

Na área definida para produção de Queijo da Beira Baixa DOP foram recolhidas amostras de leite em cinco explorações agrícolas (LBB1-LBB5) e de queijo numa queijaria (QBB1). No que concerne ao Queijo Rabaçal DOP, foram recolhidas amostras de leite em dois produtores (LR1 e LR2) e amostras de queijo numa queijaria (QR1). Por sua vez, na região de produção de Queijo Serra da Estrela DOP foram recolhidas amostras de leite

em nove produtores (LSE1-LSE9) e queijos em 3 queijarias (QSE1-QSE3). No total, foram recolhidas 406 amostras de leite cru (363 de ovelha e 43 de cabra) utilizadas para o fabrico de Queijos DOP da Região Centro e 56 queijos (Tabela 5.1). Realça-se que a região do Rabaçal apenas tem dois produtores e que, na exploração LBB2, o tanque reúne leites de vários produtores. A Figura 5.3 expõe as localizações dos produtores de leite nas respetivas zonas DOP demarcadas.

Produtores de leite para o fabrico
de Queijo da Beira Baixa DOP



Produtores de leite para o fabrico
de Queijo Rabaçal DOP



Produtores de leite para o fabrico
de Queijo Serra da Estrela DOP



Figura 5.3 - Localização das explorações agrícolas onde foram recolhidas as amostras de leite

Tabela 5.1 - Planificação de recolha de amostras de leite e de queijo.

Área geográfica definida para os Queijos DOP da Região Centro	Recolha de amostras					
	Leite (recolha quinzenal de amostras)				Queijo (recolha mensal de amostras)	
	Associação Produtores	Produtor	Tipo de leite	Nº	Queijaria	Nº
Queijo da Beira Baixa DOP	APQDCB	LBB1	Ovelha	44	QBB1	17
		LBB2	Ovelha	26		
		LBB3	Cabra	10		
		LBB4	Ovelha	42		
		LBB5	Ovelha	43		
<i>Subtotal</i>				165	17	
Queijo Rabaçal DOP	APRORABAÇAL	LR1	Ovelha	43	QR1	11
		LR2	Cabra	33		
<i>Subtotal</i>				76	11	
Queijo Serra da Estrela DOP	ANCOSE	LSE1	Ovelha	12	QSE1	16
		LSE2	Ovelha	13		
		LSE3	Ovelha	31		
	COAPE	LSE4	Ovelha	15	QSE2	5
		LSE5	Ovelha	15		
		LSE6	Ovelha	8		
	EstrelaCOOP	LSE7	Ovelha	8	QSE3	7
		LSE8	Ovelha	33		
		LSE9	Ovelha	30		
<i>Subtotal</i>				165	28	
Total				406	56	

No que diz respeito às raças de ruminantes, na área definida para produção de Queijo da Beira Baixa DOP, o leite provém de ovelhas das raças Merino, Assaf e Lacaune ou de uma mistura de raças. Relativamente à área de produção do Queijo Rabaçal DOP, o produtor de leite de cabra explora animais da raça Saanen. Para a região de produção de Queijo Serra da Estrela DOP, o leite recolhido era da raça Bordaleira Serra da Estrela, como definido no Caderno de Especificações (2011).

Merino da Beira Baixa é uma raça autóctone com ligações à zona sul do distrito de Castelo Branco, que pode ser explorada em zonas de solos pobres e clima agreste, resistindo tanto a períodos de elevada pluviosidade como a temperaturas elevadas. Não é um animal especializado em produção de leite, carne ou lã, mas no distrito de Castelo Branco tem uma produção orientada para o leite (AniDop 2019). A ovelha da raça Assaf está entre as melhores para a produção leiteira em sistemas intensivos, resultando do cruzamento entre a Awassi (raça israelita) e a Frísia do Leste (raça alemã) (Freitas 2017). Lacaune é uma raça ovina originária de França, muito resistente a grandes variações de temperatura e que é primariamente utilizada para produção de leite, o qual apresenta um elevado teor de gordura e proteína, levando a um rendimento queijeiro elevado (Barillet 2001). A raça caprina Saanen é proveniente da Suíça, apresentando um elevado rendimento leiteiro (Devendra e Haenlein 2016). Bordaleira da Serra da Estrela (preta ou branca) é bem-adaptada às condições existentes de pastoreio, sendo uma das principais raças ovinas autóctones de Portugal, é também considerada como uma importante produtora de leite da Meseta Ibérica (AniDoP 2019). O seu período de lactação pode durar até 220 dias, não existindo produção de leite entre junho e setembro, o que se vai refletir na ausência de amostras durante esse período.

5.2.2. Análises microbiológicas em amostras de leite cru e de queijo

Em leite cru de pequenos ruminantes para fabrico de queijo só os mesófilos estão legislados (Regulamento (CE) N.º 1662/2006). Para além dos mesófilos, para a caracterização da microbiota de leite cru utilizado no fabrico de Queijos DOP da Região Centro, foram também efetuadas contagens de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) de microrganismos psicotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva, leveduras e bolores, à semelhança de outros autores (Foschino et al. 2002; Pisano et al. 2006; D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010; Yamazi et al. 2013; Friker et al. 2019), de acordo com as metodologias indicadas na Tabela 5.2. Seguindo as instruções da ISO 6887-1 (1999) e ISO 6887-5 (2010), foi feita a preparação da suspensão inicial e das diluições decimais sucessivas.

Tabela 5.2 - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de leite cru.

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

A caracterização da microbiota de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP, incluiu a análise de crosta e de massa, à semelhança do descrito por Irlinger et al. (2014) e Choi et al. (2020). A crosta e a massa do queijo apresentam uma microbiota distinta, não só pela diferença dos níveis de oxigénio entre as duas partes, mas também devido ao processo de cura, humidade e ambiente envolventes. A presença de oxigénio na superfície do queijo permite desenvolver organismos aeróbicos, que não poderiam proliferar na massa, considerando que esta apresenta um ambiente relativamente anaeróbico. Durante a cura as interações entre a superfície do queijo e o ambiente envolvente ajudam a desenvolver uma crosta natural, e o processo de salga apoia o desenvolvimento de microrganismos na sua superfície. A diversidade microbiológica é também influenciada pelo nível de humidade, pois existe uma diminuição significativa de água durante o período de cura (Choi et al. 2020).

Para esta caracterização, efetuou-se a contagem de UFC de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β-glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positivas (previsto no Regulamento (CE) N.º 1441/2007), leveduras, bolores e *Clostridium perfringens*. Nas amostras de queijo, dado que se trata de um produto final, e seguindo os critérios de segurança alimentar definidos no Regulamento (CE) N.º 1441/2007, efetuou-se a pesquisa de *Salmonella* spp.

(em 25 g) (ISO 6579-1:2017) e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* (em 25 g) (ISO 11290-1:2017). Na Tabela 5.3 apresentam-se os métodos, meios de cultura, técnicas de inoculação e condições de incubação para as contagens efetuadas na matriz queijo.

Nas contagens, procedeu-se à validação das leituras efetuadas nas diluições sucessivas e nos ensaios em paralelo (ISO 14461-2:2005) e efetuaram-se os cálculos (ISO 7218:2007), sendo os resultados expressos em UFC mL⁻¹ para a matriz leite e em UFC g⁻¹ para queijo.

Tabela 5.3 - Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de queijo.

Parâmetros microbiológicos	Métodos	Meio de cultura	Inoculação	Incubação
Bactérias lácticas	ISO 15214:1998	MRS	Incorporação	30°C; 72±3h
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	VRBL	Incorporação em dupla camada	37°C; 24±2h
Enterobactérias	ISO 21528-2:2017	VRBG	Dupla camada	37°C; 24±2h
<i>E.coli</i> β -glucuronidase positiva	ISO 16649-2:2001	TBX	Incorporação	44°C; 18-24h
Estafilococos coagulase positivas	ISO 6888-2:1999/ Amd 1:2003	BP+RPF	Incorporação	35°C; 18-24h (+24h)
Psicrotróficos	ISO 17410:2001	PCA	Incorporação	6,5°C; 10d
<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937:2004	TSC	Dupla camada	37°C; 20±2h Anaerobiose
Leveduras e Bolores (a _w >0,95)	ISO 21527-2:2008	DG18	Espalhamento	25°C; 5-7d

É importante referir que as análises dos parâmetros bactérias coliformes e *E.coli* apenas começaram a ser realizadas em agosto de 2019, existindo assim um menor no número de amostras analisadas, tanto em leite como em queijo.

5.3. Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa *IBM SPSS Statistics 21*. As contagens foram transformadas em log, foram calculadas médias, desvios-padrão, mínimos, máximos e realizou-se a análise de variância (ANOVA), considerando o fator em estudo: a região. Foi aplicado o teste post hoc Tukey para comparações múltiplas para um nível de significância de 0,05, quando se observaram diferenças significativas.

Realizou-se também o teste t-student para verificar se existem diferenças entre os valores médios da crosta e da massa dos queijos, para um nível de significância de 0,05.

Para cada matriz, para estudar a correlação entre parâmetros microbiológicos, efetuou-se a correlação de *Pearson*.

Capítulo 6 - Resultados e Discussão

6.1. Caracterização sumária das explorações leiteiras

De entre os 11 produtores de leite, responderam ao questionário quatro (LBB1, LSE1, LSE3 e LSE9) (Anexo III). A exploração LBB1 tem 340 hectares de área e 1100 ovinos, tendo produzido 30000 L de leite em 2020; LSE1 explora 190,8 hectares, nos quais tem 241 ovelhas Bordaleira Serra da Estrela; LSE3 é composta por 1874 hectares e 80 Bordaleiras Serra da Estrela; a exploração LSE9 tem 90 hectares de área e 260 ovelhas Bordaleira Serra da Estrela, tendo produzido de 16000 L de leite em 2020.

Relativamente à saúde dos animais, os produtores afirmaram ter apoio veterinário, cumprimento dos períodos de quarentena/isolamento de animais doentes em estábulos separados, cumprimento dos períodos de carência e controlo da presença de mastites através do Teste Californiano de Mastites. Em 2020, em LBB1 registaram-se sete casos de mastites e em LSE9 10 casos; os outros produtores referiram a não ocorrência de mastites nos seus animais. Nenhum dos produtores realiza controlo de pragas.

Quanto à alimentação e água, todos os produtores fornecem pastagem, pasto cultivado, feno/palha e concentrado aos animais, sendo um regime controlado por acompanhamento técnico. Os produtores LSE1, LSE3 e LSE9 apenas utilizam bebedouros para fazer o abeberamento dos animais; o produtor LBB1 complementa com água de charca ou barragem. A água utilizada nas explorações LSE1 e LSE3 é da rede pública; o produtor LBB1 recorre a um furo (água tratada), efetuando semestralmente o controlo de qualidade; o produtor LSE9 utiliza exclusivamente água não tratada.

A estabulação mista, com camas de palha e declives no pavimento para drenagem, é utilizada nas explorações LBB1, LSE1 e LSE3, em LSE9 é feita uma estabulação livre, com camas de palha e mato. LSE1 e LSE3 utilizam pavimento ripado, que permite a drenagem, e realizam a muda de cama 1 a 2 vezes por ano; LBB1 apresenta pavimento de terra e efetua muda de cama semanalmente; LSE9 utiliza pavimentação em cimento e realiza a muda de cama quinzenalmente.

No que diz respeito às condições de ordenha, têm pavimentos de azulejo (LBB1 e LSE3), cimento (LSE1) e mosaico (LSE9), com drenagem, e água quente e fria para utilização na sala. As explorações LBB1, LSE1 e LSE3 não têm lava-mãos com comando não manual, toalhetes descartáveis nem dispositivo para sabonete líquido, não cobrem cortes com curativo ou uma luva impermeável, mas todas as quatro explorações utilizam aventais

durante a ordenha. Apenas as explorações LBB1 e LSE9 têm caixa de primeiros socorros, mas todos os produtores referiram que têm implementado um plano de higiene de instalações e equipamentos.

A exploração LBB1 realiza a limpeza da sala de ordenha quinzenalmente, LSE1 e LSE9 fazem uma limpeza diária e a exploração LSE3 limpa as instalações após cada ordenha. Todos os produtores ordenham duas vezes por dia, de manhã e à noite, utilizando a ordenha mecânica, LSE9 complementa com ordenha manual. Nenhum produtor realiza qualquer tipo de limpeza aos úberes, mas separam os animais doentes, realizando a sua ordenha à mão (LBB1, LSE1, LSE3) ou mecânica, no final da ordenha (LSE9). Apenas o produtor LBB1 possui um equipamento de ordenha que deteta leites não conformes (medição dos níveis de Lactato Desidrogenase, indicando a possível presença de mastite) e os separa automaticamente. A limpeza dos equipamentos de ordenha é feita por sistemas de limpeza automáticos com detergentes homologados em todas as explorações e em LBB1 realiza-se a verificação diária do equipamento de ordenha pelo técnico de ordenha e uma revisão semestral pelo fornecedor. Para as explorações LSE1, LSE3 e LSE9 também é efetuada uma verificação diária pelo técnico de ordenha e anual pelo técnico da associação.

Quanto às condições da sala de armazenamento do leite, LBB1, LSE3 e LSE9 têm esta divisão separada fisicamente do local de ordenha. Em LSE1 o leite é armazenado em bilhas na sala de ordenha e depois transportado até à sala de armazenamento. A limpeza da sala é realizada quinzenalmente na exploração LBB1 e diariamente em LSE1, LSE3 e LSE9, sendo utilizada lixívia ou desinfetante nas últimas três explorações. Todas as explorações armazenam o leite em tanques de inox com refrigeração a 4°C e a frequência de recolha de leite é de 1,5 dias para LBB1, a cada dois dias para LSE1 e diária, exceto aos domingos, para LSE3 e LSE9. A limpeza da sala de armazenamento do leite é feita a cada 1,5 dias na exploração LBB1, a cada dois dias para LSE1 e diária nas explorações LSE3 e LSE9, com detergente na primeira e lixívia ou desinfetante nas últimas três explorações.

6.2. Qualidade microbiológica do leite cru

6.2.1. Microrganismos mesófilos em leite cru

O Regulamento (CE) N.º 1662/2006 refere que, se se pretender utilizar leite cru de espécies diferentes da vaca (ovelha e cabra, no caso dos Queijos DOP da Região Centro) no fabrico de produtos por um processo que não inclua nenhum tratamento térmico, os

operadores de empresas do sector alimentar devem tomar as medidas necessárias para assegurar que o leite cru utilizado obedece ao seguinte critério: a média geométrica das contagens de microrganismos mesófilos, com pelo menos duas colheitas mensais num período de dois meses, apresente valores iguais ou inferiores a 5×10^5 UFC mL⁻¹ (5,7 log UFC mL⁻¹). Este limite visa garantir a produção de leite cru de qualidade, com boas práticas de higiene associadas, tendo em conta que os microrganismos mesófilos constituem um indicador de qualidade do leite, refletindo as condições de higiene, desde o úbere, aos equipamentos de ordenha, ar e água com que o leite contacta (Perin et al. 2018; INSA 2019).

A Figura 6.1 mostra os valores da média geométrica para a contagem de microrganismos mesófilos em leite cru, para o fabrico de Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP. Na recolha de amostras de fevereiro de 2019 a abril de 2021, nem sempre foi possível cumprir a meta de duas amostras mensais em dois meses consecutivos em todos os produtores, devido à pandemia COVID-19 e outros imponderáveis, tanto por parte dos produtores de leite como do CATAA.

As médias geométricas de microrganismos mesófilos variaram entre 5,0 e 6,3 log UFC mL⁻¹, com valores superiores aos encontrados por outros autores em leite cru de ovelha, cabra e vaca (2,8-3,4 log UFC mL⁻¹) (D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010). Das 69 médias geométricas calculadas, 83% apresentava qualidade microbiológica satisfatória ($\leq 5,7$ log UFC mL⁻¹), em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1662/2006. Mais concretamente, na região definida para a produção de Queijo Rabaçal DOP, todos os valores foram conformes, importando sublinhar que as amostras de leite cru desta região provêm de apenas dois produtores. Na região da Serra da Estrela contabilizaram-se 92% valores satisfatórios. Já o leite produzido na região da Beira Baixa apresentou valores iguais ou inferiores ao legislado em 67% das médias geométricas, tendo sido encontrados valores superiores a 5,7 log UFC mL⁻¹ para os produtores LBB1 (3), LBB5 (3), LBB2 (2), LBB3 (1) e LBB4 (1).

Assim, considerando o único parâmetro microbiológico legislado em leite cru para produção de queijo, os resultados obtidos para a média geométrica de contagens de mesófilos indicaram qualidade microbiológica satisfatória em todas as amostras com origem no Rabaçal, e oportunidade de melhoria da qualidade microbiológica do leite cru utilizado no fabrico de Queijo Serra da Estrela DOP e Queijo da Beira Baixa DOP.

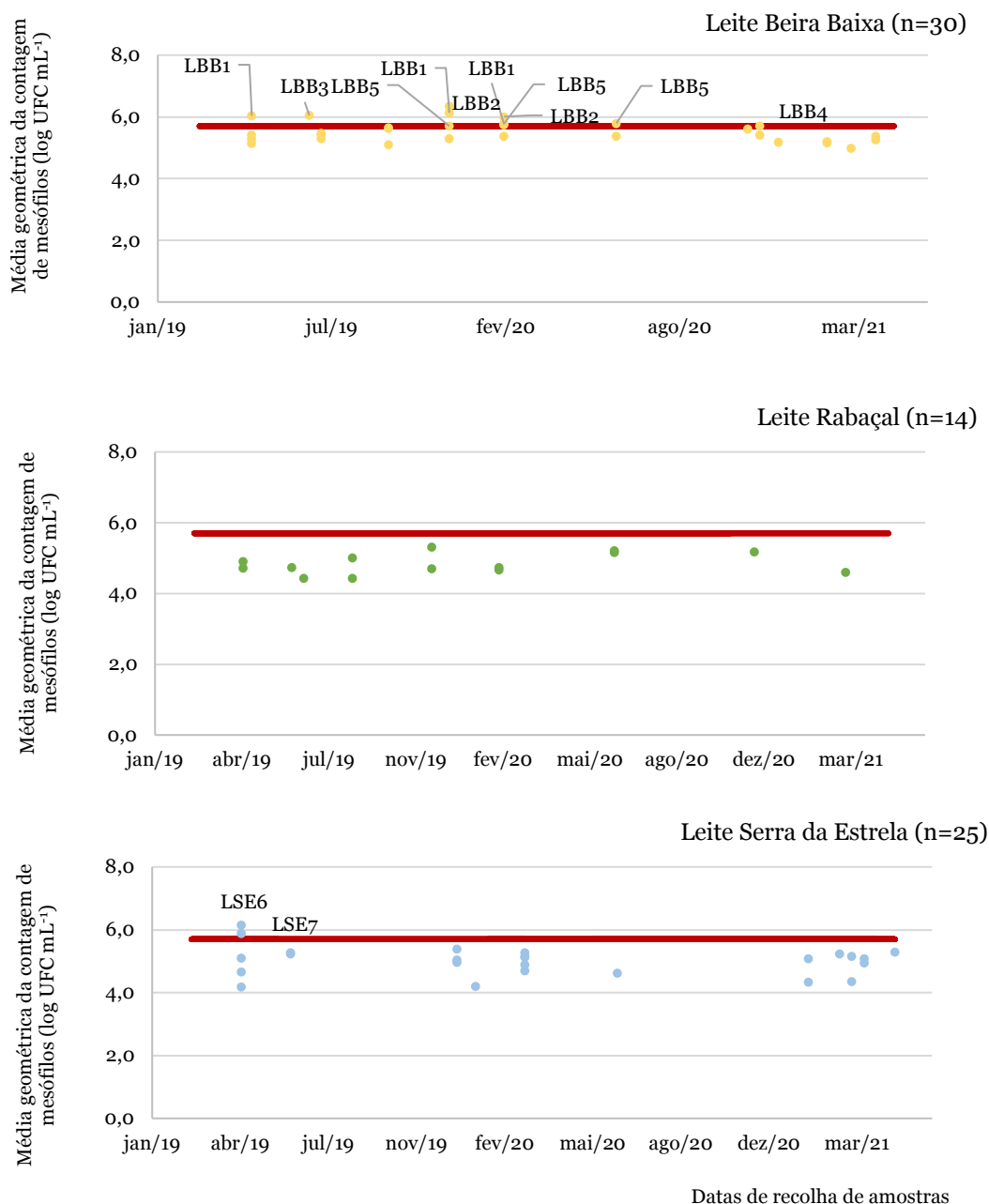


Figura 6.1 - Média geométrica das contagens de mesófilos em leite cru utilizado no fabrico de queijos DOP da Região Centro.

A média geométrica foi calculada para um período de dois meses, com, pelo menos, duas colheitas mensais (CE 2006).

Na Figura 6.2 pode observar-se o valor médio e desvio-padrão para as médias geométricas das contagens de mesófilos e para as contagens de mesófilos em leite cru, proveniente das três regiões em estudo. No que diz respeito à contagem de mesófilos, nas 406 amostras de leite cru analisadas, estes valores variaram entre 3,5 log UFC mL⁻¹ e 7,7 log UFC mL⁻¹, com um valor médio de 5,2 log UFC mL⁻¹; 77,1% das amostras apresentaram valor igual ou inferior a (5,7 log UFC mL⁻¹) (CE 2006).

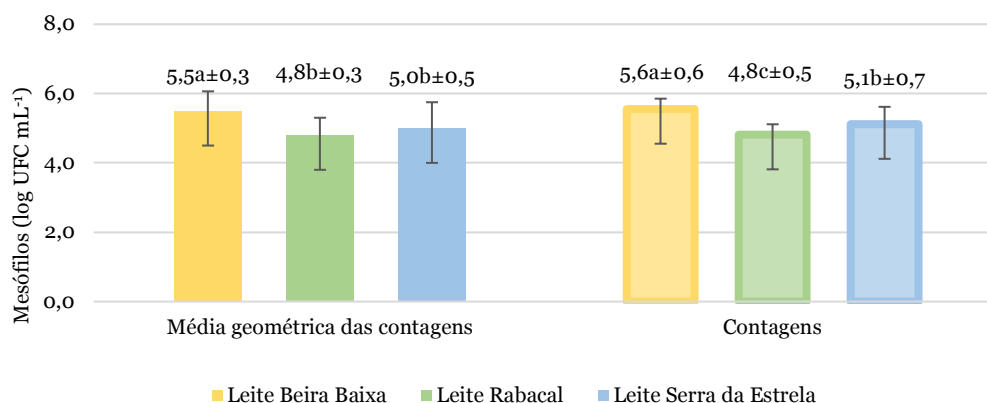


Figura 6.2 - Valores médios e desvios padrão da média geométrica das contagens de mesófilos e das contagens de mesófilos em leite cru, utilizado no fabrico de Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.

Para cada parâmetro (Média geométrica das contagens e Contagens), letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste Tukey.

O leite recolhido na região demarcada do Rabaçal foi o que apresentou menores contagens de mesófilos (4,8 log UFC mL⁻¹), seguindo-se o da Serra da Estrela (5,1 log UFC mL⁻¹) e o da Beira Baixa (5,6 log UFC mL⁻¹), com valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Foschino et al. (2002), ao determinar a qualidade microbiológica de leite cru de cabra destinado à produção de queijo em Bergamo (Itália), e Friker et al. (2019), em leite cru de ovelha e leite cru de cabra para consumo na Suíça, obtiveram contagens médias de mesófilos de 4,7 log UFC mL⁻¹ e 3,8 log UFC mL⁻¹, respetivamente. Os valores médios obtidos para o leite recolhido na região do Rabaçal encontram-se em linha com os valores observados por estes autores. Já D'Amico et al. (2008), ao analisar a qualidade geral de leite cru destinado à produção de queijos artesanais nos Estados Unidos, obteve contagens médias de 5,4 log UFC mL⁻¹ em leite cru de cabra, valores mais similares aos resultados obtidos na região de Serra da Estrela e Beira Baixa.

Sendo os microrganismos mesófilos indicadores de qualidade do leite, refletindo as condições de higiene a que este esteve sujeito (Perin et al. 2018; INSA 2019), é possível observar nas respostas obtidas nos questionários realizados algumas práticas que podem influenciar o aumento das suas contagens em algumas amostras de leite cru analisadas. A deteção de sete casos de mastites em LBB1 e 10 em LSE9, o uso de água não tratada pela exploração LSE9 e a ausência total da higienização dos úberes antes da ordenha pelos quatro produtores (LBB1, LSE1, LSE3 e LSE9) são alguns dos fatores que podem, de alguma forma, ter provocado contagens superiores ao limite exposto no Regulamento (CE) N.º 1662/2006 ($\leq 5,7$ log UFC mL⁻¹).

A Figura 6.3 exibe a percentagem de amostras de leite com valores iguais ou inferiores a $5,7 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ (CE 2006), considerando a média geométrica das contagens de mesófilos e a contagem de mesófilos. O cálculo da média geométrica da contagem de mesófilos para a avaliação da qualidade microbiológica de leite cru, considerando pelo menos duas amostras num período de dois meses, constitui um parâmetro robusto, evitando que valores esporádicos viessem a média (D'Amico e Donnelly 2010).

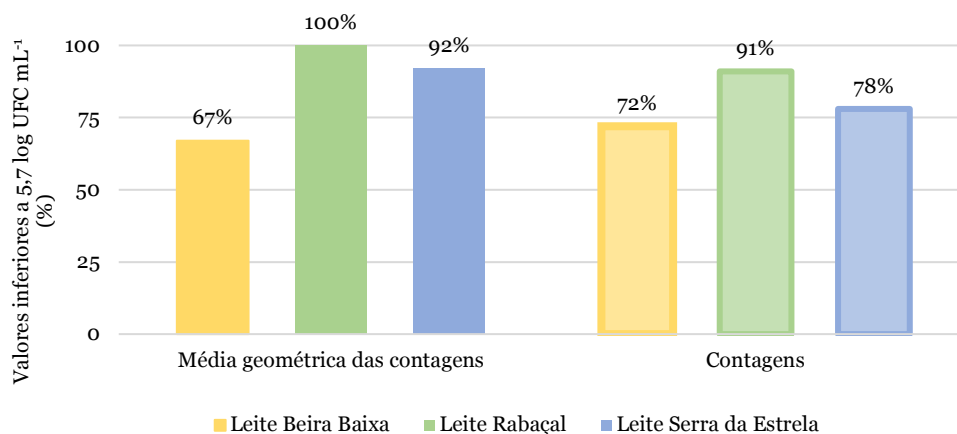


Figura 6.3 - Percentagem de amostras com contagem de mesófilos igual ou inferior a $5,7 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, considerando a média geométrica, de pelo menos duas contagens em dois meses, e as contagens.

O leite cru recolhido na região do Rabaçal apresenta resultados satisfatórios, com a totalidade das médias geométricas das contagens em conformidade com o limite legal em vigor, tal como 91% dos resultados obtidos nas contagens de mesófilos. Para os leites da Serra da Serra da Estrela e da Beira Baixa, 92% e 67% das médias geométricas calculadas tinham valores iguais ou inferiores ao limite legislado, e 78% e 72% das amostras também cumpriram esta premissa de qualidade, respetivamente.

A maior conformidade com o limite regulamentado das amostras de leite cru recolhido na região do Rabaçal em comparação com as amostras de leites da Serra da Serra da Estrela e da Beira Baixa pode estar relacionada com o facto de estarem integrados no Projeto apenas 2 produtores de leite da região do Rabaçal, contrastando com os 9 produtores da região da Serra da Estrela e 5 da região da Beira Baixa.

6.2.2 Outros indicadores microbiológicos de qualidade em leite cru

Em leite para fabrico de queijo a contaminação do leite cru pode ocorrer em diferentes etapas, através do contato com o animal e com o equipamento, se as condições de higiene forem deficientes (Martins 2001; Quigley et al. 2013). Neste trabalho, para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru foram realizadas contagens de psicrotóxicos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores, à semelhança de trabalhos realizados por outros autores (Foschino et al. 2002; Pisano et al. 2006; D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010; Yamazi et al. 2013; Friker et al. 2019), para além da contagem de microrganismos mesófilos presentes no Regulamento (CE) N.º 1662/2006. A Figura 6.4 reúne os valores médios e desvios-padrão destes parâmetros microbiológicos, analisados em leite cru recolhido nas três regiões em estudo.

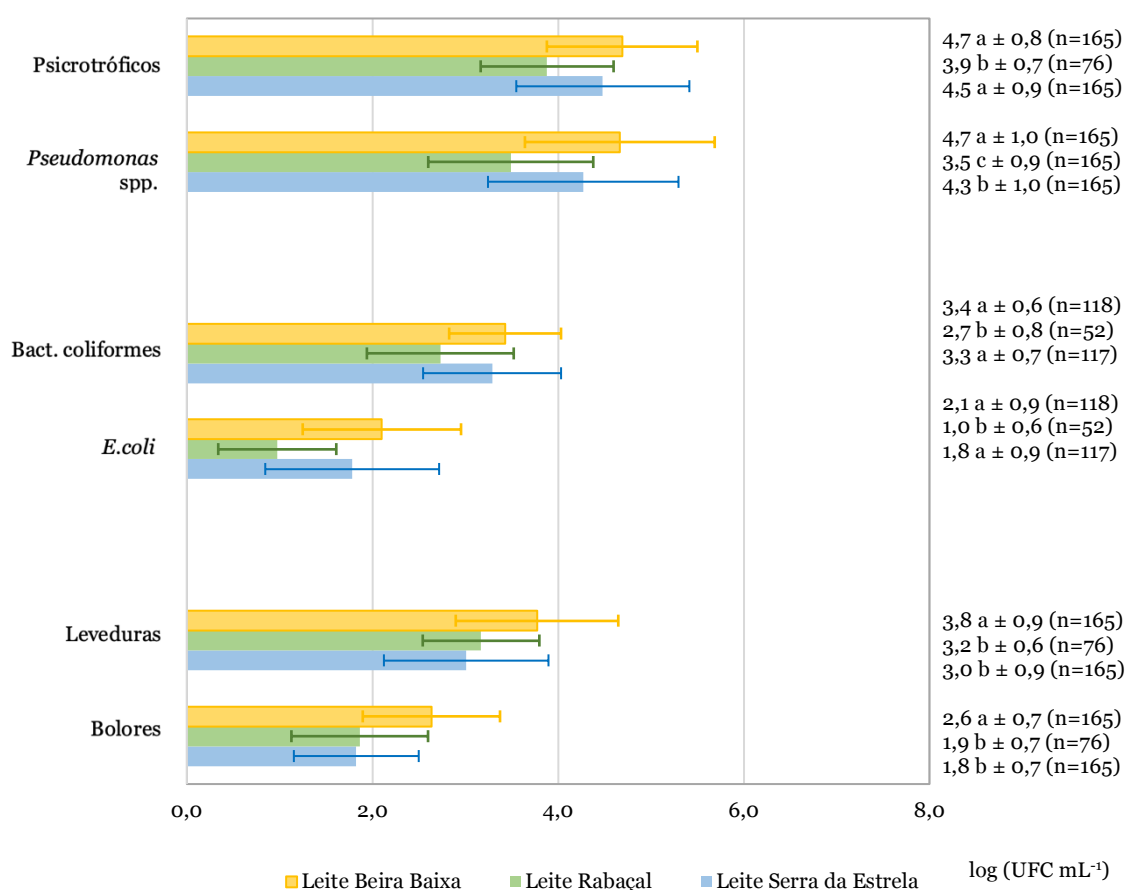


Figura 6.4 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de psicrotóxicos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores em leite cru, utilizado no fabrico de Queijo da Beira Baixa DOP, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP.

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste Tukey.

No que concerne a **psicrotróficos**, um dos principais grupos de microrganismos que alteram a qualidade do leite (Chambers 2002; Perin et al. 2018), o leite cru com origem na região da Beira Baixa (4,7 log UFC mL⁻¹) e na região da Serra da Estrela (4,5 log UFC mL⁻¹), apresentaram valores médios similares ($p \geq 0,05$), significativamente superiores ($p < 0,05$) aos do leite do Rabaçal (3,9 log UFC mL⁻¹). Como mostra a Figura 6.5, as amostras apresentaram, na sua maioria, contagens de psicrotróficos inferiores a 6 log UFC mL⁻¹, sendo mencionado por McSweeney (2007) que a utilização de leite com contagem de psicrotróficos iguais ou superiores a este valor não é recomendada para o fabrico de queijo, devido à produção de enzimas extracelulares que podem provocar alterações sensoriais.

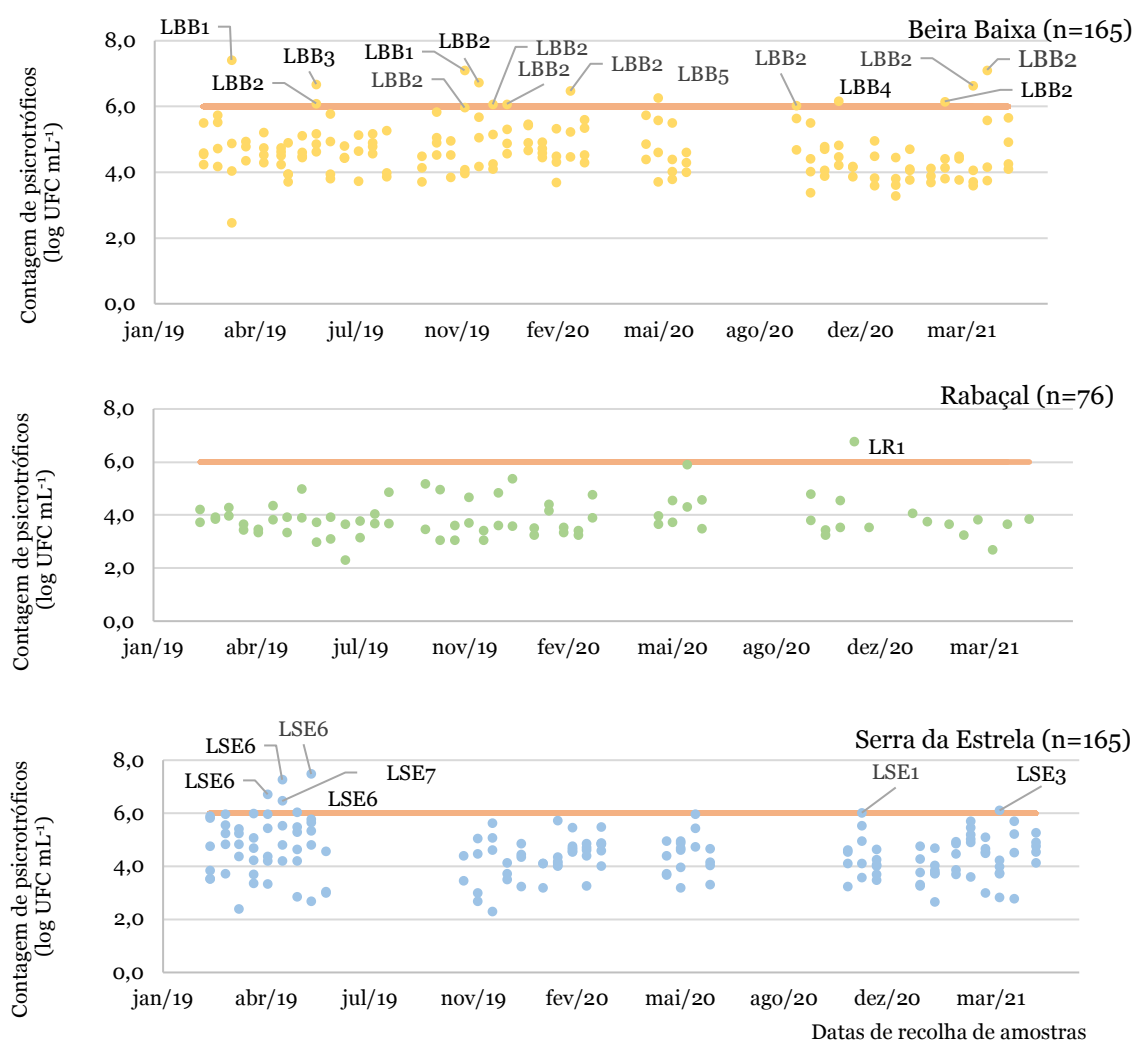


Figura 6.5 - Contagens de microrganismos psicrotróficos em leite cru, recolhido nas regiões da Beira Baixa, Rabaçal e Serra da Estrela.

De entre as amostras analisadas neste trabalho, as de leite cru recolhido na região do Rabaçal e Serra da Estrela apresentaram 99% e 96% das contagens de psicotróficos abaixo do limite proposto por McSweeney (2007), respetivamente, enquanto para a região da Beira Baixa a percentagem das amostras abaixo desse valor guia foi de 91%. Yamazi et al. (2013), ao caracterizar 61 amostras de leite cru de cabra produzido no Brasil, obteve valor médio de psicotróficos de 4,1 log UFC mL⁻¹, e embora este estudo não especifique o destino do leite analisado, o valor médio é similar aos resultados obtidos neste trabalho (3,9-4,7 log UFC mL⁻¹), e em conformidade com o valor guia de 6 log UFC mL⁻¹.

Para a quantificação de *Pseudomonas spp.*, um dos principais agentes deteriorantes do leite (Montel et al. 2014), o leite da região do Rabaçal (3,5 log UFC mL⁻¹) exibiu um valor médio inferior ao da Serra da Estrela (4,3 log UFC mL⁻¹) e ao da Beira Baixa (4,7 log UFC mL⁻¹), existindo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os leites provenientes das três regiões.

O leite recolhido na região do Rabaçal (2,7 log UFC mL⁻¹) mostrou contagens médias de **bactérias coliformes** estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) às da região da Serra da Estrela (3,3 log UFC mL⁻¹) e da região da Beira Baixa (3,5 log UFC mL⁻¹). Segundo a literatura (McSweeney et al. 2017; Gwandu et al. 2018), e tal como observado nos questionários realizados nas explorações leiteiras, a utilização de água não tratada (de furos ou poços), ocorrência de mastites e a ausência de higienização dos úberes antes de iniciar a ordenha são fatores potencialmente associáveis a contagens de coliformes elevadas. Estudos realizados em leite cru de ovelha, cabra e vaca com a finalidade de produzir queijos artesanais nos Estados Unidos apresentaram valores médios de contagens de bactérias coliformes entre 1,4-2,5 log UFC mL⁻¹ (D'Amico et al. 2008) e entre 1,3-3,9 log UFC mL⁻¹ (D'Amico e Donnelly 2010). À sua semelhança, as contagens médias de bactérias coliformes em leite cru de ovelha e cabra obtidas neste trabalho distanciaram-se do valor mencionado para limite higiénico de 2,0 log UFC mL⁻¹ (McSweeney 2007; D'Amico et al. 2008; D'Amico e Donnelly 2010).

O valor médio das contagens de *E.coli* no leite do Rabaçal (1,0 log UFC mL⁻¹) foi inferior ($p < 0,05$) ao do leite da Serra da Estrela e da Beira Baixa (1,8 e 2,1 log UFC mL⁻¹, $p \geq 0,05$). Para este indicador microbiológico de higiene, em leite de cabra oriundo do Brasil, Yamazi et al. (2013) registou um valor médio de 1,7 log UFC mL⁻¹ e Friker et al. (2019) 1,5 log UFC mL⁻¹, este último em leite cru de cabra e de ovelha para consumo *in natura* na Suíça. A presença de bactérias coliformes e *E.coli* em leite cru pode ser uma consequência de práticas de higiene inadequadas, contaminações ambientais e fecais

(Perin et al. 2018; Bohnlein et al. 2021), podendo ser observado no questionário realizado às explorações leiteiras que é necessário tomar medidas preventivas para melhorar este parâmetro, como implementar limpezas frequentes da sala de ordenha e de armazenamento do leite e higienizações dos úberes antes da ordenha.

Relativamente às contagens de **leveduras e bolores**, o leite do Rabaçal (3,2 e 1,9 log UFC mL⁻¹, respetivamente) e da Serra da Estrela (3,0 e 1,0 log UFC mL⁻¹) apresentaram valores médios inferiores ($p < 0,05$) aos do leite da Beira Baixa (3,8 e 2,6 log UFC mL⁻¹). Estes valores de leveduras aproximam-se dos resultados obtidos por outros autores (Foschino et al. 2002; Pisano et al. 2006), que variaram entre 2,4 e 2,5 log UFC mL⁻¹. Neste trabalho, as contagens de leveduras foram superiores às dos bolores, corroborando os resultados apresentados por Foschino et al. (2002) nesta matriz.

Foram ainda analisadas as correlações entre os parâmetros microbiológicos, havendo uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com valores de r (coeficiente de *Pearson*) compreendidos entre 0,120 e 0,838. Destacam-se com um $r \geq 0,7$, as correlações entre mesófilos e psicrotróficos ($r = 0,838$), psicrotróficos e *Pseudomonas* spp. ($r = 0,734$), mesófilos e *Pseudomonas* spp. ($r = 0,708$) e entre psicrotróficos e bactérias coliformes ($r = 0,703$) (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Coeficientes de *Pearson* para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados em leite cru: mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores.

	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bact. coliformes	<i>E.coli</i>	Leveduras	Bolores
Mesófilos	0,838**	0,708**	0,638**	0,264**	0,525**	0,437**
Psicrotróficos		0,734**	0,703**	0,317**	0,416**	0,343**
<i>Pseudomonas</i> spp.			0,599**	0,228**	0,471**	0,361**
Bact. coliformes				0,392**	0,300**	0,274**
<i>E.coli</i>					0,120*	0,075
Leveduras						0,488**

* Correlação significativa ($p < 0,05$); ** Correlação muito significativa ($p < 0,01$).

Considerando os indicadores microbiológicos utilizados para avaliar a qualidade do leite cru da Região Centro neste trabalho e os valores guia presentes na literatura, os resultados obtidos demonstraram uma qualidade microbiológica satisfatória no que diz

respeito aos microrganismos psicrotróficos, com 95% das amostras com valores inferiores ao valor guia aconselhado por McSweeney (2007), de 6 log UFC mL⁻¹. Os valores encontrados para as contagens de bactérias coliformes e de *E.coli* revelaram que em alguns casos se justifica a implementação de boas práticas para a melhoria da qualidade.

6.2.3 Qualidade microbiológica do leite cru de ovelha

Do total das amostras de leite analisadas neste estudo, 89,4% (363) correspondem a leite cru de ovelha. A Figura 6.6 mostra os valores médios de mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores das amostras de leite cru de ovelha, recolhidas nas regiões da Beira Baixa, Rabaçal e Serra da Estrela. O leite do Rabaçal apresentou valores médios para as contagens dos referidos microrganismos significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos das outras duas regiões, exceto para leveduras.

No que concerne **mesófilos**, o leite de ovelha do Rabaçal (4,7 log UFC mL⁻¹) foi aquele que apresentou menor valor médio e o leite de ovelha da Beira Baixa (5,5 log UFC mL⁻¹) o que deteve maior valor médio, sendo que as três regiões evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os valores médios de mesófilos obtidos no presente trabalho (4,7-5,5 log UFC mL⁻¹) estão dentro do intervalo definido pelos trabalhos de outros autores (3,6-5,7 log UFC mL⁻¹) (Sanjuan et al. 2003; Pisano et al. 2006; D'Amico e Donnelly 2010).

O leite de ovelha proveniente do Rabaçal apresentou valores médios das contagens de **psicrotróficos** (3,7 log UFC mL⁻¹) e de ***Pseudomonas* spp.** (3,3 log UFC mL⁻¹) estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) aos do leite de ovelha da Serra da Estrela (4,5 e 4,3 log UFC mL⁻¹, respetivamente) e da Beira Baixa (4,7 log UFC mL⁻¹), sendo estes um dos principais indicadores de deterioração do leite (Chambers 2002; Perin et al. 2018; Bohnlein et al. 2021). Das 363 amostras de leite de ovelha analisadas, 94% apresentaram contagens de psicrotróficos inferiores ao valor recomendado por McSweeney (2007) (6 log UFC mL⁻¹). Fotou et al. (2011) observou, em 240 amostras de leite cru de ovelha, valores de psicrotróficos que variaram entre 2,7 e 4,7 log UFC mL⁻¹, sendo que os valores obtidos nas amostras deste trabalho são similares aos observados por este autor. No que concerne a *Pseudomonas* spp., o estudo realizado por Fotou et al. (2011) em leite cru de ovelha relatou que todas as 240 amostras analisados no seu trabalho apresentaram contagens inferiores ao limite de quantificação, mas Sanjuan et al. (2003), em 16 amostras de leite cru ovino refrigerado a 6°C para consumo, reportou um valor médio de

4,1 log UFC mL⁻¹. Comparando com os resultados observados por estes autores, as médias das contagens de *Pseudomonas* spp. da região da Beira Baixa (4,7 log UFC mL⁻¹) e da Serra da Estrela (4,3 log UFC mL⁻¹) estão acima desses valores.

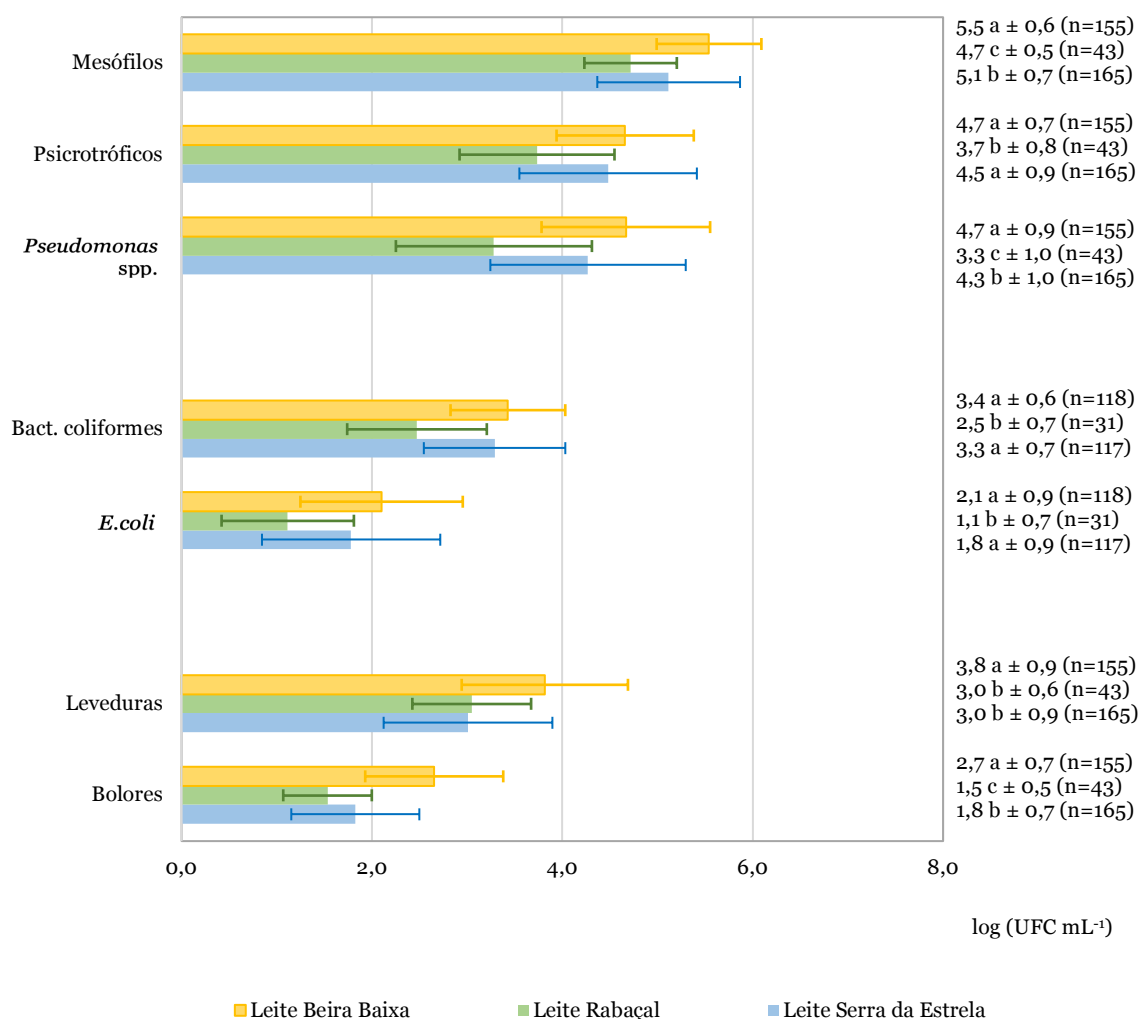


Figura 6.6 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores em leite cru de ovelha utilizado no fabrico nos Queijos DOP da Região Centro.

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste Tukey.

A refrigeração adequada do leite, principalmente no caso das explorações cuja frequência de recolha é menor, é fundamental para controlar o desenvolvimento de psicrotróficos e *Pseudomonas* spp. (D'Amico et al. 2008). Através do questionário realizado às explorações leiteiras é possível observar que a refrigeração do leite é realizada a 4°C e está em conformidade com o previsto no Regulamento (CE) N.º 1662/2006, que dita que o leite deve ser arrefecido a uma temperatura igual ou inferior a 8°C no caso de recolha diária, ou a 6°C, se a recolha não for diária. Este fator pode ser um forte contribuidor

para que uma elevada percentagem das amostras de leite de ovelha analisadas apresentem contagens de psicotróficos inferiores ao valor recomendado por McSweeney (2007) ($6 \log \text{UFC mL}^{-1}$). A frequência de recolha de leites mais alargada nas explorações que responderam ao questionário é de dois dias que, combinado com as temperaturas de refrigeração baixas, reforça o pressuposto de que um curto intervalo de tempo entre a ordenha e a utilização do leite diminui a possibilidade de contaminação do mesmo, permitindo controlar o desenvolvimento de **psicotróficos** e de ***Pseudomonas spp.*** em leite cru (D'Amico et al. 2008).

Relativamente à quantificação de **bactérias coliformes**, o leite cru de ovelha do Rabaçal ($2,5 \log \text{UFC mL}^{-1}$) apresentou valor médio significativamente inferior ($p < 0,05$) ao dos leites de ovelha com origem na Serra da Estrela ($3,3 \log \text{UFC mL}^{-1}$) e na Beira Baixa ($3,4 \log \text{UFC mL}^{-1}$). Os valores médios das contagens de coliformes no leite cru de ovelha da Região Centro são superiores à média obtida por Sanjuan et al. (2003) ($2,3 \log \text{UFC mL}^{-1}$) em leite cru ovino para consumo em Espanha, mas similares aos resultados obtidos por Pisano et al. (2006) ($3,5 \log \text{UFC mL}^{-1}$) quando analisou o leite cru de ovelha utilizado no fabrico de Queijo Fiore Sardo DOP. Diversos autores referem como limite higiénico $2 \log \text{UFC mL}^{-1}$ para coliformes em leite cru (McSweeney 2007; D'Amico e Donnelly 2010), indicando ainda contagens superiores a esse limite higiénico são indicadoras de práticas de higiene inadequadas, contaminação da água utilizada ou presença de mastites no rebanho. Tal como exposto noutros estudos (Sanjuan et al. 2003; Pisano et al. 2006), as médias da região da Beira Baixa, Serra da Estrela e Rabaçal encontram-se acima desse valor.

A água utilizada no abeberamento e limpeza das instalações pode ser uma fonte de contaminação por microrganismos psicotróficos e bactérias coliformes, especialmente se esta não for tratada (furos e poços) (Chambers 2002; Gwandu et al. 2018; Perin et al. 2018). Os questionários revelaram que a exploração LBB1, com uma contagem média de coliformes de $3,5 \log \text{UFC mL}^{-1}$, utiliza água de charcas ou barragens para o abeberamento do rebanho e que a exploração LSE9, com uma contagem média de coliformes de $3,0 \log \text{UFC mL}^{-1}$, faz a limpeza das instalações com água não tratada, podendo este ser um dos fatores diretamente associados aos valores médios elevados de coliformes observados neste trabalho.

A quantificação de ***E. coli*** nas amostras de leite cru de ovelha com origem da região do Rabaçal ($1,1 \log \text{UFC mL}^{-1}$) apresentou valor médio estatisticamente inferior ($p < 0,05$) ao do leite cru de ovelha oriundo da Serra da Estrela ($1,8 \log \text{UFC mL}^{-1}$) e da Beira Baixa ($2,1 \log \text{UFC mL}^{-1}$). Neste parâmetro, oito das 266 amostras apresentaram contagens

inferiores ao limite de quantificação (<1 UFC mL⁻¹). Os valores médios observados em leite cru de ovelha neste trabalho (1,1-2,1 log UFC mL⁻¹) são superiores aos mencionados por Sanjuan et al. (2003) (0,45 log UFC mL⁻¹) quando este estudou a incidência e evolução de *E.coli* em 16 amostras de leite cru de ovelha para consumo em Espanha, tendo ainda este autor detetado uma diminuição das contagens ao longo do período de refrigeração.

Animais saudáveis são o ponto de partida para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade, sendo a presença de mastites no efetivo leiteiro uma possível fonte de contaminação do leite por *E.coli*. Embora todos os produtores que responderam ao questionário tenham afirmado controlar a presença de mastites através do Teste Californiano de Mastites, duas explorações detetaram esta infeção no seu rebanho (LBB1 e LSE9). Outra possível fonte de contaminação (e uma prática transversal aos produtores que responderam ao questionário) é a ausência de limpeza dos úberes antes de iniciar a ordenha, podendo ser a origem da contaminação do leite com bactérias coliformes e *E.coli* (Chambers 2002; McSweeney 2007; Bianchini et al. 2014; McSweeney et al. 2017; Perin et al. 2018; Food Safety Authority of Ireland 2020).

Para **leveduras e bolores**, os valores os médios variaram entre 3,0 e 3,8 log UFC mL⁻¹ e 1,5 e 2,7 log UFC mL⁻¹, respetivamente, tendo os leites de ovelha recolhidos no Rabaçal (3,0 e 1,5 log UFC mL⁻¹) e na Serra da Estrela (3,0 e 1,8 log UFC mL⁻¹) apresentado valores inferiores ($p<0,05$) aos da Beira Baixa (3,8 e 2,7 log UFC mL⁻¹). Pisano et al. (2006) registou contagens médias de leveduras inferiores às obtidas neste trabalho (2,53 log UFC mL⁻¹). Quigley et al. (2013) refere que as contagens podem apresentar valores compreendidos entre 2 e 4 log UFC mL⁻¹ e os bolores tendem a estar presentes em contagens inferiores às das leveduras, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo.

À semelhança do descrito anteriormente para as correlações de *Pearson* envolvendo todas as amostras (leite de ovelha e leite de cabra), quando consideramos as amostras de leite de ovelha isoladamente, observaram-se correlações significativas positivas ($p<0,05$) com valores de r (coeficiente de *Pearson*) compreendidos entre 0,137 e 0,847. Mais uma vez, destacam-se as correlações entre microrganismos mesófilos e psicrotróficos ($r=0,847$), psicrotróficos e *Pseudomonas spp.* ($r=0,737$), bactérias coliformes e psicrotróficos ($r=0,708$) e entre microrganismos mesófilos e *Pseudomonas spp.* ($r=0,706$) (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Coeficientes de *Pearson* para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados em leite cru de ovelha: mesófilos, psicotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *E.coli*, leveduras e bolores.

	Psicotróficos	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bact. coliformes	<i>E.coli</i>	Leveduras	Bolores
Mesófilos	0,847**	0,706**	0,639**	0,247**	0,559**	0,446**
Psicotróficos		0,737**	0,708**	0,309**	0,439**	0,336**
<i>Pseudomonas</i> spp.			0,590**	0,202**	0,492**	0,372**
Bact. coliformes				0,402**	0,309**	0,266**
<i>E.coli</i>					0,137*	0,118
Leveduras						0,510**

* Correlação significativa ($p < 0,05$); ** Correlação muito significativa ($p < 0,01$).

Tal como anteriormente observado na totalidade das amostras de leite cru da Região Centro (leite de ovelha e leite de cabra), os resultados apontam para uma qualidade microbiológica satisfatória no que diz respeito aos microrganismos psicotróficos, com 94% das amostras em conformidade com o limite higiénico de 6 log UFC mL⁻¹. Mantém-se também a necessidade de melhorar a qualidade microbiológica do leite cru de ovelha da Região Centro no parâmetro das bactérias coliformes.

6.2.4 Boas práticas para melhorar a qualidade microbiológica do leite

Após analisar as respostas dos produtores aos questionários (Anexo III) e os resultados obtidos para avaliação da qualidade microbiológica do leite cru utilizado na produção de Queijos DOP da Região Centro, identificámos algumas oportunidades de melhoria da qualidade microbiológica do leite recorrendo à implementação de boas práticas, como por exemplo:

- Os questionários às explorações revelaram que em 2020 LBB1 registou sete casos de mastites e LSE9 10, podendo estes casos estar associados a contagens elevadas de microrganismos mesófilos, bactérias coliformes e *E.coli*. A prevenção e controlo dos casos de mastite favorece, não só o bem-estar do animal, como é um passo em direção à segurança da matéria-prima. Assim, deve-se garantir o rastreio de mastites e, em alguns casos, aumentar a sua

frequência, para assegurar que não existem animais assintomáticos que possam contaminar o leite.

- O uso de água não tratada, como realizado pela exploração LSE9, pode ser uma fonte de contaminação do leite cru com microrganismos psicrotróficos, bactérias coliformes e *E.coli*. Deve-se optar pela utilização de água proveniente da rede pública para o abeberamento e limpeza dos equipamentos, e, caso não seja possível, realizar controlos microbiológicos frequentes para assegurar a sua qualidade.
- A total ausência de higienização dos úberes antes da ordenha pelos quatro produtores (LBB1, LSE1, LSE3 e LSE9) é uma prática que pode estar diretamente relacionada com as contagens elevadas de coliformes e *E.coli*, sendo aconselhada a implementação de hábitos de higienização do úbere antes da ordenha, de forma de controlar contaminações que possam provocar defeitos no leite e conseqüentemente no queijo.

Estas são algumas sugestões que podem permitir uma melhoria da qualidade no leite produzido na Região Centro, de forma a garantir a segurança dos queijos DOP com ele produzidos.

6.3. Qualidade microbiológica dos Queijos DOP da Região Centro

A caracterização microbiológica dos Queijos DOP da Região Centro envolveu a análise da crosta e da massa de 56 queijos: 17 Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, 11 Queijos Rabaçal DOP e 28 Queijos Serra da Estrela DOP. No que concerne os indicadores de higiene dos processos e segurança alimentar, no Regulamento (CE) N.º 1441/2007, está prevista a quantificação de estafilococos coagulase positiva e as pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Tabela 6.3).

Neste trabalho, para estudar a microbiota dos Queijos DOP da Região Centro, foram também incluídas contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β -glucuronidase positiva, leveduras, bolores e *Clostridium perfringens*, à semelhança da metodologia utilizada por outros autores (Martins 2994; Freitas et al. 1996; Tavaría e Malcata 1998; Tavaría e Malcata 2000; Picon et al. 2006; Pisano et al. 2006; Tavaría et al. 2006; Pintado et al. 2008; Brooks et al. 2012).

Relativamente aos parâmetros legislados, a Tabela 6.3 reúne os valores médios e desvios-padrão da contagem de **estafilococos coagulase positiva** em queijo, que constitui um critério de higiene dos processos. Neste parâmetro, em crosta e massa, os Queijos Rabaçal DOP (1,1 e 1,2 log UFC g⁻¹, respetivamente) e Queijos Serra da Estrela DOP (1,3 e 1,2 log UFC g⁻¹) apresentaram valores médios significativamente inferiores ($p < 0,05$) ao Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo (3,6 e 2,4 log UFC g⁻¹). No Regulamento (CE) N.º 1441/2007 está prevista a contagem de estafilococos coagulase positiva em queijo fabricado com leite cru, “durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”. Está regulamentado que caso sejam observados valores superiores a 5 log UFC g⁻¹, o lote de queijo deve ser testado para enterotoxinas estafilocócicas. O Regulamento refere a recolha de cinco amostras de queijo dentro do mesmo lote. Como não foi possível cumprir este pressuposto, é importante estar atento a este parâmetro, pois foram observadas seis amostras de crosta com contagens acima de 5 log UFC g⁻¹: cinco em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo (QBB1) e uma em Queijo Serra da Estrela DOP (QSE1). Em contrapartida, em 71% amostras de crosta e em 73% amostras de massa não foi possível quantificar estafilococos coagulase positivas, estando estas amostras distribuídas por todos os queijos analisados. Tavarina e Malcata (1998) observaram, em Queijo Serra da Estrela DOP, valores entre 5,5 e 8,4 log UFC g⁻¹, superiores aos observados neste estudo.

Tabela 6.3 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de estafilococos coagulase positiva, em crosta e massa, e resultados das pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* nos Queijos DOP da Região Centro.

	Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo	Queijo Rabaçal DOP	Queijo Serra da Estrela DOP
Estafilococos (crosta) (log UFC g ⁻¹)	3,6 a ± 2,0 (n=15)	1,1 b ± 0,4 (n=12)	1,3 b ± 1,1 (n=17)
Estafilococos (massa) (log UFC g ⁻¹)	2,4 a ± 1,4 (n=17)	1,2 b ± 0,5 (n=16)	1,2 b ± 0,7 (n=23)
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25 g (n=56)		
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25 g (n=56)		

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste Tukey.

As pesquisas de *Salmonella spp.* e de *Listeria monocytogenes* são critérios de segurança dos gêneros alimentícios. Em todas as amostras de queijo analisadas observou-se *Ausência em 25 g*, estando estes resultados alinhados com os reportados em estudos prévios (Pisano et al. 2006; Brooks et al. 2012).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6.3, salvo as seis amostras de crosta de queijo que excedem o limite imposto para estafilococos coagulase positiva, estão em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1441/2007, garantindo a segurança dos Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijos Rabaçal DOP e Queijos Serra da Estrela DOP. O cumprimento dos critérios regulamentados assevera que a maior parte dos Queijos DOP da Região Centro analisados neste trabalho não contém microrganismos, nem as suas toxinas, em quantidades que ofereçam risco à saúde humana, assegurando desta forma a proteção do consumidor.

A Figura 6.7 reúne os valores médios e desvios-padrão das contagens efetuadas na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro em estudo. Neste trabalho, analisou-se separadamente a crosta e a massa de queijo, pois a diferente disponibilidade de oxigénio e humidade, as interações entre a superfície do queijo e o ambiente envolvente (durante a cura) e o processo de salga, proporcionam o desenvolvimento de microrganismos na sua superfície, tornando a microbiota da crosta distinta da massa. A crosta desempenha também um papel de barreira, protegendo a massa de microrganismos patogénicos e deteriorantes (Irlinger et al. 2014; Choi et al. 2020). Esta diferença é particularmente evidente nos valores médios observados nas quantificações de leveduras e bolores, expostos na Figura 6.7.

No cômputo global, considerando os parâmetros analisados neste trabalho, os microrganismos predominantes na crosta e na massa dos queijos foram as bactérias lácticas (8,4 log UFC g⁻¹), seguidas de psicrotróficos (8,0 e 7,6 log UFC g⁻¹, respetivamente), enterobactérias (5,0 e 4,7 log UFC g⁻¹), bactérias coliformes (5,1 e 4,4 log UFC g⁻¹) e leveduras (5,7 e 4,1 log UFC g⁻¹). Os valores médios encontrados para a crosta e para a massa foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$), excetuando as contagens de leveduras (5,7 e 4,1 log UFC g⁻¹) e bolores (2,8 e 1,6 log UFC g⁻¹), sendo que para estes últimos os valores são superiores ($p < 0,05$) na crosta (5,7 e 2,8 log UFC g⁻¹, respetivamente). Durante os primeiros dias de cura as leveduras e bolores colonizam a crosta do queijo, promovendo a sua desacidificação progressiva. Vários autores afirmam que as leveduras predominam, contribuindo para o sabor/aroma e textura do queijo, através da proteólise e lipólise (Kongo and Malcata 2016; McSweeney et al. 2017). Segundo McSweeney et al. (2017) e que as contagens de leveduras na massa do queijo

são 2 a 4 log UFC g⁻¹ inferiores às da crosta do queijo. Como os bolores são particularmente influenciados pela atividade da água (a_w) e humidade da massa do queijo, que diminuem ao longo da cura, as suas contagens vão ser naturalmente mais elevadas na crosta.

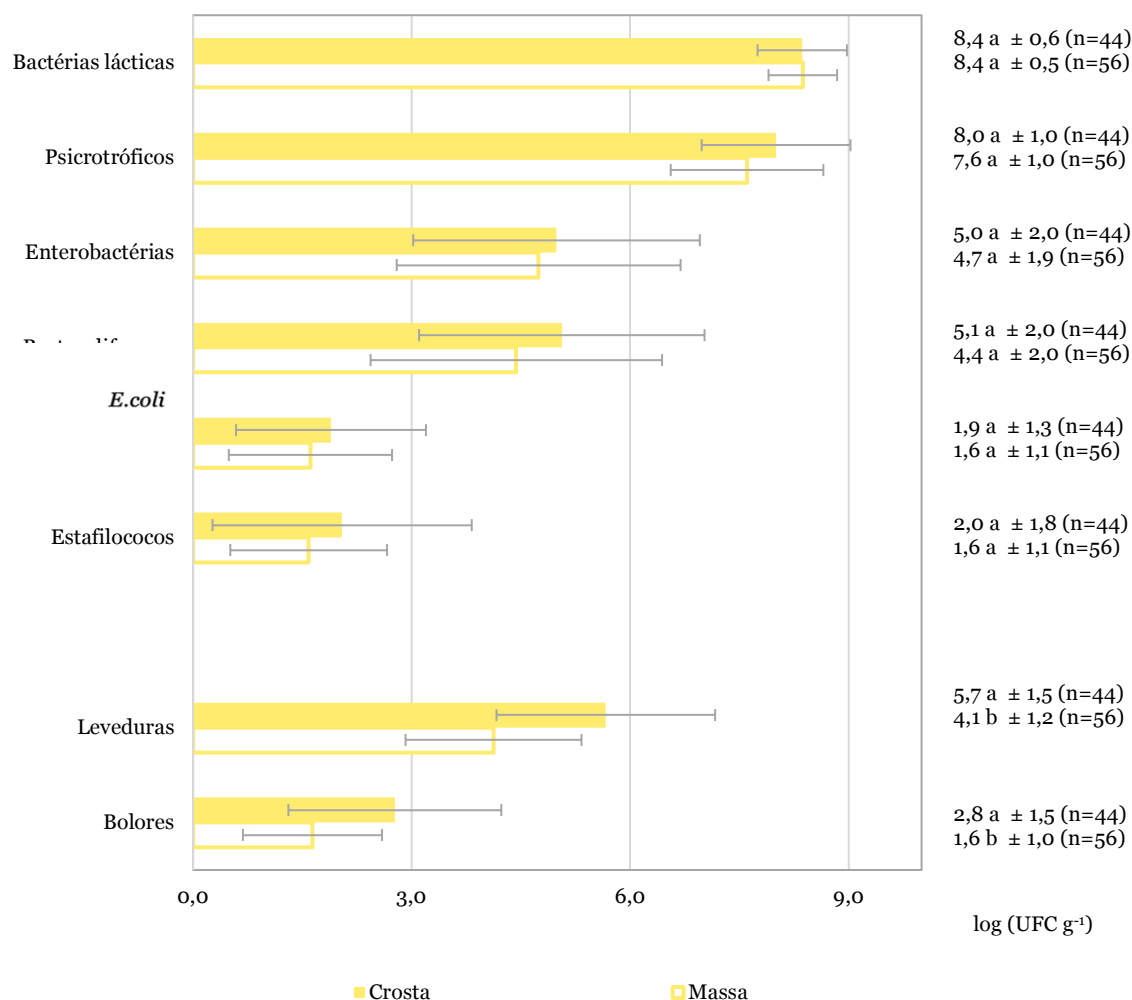


Figura 6.7 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicrotrofos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro.

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste *t-Student*.

Nas Figura 6.8 e 6.9 podem ser observados os valores médios e desvios-padrão para os parâmetros microbiológicos analisados na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro (separadamente). As contagens de **bactérias lácticas** apresentaram valores médios compreendidos entre 8,0 e 8,6 log UFC g⁻¹, em conformidade com estudos anteriores (6 a 9 log UFC g⁻¹) (Freitas et al. 1996; Tavarria e Malcata 1998; Picon et al. 2006; Tavarria et al. 2006; Pintado et al. 2008). Na massa, estes queijos apresentaram

valores médios de bactérias lácticas estatisticamente similares ($p \geq 0,05$); o valor médio deste parâmetro em Queijo Serra da Estrela DOP ($8,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$) está alinhado com resultados de outros autores ($7-9 \log \text{ UFC g}^{-1}$) para esta tipologia de queijo (Tavaria e Malcata 1998; Tavaria et al. 2006).

Foram registados valores médios para microrganismos **psicrotróficos** entre $7,0$ e $8,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$; o Queijo Serra da Estrela DOP, com $8,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ na crosta e $8,2 \log \text{ UFC g}^{-1}$ na massa, apresentou valores significativamente superiores ($p < 0,05$) aos dos queijos das outras regiões ($7,0-7,9 \log \text{ UFC g}^{-1}$), quer na crosta quer na massa.

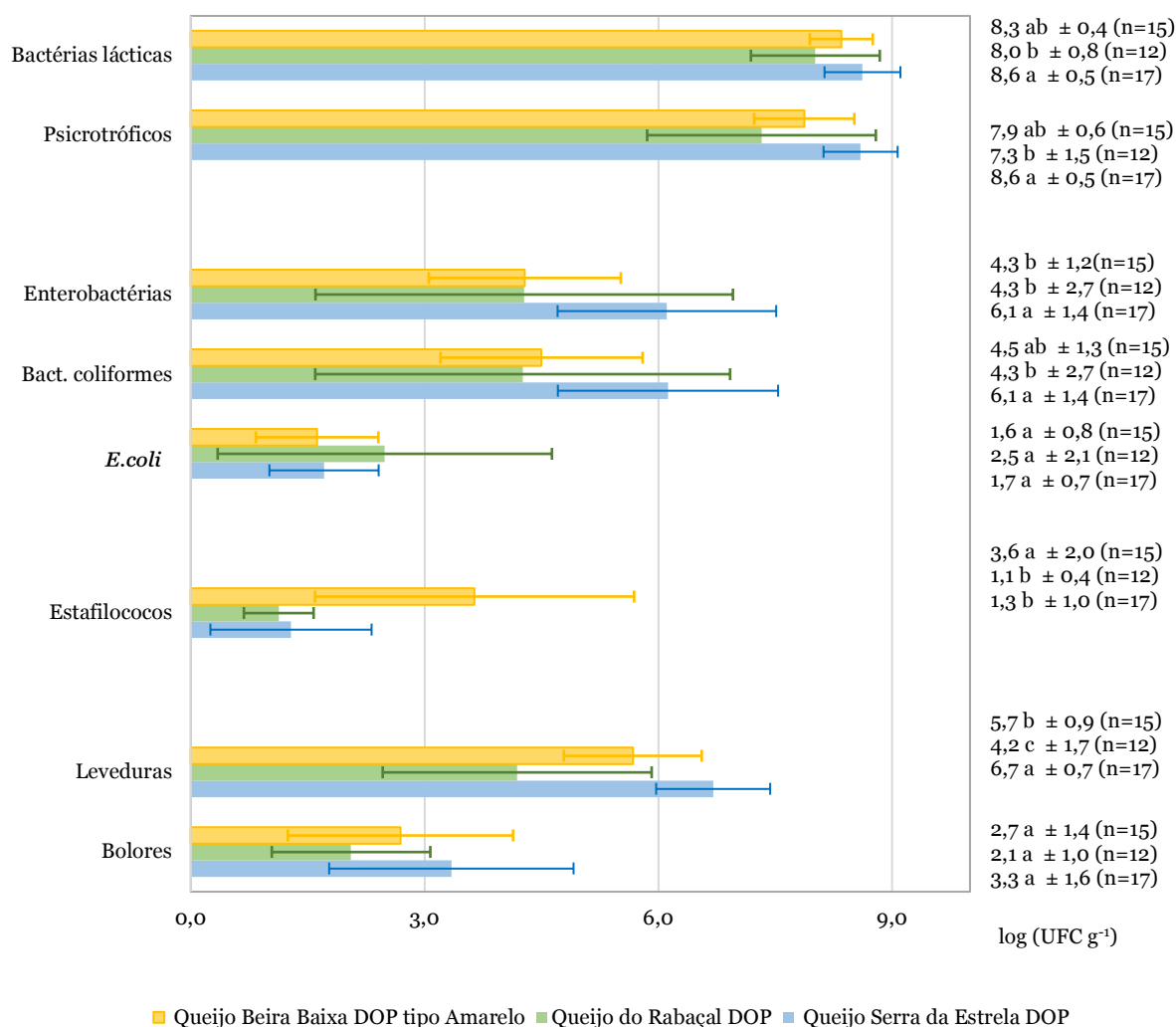


Figura 6.8 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na crosta de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, de Queijo do Rabaçal DOP e de Queijo Serra da Estrela DOP.

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de $0,05$, segundo o teste Tukey.

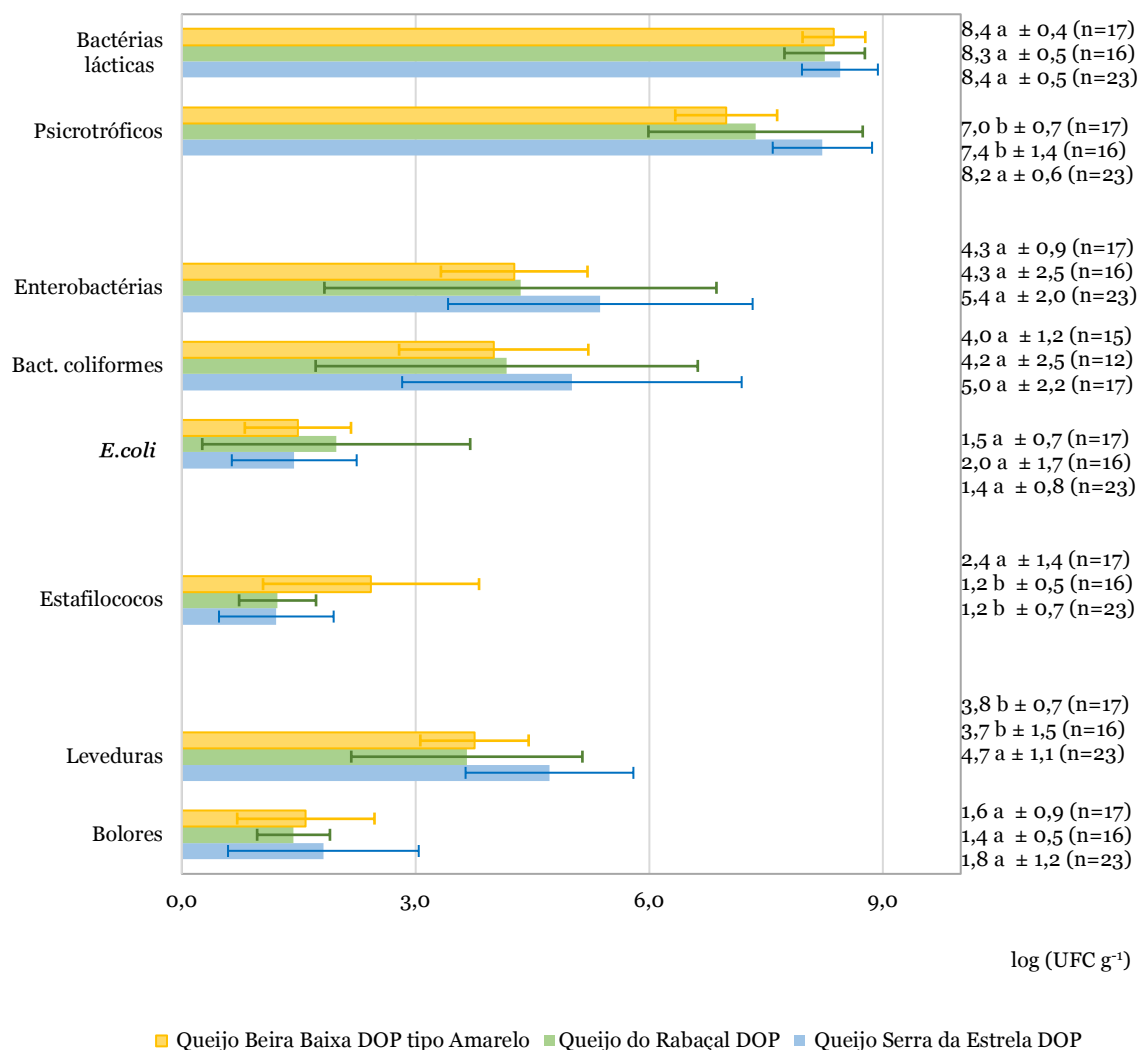


Figura 6.9 - Valores médios e desvios-padrão das contagens de bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos coagulase positiva, leveduras e bolores na massa de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, de Queijo do Rabaçal DOP e de Queijo Serra da Estrela DOP.

Para cada parâmetro microbiológico, letras diferentes indicam diferença estatística para um nível de significância de 0,05, segundo o teste Tukey.

Para **enterobactérias**, o valor médio das contagens na crosta do Queijo Serra da Estrela DOP (6,1 log UFC g⁻¹) foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao das outras duas tipologias de queijo em estudo (4,3 log UFC g⁻¹), apresentando os três queijos contagens similares ($p \geq 0,05$) na massa (4,3-5,4 log UFC g⁻¹). Quatro dos 11 Queijos Rabaçal DOP analisados apresentaram resultados inferiores ao limite de quantificação (<1 log UFC g⁻¹). Outros autores, que reportaram contagens médias compreendidas entre 3 e >8 log UFC g⁻¹, justificaram que esses valores são indicadores de más práticas de higiene

No parâmetro das bactérias coliformes, observaram-se 10 contagens inferiores ao limite de quantificação ($<1 \log \text{UFC g}^{-1}$), quatro em crosta do Queijo Rabaçal e seis em massa de queijos das três regiões. Já para *E.coli* não foi possível quantificar em 22 amostras de crosta (50%) e 36 amostras de massa (64%), distribuídas por todos os queijos analisados.

O Queijo Serra da Estrela DOP apresentou valores médios de **leveduras** (6,7 log UFC g^{-1} em crosta e 4,7 log UFC g^{-1} em massa) superiores ($p < 0,05$) aos outros dois queijos em estudo (3,7-5,7 log UFC g^{-1}). Resultados encontrados por outros autores em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Picante, Terrincho DOP e Fiore Sardo DOP variaram entre <1 e 7 log UFC g^{-1} (Freitas et al. 1996; Pisano et al. 2006; Pintado et al. 2008). Em Queijo Serra da Estrela DOP, outros autores encontraram contagens que variaram entre 0,7 e 7 log UFC g^{-1} (Tavaria e Malcata 1998) e 3 e 5 log UFC g^{-1} (Tavaria e Malcata 2000).

Relativamente aos **bolores**, não se observaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os três queijos, observando-se valores médios que variaram entre 1,3 e 3,3 log UFC g^{-1} ; sete amostras de crosta (16%) e 25 amostras de massa (47%) apresentaram contagens inferiores ao limite de quantificação ($<1 \log \text{UFC g}^{-1}$).

A quantificação de *Clostridium perfringens*, um indicador de contaminação fecal (Walstra et al. 2006), foi abaixo do limite de quantificação ($<1 \log \text{UFC g}^{-1}$) em todas as amostras de queijo analisadas. A presença deste microrganismo em leite cru ocorre através da sua contaminação com solo, poeiras ou fezes, e apresenta a capacidade de produzir vários tipos de toxinas, que podem causar doenças gastrointestinais graves (Walstra et al. 2006).

Foram analisadas as correlações entre os parâmetros microbiológicos da crosta (Tabela 6.4), da massa (Tabela 6.5) e da crosta *versus* massa dos queijos (Tabela 6.6). Na análise da crosta dos queijos, observaram-se correlações positivas estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com valores de r compreendidos entre 0,346 e 0,941 (Tabela 6.4), destacando-se as correlações entre: enterobactérias e bactérias coliformes ($r=0,941$); psicotróficos e bactérias coliformes ($r=0,777$); bactérias lácticas e bactérias coliformes ($r=0,760$); psicotróficos e enterobactérias ($r=0,717$); bactérias lácticas e enterobactérias ($r=0,706$) (Tabela 6.4). As enterobactérias são uma família de bactérias coliformes, algumas psicotróficas, que incluem espécies como *E.coli*. Assim, correlações positivas entre estes parâmetros (psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes e *E.coli*) são esperadas. É ainda observável a ausência de correlação entre as bactérias lácticas e estafilococos, principalmente devido ao papel inibitório natural que as bactérias lácticas apresentam relativamente a este género (Yoon et al. 2016).

Tabela 6.4 - Coeficientes de *Pearson* para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na crosta dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos, leveduras e bolores.

	Psicrotróficos	Enterobactérias	Bact. coliformes	<i>E.coli</i>	Estafilococos	Leveduras	Bolores
Bactérias lácticas	0,760**	0,706**	0,697**	0,420**	0,035	0,496**	0,264
Psicrotróficos		0,717**	0,777**	0,342*	-0,029	0,691**	0,346*
Enterobactérias			0,941**	0,557**	-0,043	0,558**	0,354*
Bact. coliformes				0,548**	0,016	0,622**	0,29
<i>E.coli</i>					0,051	0,069	0,03
Estafilococos						0,082	0,083
Leveduras							0,28

* Correlação significativa ($p < 0,05$); ** Correlação muito significativa ($p < 0,01$).

As correlações entre as massas dos Queijos DOP da Região Centro foram também estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com valores de r compreendidos entre 0,317 e 0,901 (Tabela 6.5), tendo ênfase a correlação entre enterobactérias e bactérias coliformes ($r=0,901$) (Tabela 6.5). Novamente são observadas correlações positivas entre psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes e *E.coli* e a ausência de correlação entre as bactérias lácticas e estafilococos.

Por fim, as correlações da crosta *versus* massa foram igualmente estatisticamente significativas ($p < 0,05$), com valores de r compreendidos entre 0,334 e 0,848 (Tabela 6.6), sobressaindo as correlações entre: enterobactérias e psicrotróficos ($r=0,848$); bactérias coliformes e psicrotróficos ($r=0,845$); psicrotróficos e leveduras ($r=0,830$); bactérias coliformes e enterobactérias ($r=0,807$); enterobactérias e leveduras ($r=0,786$); bactérias lácticas e leveduras ($r=0,753$); psicrotróficos e leveduras ($r=0,721$); bactérias coliformes e leveduras ($r=0,717$); bactérias coliformes e leveduras ($r=0,717$); estafilococos coagulase positivas ($r=0,712$) (Tabela 6.6). Parâmetros iguais, em crosta e em massa, apresentam sempre correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) e é novamente possível observar a ausência de correlação entre as bactérias lácticas e estafilococos e as correlações positivas entre psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes e *E.coli*.

Tabela 6.5 - Coeficientes de *Pearson* para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na massa dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos, leveduras e bolores.

	Psicrotróficos	Enterobactérias	Bact. coliformes	<i>E.coli</i>	Estafilococos	Leveduras	Bolores
Bactérias lácticas	0,484**	0,559**	0,626**	0,217	0,106	0,055	-0,188
Psicrotróficos		0,671**	0,677**	0,317*	-0,154	0,652**	0,076
Enterobactérias			0,901**	0,349**	0,075	0,420**	-0,16
Bact. Coliformes				0,457**	0,123	0,399**	-0,289
<i>E.coli</i>					0,084	0,144	-0,183
Estafilococos						-0,089	-0,108
Leveduras							0,146

* Correlação significativa ($p < 0,05$); ** Correlação muito significativa ($p < 0,01$).

Tabela 6.6 - Coeficientes de *Pearson* para as correlações entre os parâmetros microbiológicos analisados na crosta e na massa dos Queijos DOP da Região Centro: bactérias lácticas, psicrotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli*, estafilococos, leveduras e bolores.

Massa \ Crosta	Bactérias lácticas	Psicrotróficos	Enterobactérias	Bact. coliformes	<i>E.coli</i>	Estafilococos	Leveduras	Bolores
Bactérias lácticas	0,753**	0,625**	0,556**	0,579**	0,257	0,137	0,458**	0,013
Psicrotróficos	0,463**	0,830**	0,590**	0,623**	0,334*	0,072	0,721**	0,168
Enterobactérias	0,477**	0,848**	0,786**	0,694**	0,387**	0,052	0,692**	0,025
Bact. coliformes	0,467**	0,845**	0,807**	0,717**	0,387**	0,107	0,717**	0,004
<i>E.coli</i>	0,423**	0,450**	0,599**	0,488**	0,639**	0,146	0,268	0,003
Estafilococos	-0,028	-0,211	0,071	0,007	0,048	0,712**	-0,006	-0,167
Leveduras	0,124	0,541**	0,503**	0,485**	0,164	0,009	0,666**	-0,011
Bolores	-0,023	0,282	0,089	0,113	0,041	0,042	0,295	0,335*

* Correlação significativa ($p < 0,05$); ** Correlação muito significativa ($p < 0,01$).

Uma apreciação dos resultados observados no estudo dos Queijos DOP da Região Centro revela que, relativamente aos parâmetros legislados no Regulamento (CE) N.º 1441/2007, os queijos analisados se encontram em conformidade, no que diz respeito às pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Ausência em 25 g). Na quantificação de estafilococos coagulase positiva, seis amostras de crosta apresentaram contagens superiores a 5 log UFC g⁻¹ (cinco em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo (QBB1) e uma em Queijo Serra da Estrela DOP (QSE1), o que, segundo a legislação, obriga à quantificação da toxina estafilocócica.

As enterotoxinas estafilocócicas não são produzidas a temperaturas inferiores a 10°C, e quando presentes em alimentos podem causar intoxicações alimentares (Food Safety Authority of Ireland 2020). A presença de estafilococos coagulase positiva em queijo pode dar-se pela contaminação do leite durante a ordenha ou contacto com equipamento contaminado (Perin et al. 2018; Brom et al. 2020), mas o pH baixo, o processo de salga e a presença de bactérias lácticas no leite cru e queijo permitem reduzir o crescimento (Yoon et al. 2016; Food Standards Scotland 2018). A prevenção dos problemas de origem alimentar causados por toxina estafilocócica começa por prevenir a presença de mastite nos rebanhos e limitar o crescimento de estafilococos coagulase positiva durante a refrigeração do leite cru através do controlo da temperatura (<6 °C) (Brom et al. 2020).

As contagens de bactérias lácticas, enterobactérias e leveduras em amostras de queijo apresentaram valores similares aos mencionados em estudos anteriores (Freitas et al. 1996; Tavaría e Malcata 1998; Tavaría e Malcata 2000; Picon et al. 2006; Pintado et al. 2008). Relativamente à quantificação de *E.coli*, 64% das amostras de crosta e 77% das amostras de massa deste trabalho estão em conformidade com o limite higiénico de 2 log UFC g⁻¹, recomendado pela Food Standards Scotland (2018) para queijo produzido com leite cru, apresentando uma oportunidade para melhoria da qualidade dos Queijos DOP em estudo.

Capítulo 7 - Conclusões

Com o objetivo de determinar a qualidade microbiológica do leite cru utilizado na produção de Queijos DOP da Região Centro e a qualidade microbiológica desses queijos, foram analisadas 406 amostras de leite cru (363 de ovelha e 43 de cabra) e 56 queijos (17 Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, 11 Queijos Rabaçal DOP e 28 Queijos Serra da Estrela DOP). Na matriz leite, foram feitas contagens de mesófilos (parâmetro referido no Regulamento (CE) N.º 1662/2006), psicotróficos, *Pseudomonas* spp., bactérias coliformes, *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva, leveduras e bolores. Na matriz queijo, foram feitas contagens de bactérias lácticas, microrganismos psicotróficos, enterobactérias, bactérias coliformes, *E.coli* β-glucuronidase positiva, estafilococos coagulase positivas (previsto no Regulamento (CE) N.º 1441/2007), leveduras, bolores e *Clostridium perfringens*, tal como a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (previstas no Regulamento (CE) N.º 1441/2007).

Os resultados deste trabalho indicam que, relativamente aos mesófilos, o único parâmetro microbiológico legislado em leite cru para produção de queijo, todas as amostras de leite cru com origem no Rabaçal apresentam qualidade microbiológica satisfatória, com a totalidade das médias geométricas das contagens (4,8 log UFC mL⁻¹) em conformidade com o limite legal em vigor de ≤5,7 log UFC mL⁻¹. No caso dos leites da Serra da Estrela (5,1 log UFC mL⁻¹) e da Beira Baixa (5,6 log UFC mL⁻¹) 92% e 78% das amostras cumpriram respetivamente o limite legal, o que indica que existe espaço para melhoria da qualidade microbiológica do leite cru produzido.

Para os restantes indicadores microbiológicos analisados nas 406 amostras de leite cru, foram obtidas contagens médias entre 3,5 e 4,7 log UFC mL⁻¹ para *Pseudomonas* spp., entre 3,0 e 3,8 log UFC mL⁻¹ para leveduras e entre 1,8 e 2,6 log UFC mL⁻¹ para bolores. Os resultados dos microrganismos psicotróficos (3,9-4,7 log UFC mL⁻¹) apontam para uma qualidade microbiológica satisfatória, com 95% das amostras em conformidade com o valor guia de 6,0 log UFC mL⁻¹. Por fim, as contagens de bactérias coliformes (2,7-3,4 log UFC mL⁻¹) e de *E.coli* (1,0-2,1 log UFC mL⁻¹), indicam a necessidade de adoção de boas práticas de higiene, de forma a permitir a melhoria da qualidade do leite cru produzido na Região Centro.

Na análise dos resultados obtidos na caracterização de leite cru de ovelha Região Centro, verifica-se que as médias de contagens obtidas são similares às médias observadas na análise da totalidade das amostras, com contagens a variar entre 3,3 e 4,7 log UFC mL⁻¹

para *Pseudomonas* spp., 2,5 e 3,4 log UFC mL⁻¹ para coliformes, 1,1 e 2,1 log UFC mL⁻¹ para *E.coli*, 3,0 e 3,8 log UFC mL⁻¹ para leveduras e entre 1,5 e 2,7 log UFC mL⁻¹ para bolores. Das 363 amostras, 94% apresentaram contagens de psicrotóxicos (3,7-4,7 log UFC mL⁻¹) inferiores ao valor recomendado de 6 log UFC mL⁻¹. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a totalidade das amostras de leite cru da Região Centro, e mantêm a necessidade de implementação de melhorias da qualidade microbiológica do leite cru oriundo desta região.

A comparação dos resultados obtidos na avaliação da qualidade microbiológica do leite cru utilizado na produção de Queijos DOP da Região Centro com as respostas dos produtores aos questionários (Anexo III), permitiu propor um conjunto de boas práticas: continuação do rastreio de mastites, utilização de água proveniente da rede pública para o abeberamento e limpeza dos equipamentos, e implementação de hábitos de higienização do úbere antes da ordenha, de forma a melhorar a qualidade microbiológica do leite cru produzido.

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas realizadas aos Queijos da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijos Rabaçal DOP e Queijos Serra da Estrela DOP relativamente aos parâmetros do Regulamento (CE) N.º 1441/2007, indicam uma conformidade no que diz respeito às pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Ausência em 25 g). Já em relação à quantificação de estafilococos coagulase positiva, destacaram-se seis amostras de crosta (cinco em Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo e uma em Queijo Serra da Estrela DOP (QSE1)), que apresentaram contagens superiores ao limite legislado de 5 log UFC g⁻¹.

As quantificações de bactérias lácticas (8,4 log UFC g⁻¹), enterobactérias (4,7-5,0 log UFC g⁻¹) e leveduras (4,1-5,7 log UFC g⁻¹), são semelhantes aos resultados obtidos por diversos autores. Relativamente às bactérias coliformes, foram observadas médias entre 4,4 e 5,1 log UFC g⁻¹ e entre 1,6 e 2,8 log UFC g⁻¹ para bolores. Foi ainda identificada uma necessidade de melhoria da qualidade dos Queijos DOP em estudo quando se analisaram os resultados obtidos na quantificação de *E.coli* (1,6-1,9 log UFC g⁻¹), em que se observaram amostras de crosta e de massa acima do limite higiénico recomendado de 2 log UFC g⁻¹ para queijo produzido com leite cru.

De uma forma geral, tanto na matriz leite como na matriz queijo, as amostras oriundas da região do Rabaçal apresentam contagens inferiores em quase todos os parâmetros analisados. Isto pode estar relacionado com o facto desta região perfazer apenas 18% das amostras de leite cru analisadas, estando integrados no Projeto apenas 2 produtores de leite desta região, em contraste com os 9 produtores da região da Serra da Estrela e 5 da

região da Beira Baixa. Relativamente às amostras de Queijo Rabaçal DOP, estas perfazem apenas 20% das amostras de queijos analisadas ao longo deste trabalho, sendo que 50% das amostras analisadas foram de Queijo Serra da Estrela DOP e 30% de Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo.

Em suma, a realização deste trabalho permitiu um melhor conhecimento acerca dos Queijos DOP da Região Centro, nomeadamente do Queijo da Beira Baixa DOP tipo Amarelo, Queijo Rabaçal DOP e Queijo Serra da Estrela DOP, bem como da matéria-prima utilizada na sua produção. No entanto, revelou a necessidade de estudar a microbiota dos queijos, em particular dos Queijos DOP da Região Centro, não só devido à falta de informação que existe nesta temática, mas também pela não existência de limites higiénicos/valores de referência para microrganismos como: bactérias coliformes, *E.coli*, enterobactérias, leveduras e bolores.

Capítulo 8 - Considerações Finais

A realização do estágio final de Mestrado em Biotecnologia no Laboratório de Microbiologia no CATAA permitiu-me um contacto direto com a realidade laboral, a aquisição e aprofundamento de competências práticas e a obtenção de autonomia nas tarefas desenvolvidas, sempre com preocupação com a qualidade do trabalho realizado, o que certamente irá contribuir para a valorização do meu currículo.

Este estágio deu-me um melhor entendimento e uma visão mais realista do modo de trabalho num laboratório de Microbiologia, consolidando a minha vontade de trabalhar num laboratório. A oportunidade de participar neste projeto e analisar amostras “reais” foi fundamental na obtenção de autonomia e sentido de responsabilidade.

Durante os vários períodos de mobilidade condicionada decorrente da pandemia da COVID-19, em que foi feita uma pesquisa bibliográfica do tema e redigido o presente relatório, melhorei as minhas capacidades de comunicação, gestão e procura de informação, relevantes para realizar a discussão dos resultados obtidos. Além disso, foi também possível colaborar, como co-autora, no trabalho de Pintado et al. (2021) intitulado: *Assessment of raw sheep milk quality used in the production of protected designation of origin cheeses in the center region of Portugal*, que foi apresentado em poster na *International Conference on Multidisciplinary Research* e cujo *Abstract* foi publicado em *Millenium*, 2ed (espec nº8), 94 (Anexo I).

O período em regime presencial no Laboratório de Microbiologia foi fundamental para consolidar competências e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do meu percurso académico, tendo sido essencial o trabalho em grupo, para obter autonomia nas tarefas desenvolvidas. O tempo passado no laboratório e a realização das mais diversas tarefas, permitiu-me adquirir alguma experiência profissional e desenvolver competências importantes num contexto laboral.

Um balanço final do estágio leva-me a concluir que este ano constituiu uma fase de grande crescimento, tanto para a minha formação profissional, como pessoal, tendo contactado com uma nova realidade, formas diferentes de trabalhar e, sobretudo, com a importância de trabalhar em equipa.

Capítulo 9 - Bibliografia

- AniDoP - Animais Domésticos de Portugal. 2019. Serra Da Estrela . Acedido a março de 2021. <https://anidop.iniaiv.pt/index.php/racas/racas-autoctones>
- AniDoP - Animais Domésticos de Portugal. 2019. Merino da Beira Baixa. Acedido a março de 2021. <https://anidop.iniaiv.pt/index.php/racas/racas-autoctones>
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F.K., dos Santos, M.T.P.G., Alvarenga, N. and Pintado, M.M.. 2020. *A review on microbiological and technological aspects of serpa pdo cheese: an ovine raw milk cheese*. International Dairy Journal. 100, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104561>.
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P.N.L., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A. and Spiga, D.. 2020. *The dairy biorefinery: integrating treatment processes for cheese whey valorisation*. Journal of Environmental Management. 276, 111240. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M.. 2001. *Recent advances in cheese microbiology*. International Dairy Journal. 11 (4-7):259–274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).
- Bianchini, V., Borella, L., Benedetti, V., Parisi, A., Miccolupo, A., Santoro, E., Recordati, C. and Luini, M.. 2014. *Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of campylobacter jejuni in dairy herds in northern Italy*. Applied and Environmental Microbiology. 80 (6): 1832–1837. <https://doi.org/10.1128/AEM.03784-13>.
- Bohnelein, C., Fiedler, G., Loop, J., Franz, C.M.A.P. and Kabisch, J.. 2021. *Microbiological quality and safety of raw milk from direct sale in northern Germany*. International Dairy Journal. 114, 104944. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104944>
- Brom, R., de Jong, A., van Engelen, E., Heuvelink, A. and Vellema, P.. 2020. *Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission*. Small Ruminant Research. 189, 106123. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106123>.
- Barillet, F., Marie, C., Jacquin, M., Lagriffoul, G. and Astruc, J.. 2001. *The French Lacaune dairy sheep breed: use in France and abroad in the last 40 years*. Livestock Production Science. 71(1): 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00237-8)

- Brooks, J. C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R. and Hutkins, R.. 2012. *Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens*. *Food Microbiology*. 31 (2): 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.013>.
- Caderno de Especificações - Queijo Rabaçal DOP. 1994. Acedido em setembro de 2020. <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/92-queijo-rabacal-dop>.
- Caderno de Especificações - Queijo Serra Da Estrela DOP. 2011. Acedido em setembro de 2020. <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/31-queijo-da-serra-da-estrela>.
- Caderno de Especificações - Queijo Da Beira Baixa DOP. 2016. Acedido em setembro de 2020. <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/97-queijos-da-beira-baixa-dop-queijo-de-castelo-branco-queijo-picante-da-beira-baixa-e-queijo-amarelo-da-beira-baixa>.
- Chambers, J.. 2002. *The microbiology of raw milk*. In *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, 3rd ed.. New York, 22–68. <https://doi.org/10.1201/b17915>.
- Cheung, P.C.K. and Mehta, B.M.. 2015. *Handbook of Food Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5>.
- Choi, J., Lee, S.I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Do Ha, S., Kim, J.H. and Park, S.H.. 2020. *Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses*. *Journal of Dairy Science*. 103 (5): 4026–4042. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>.
- Chon, J.W., Kim, J.W., Song, K.Y., Lim, J.S., Bae, D., Kim, H. and Ho Seo, K.. 2020. *Fate and survival of listeria monocytogenes and E.coli o157:h7 during ripening of cheddar cheeses manufactured from unpasteurized raw milk*. *Lwt*. 133, 109944. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109944>.
- Comissão Europeia. 1996. Regulamento (CE) N.º 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17.º do Regulamento (CEE) N.º 2081/92 do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- Comissão Europeia. 2006. Regulamento (CE) N.º 1662/2006 da Comissão de 6 de Novembro de 2006 que altera o Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos

- gêneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial Da União Europeia.
- Comissão Europeia. 2007. Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.
- Comissão Europeia. 2013. Regulamento (UE) N.º 562/2013 da Comissão de 14 de junho de 2013 que aprova uma alteração menor ao caderno de especificações relativo a uma denominação inscrita no registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegidas [Queijo Serra da Estrela (DOP)]. Jornal Oficial Da União Europeia.
- Comissão Europeia. 2021. EAmbrosia – the EU Geographical Indications Register. Acedido em fevereiro de 2021. <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/#>.
- Cunha, J.T., Ribeiro, T.I.B., Rocha, J.B., Nunes, J., Teixeira, J.A. and Domingues, L.. 2016. *RAPD and SCAR markers as potential tools for detection of milk origin in dairy products: adulterant sheep breeds in Serra da Estrela cheese production*. Food Chemistry. 211: 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.109>.
- D’Amico, D.J. and Donnelly, C.W.. 2010. *Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices*. Journal of Dairy Science. 93(1): 134–147. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2426>
- D’Amico, D.J., Groves, E. and Donnelly, C.W.. 2008. *Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production*. Journal of Food Protection. 71 (8): 1580–1589. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1580>.
- Decreto Regulamentar 42/85 de 5 de junho. Diário da República 1.a série — N.º 152. Ministério da Agricultura.
- Decreto Regulamentar 22/88 de 5 de maio. Diário da República 1.a série — N.º 121. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.
- Despacho n.º 12/94 de 26 de Janeiro de 1994. Diário da República 2.a série — N.º 21. Ministério do Planeamento e da Administração do Território
- Despacho n.º 10 518/2007 de 4 de Junho de 2007. Diário da República, 2.a série — N.º

107. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento e das Pescas.
- Devendra, C. and Haenlein, G.F.W.. 2016. *Dairy Goat Breeds*. Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00622-3>
- DGADR. 2019. Inquérito aos agrupamentos de produtores de produtos com DOP/IGP/ETG 2018. Acedido em janeiro de 2021. <https://www.dgadr.gov.pt/sustentavel/dop-igp-etg>.
- Eurostat. 2019. Milk collection (all milks) and dairy products obtained - annual data. Acedido em janeiro de 2021. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO_MK_POBTA__custom_880134/default/table?lang=en.
- Eurostat. 2020. Two thirds of EU milk used to make cheese and butter. Acedido em janeiro de 2021. <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/ddn-20200131-1>.
- Farkye, N. Y. 2014. *Cheese: microbiology of cheesemaking and maturation*. Encyclopedia of Food Microbiology: 2nd Ed.. Elsevier. 395–401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00059-8>.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczyscha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K. and Cerf, O.. 2013. *Review of Shiga-toxin-producing E.coli (STEC) and their significance in dairy production*. International Journal of Food Microbiology. 162 (2): 190–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>.
- Food Safety Authority of Ireland. 2020. Guidelines for the interpretation of results of microbiological testing of ready-to-eat foods placed on the market. Acedido em novembro de 2020. https://www.fsai.ie/publications_GN3_microbiological_limits/.
- Food Standards Scotland. 2018. *Review of controls for pathogen risks in scottish artisan cheeses made from unpasteurized milk*. Acedido em novembro de 2020. https://www.foodstandards.gov.scot/downloads/FSS_2017_015_-_Control_of_pathogens_in_unpasteurised_milk_cheese_-_Final_report_v_4.7_-_20th_November_2018_.pdf
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R. and Stradiotto, K.. 2002. *Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year*. Journal of Dairy Research. 69 (2): 213–225.

<https://doi.org/10.1017/S0022029902005459>.

- Fotou, K., Tzora, A., Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Avgeris, I., Bezirtzoglou, E., Akrida-Demertzi, K. and Demertzis, P.G.. 2011. *Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene*. *Anaerobe*. 17 (6): 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.002>.
- Freitas, A.C., Pais, C., Malcata, F.X. and Hogg, T.A.. 1996. *Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese*. *Journal of Food Protection*. 59 (2): 155–160. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.155>.
- Freitas, C. and Malcata, F.X.. 2000. *Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the iberian peninsula from ovine and caprine milks*. *Journal of Dairy Science*. 83 (3): 584–602. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74918-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74918-6).
- Freitas, M.R. 2017. *Produção leiteira e curvas de lactação de ovelhas Assaf*. Faculdade de Medicina Veterinária. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa
- Friker, B., Morach, M., Püntener, S., Cernela, N., Horlbog, J. and Stephan, R.. 2019. *Assessing the microbiological quality of raw goats' and ewes' tank milk samples in Switzerland*. *International Dairy Journal*. 104609. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104609>.
- Fröhlich-Wyder, M.T., Arias-Roth, E. and Jakob, E.. 2019. *Cheese yeasts*. *Yeast*. 36 (3): 129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>.
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. and Mucchetti, G.. 2014. *Invited review: microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters*. *Journal of Dairy Science*. 97 (2): 573–591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7187>.
- Gaya, P., Medina, M. and Nuntez, M.. 1987. *Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewe's milk*. *Journal of Applied Bacteriology*. 62 (4): 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04927.x>.
- Guinee, T. P. and Sutherland, B. J.. 2011. *Cheese: salting of cheese*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*: 2nd Ed. Elsevier. 595–606. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00074-1>.
- Gwandu, S. H., Nonga, H. E., Mdegela, R. H., Katakweba, A. S., Suleiman, T. S. and Ryoba, R.. 2018. *Assessment of raw cow milk quality in smallholder dairy farms*

- in *Pemba Island Zanzibar, Tanzania*. *Veterinary Medicine International*. 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/1031726>.
- Health Protection Agency. 2009. *Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market*. Acedido em novembro de 2020. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf
- IDF. 2014. *IDF Factsheet 001/2017 - The importance of salt in the manufacture and ripening of cheese*. International Dairy Federation, Brussel, Belgium, no. SI-1401: 4.
- Instituto Nacional de Estatística. 2021. *Consumo humano de leite e produtos lácteos per capita (kg/ hab.) por tipo de leites e produtos lácteos*. Acedido em janeiro 2021. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000214&contexto=bd&selTab=tab2.
- INSA. 2019. *Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: Valores-Guia*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, Lisboa. <http://repositorio.insa.pt//handle/10400.18/5610>
- ISO 707 / IDF 50. 2008. *Milk and milk products – Guidance on sampling*. International Organization for Standardization.
- ISO 4832. 2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique*. International Organization for Standardization.
- ISO 4833-1. 2013. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C*. International Organization for Standardization.
- ISO 6579-1. 2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella – Part 1: Detection of Salmonella spp.*. International Organization for Standardization.
- ISO 6887-1. 1999. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. International Organization for Standardization.

- ISO 6887-5. 2010. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products*. International Organization for Standardization.
- ISO 6888-2/Amd 1:2003. 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. AMENDMENT 1: Inclusion of precision data*. International Organization for Standardization.
- ISO 7218. 2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization.
- ISO 7937. 2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens – Colony-count technique*. International Organization for Standardization.
- ISO 8552. 2004. *Milk – Estimation of psychrotrophic microorganisms – Colony-count technique at 21 °C (Rapid method)*. International Organization for Standardization.
- ISO 11059 / IDF 225. 2009. *Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.* International Organization for Standardization.
- ISO 11290-1. 2017. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method. AMENDMENT 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data*. International Organization for Standardization.
- ISO 14461-2. 2005. *Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps*. International Organization for Standardization.
- ISO 15214. 1998. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C*. International Organization for Standardization.
- ISO 16649-2. 2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive E.coli – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide*.

International Organization for Standardization.

- ISO 17410. 2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms*. International Organization for Standardization.
- ISO 21527-1. 2008. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds –Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*. International Organization for Standardization.
- ISO 21527-2. 2008. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds –Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*. International Organization for Standardization.
- ISO 21528-2. 2017. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method*. International Organization for Standardization.
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S. and Dugat-Bony, E.. 2014. *Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin*. FEMS Microbiology Letters. 362 (2): 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>.
- Kongo, J. M. and Malcata, F. X.. 2016. *Cheese: chemistry and microbiology*. Encyclopedia of Food and Health, 1st ed. Elsevier. 735-740. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00135-5>.
- Lappa, I.K., Papadaki, A. and Kachrimanidou, V.. 2019. *Cheese whey processing: integrated biorefinery*. Foods. 8(8), 347. <https://doi.org/10.3390/foods8080347>
- 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 (6): 1725–1739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77505-0).
- Macedo, A.C., Costa, M.L. and Malcata, F.X.. 1996. *Changes in the microflora of Serra cheese: evolution throughout ripening time, lactation period and axial location*. International Dairy Journal. 6 (1): 79–94. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00051-4](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00051-4).
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A. and Desmasures, N.. 2012. *Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices*. International

- Dairy Journal. 27 (1–2): 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.009>.
- Manuelian, C. L., Boselli, C., Vigolo, V., Giangolini, G. and De Marchi, M.. 2020. *Effects of animal versus vegetal rennet on milk coagulation traits in mediterranean buffalo bulk milk*. Journal of Dairy Science. 103 (6): 4958–4964. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17208>.
- Martins, A.P.L.. 2001. *Factores tecnológicos e qualidade do queijo de leite de pequenos ruminantes*. In Colectânea Da SPOC. 10: 13–40.
- McSweeney, P.L.H. 2007. *Cheese Problems Solved*. Cambridge. Woodhead Publishing.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter P.D., and Everett, D.W.. 2017. *Cheese chemistry, physics & microbiology*. 4th ed. Cambridge. Woodhead Publishing.
- Mehta, B. M. 2015. *Chemical composition of milk and milk products*. Handbook of Food Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. 511–553. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_31.
- Metz, M., Sheehan, J. and Feng, P.C.H.. 2019. *Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses – a literature review*. Food Microbiology. 85, 103283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283>.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. and Berthier, F.. 2014. *Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits*. International Journal of Food Microbiology. 177: 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.
- Mozaffarian, D.. 2019. *Dairy foods, obesity, and metabolic health: the role of the food matrix compared with single nutrients*. Advances in Nutrition. 10 (5): 917S-923S. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz053>.
- Paludetti, L.F., Kelly, A.L., O'Brien, B., Jordan, K. and Gleeson, D.. 2018. *The effect of different precooling rates and cold storage on milk microbiological quality and composition*. Journal of Dairy Science. 101 (3): 1921–1929. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13668>.
- Parente, E., Ricciardi, A. and Zotta, T.. 2020. *The microbiota of dairy milk: a review*. International Dairy Journal. 107, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>.
- Parlamento Europeu. 1992. Diretiva 92/46/CEE. Jornal Oficial Das Comunidades Europeias. http://eurlex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb2ec64577bdf8756d3d694eeb.0009.02/DOC_1&format=PDF.

- Perin, L.M., Pereira, J.G., Bersot, L.S. and Nero, L.A.. 2019. *The microbiology of raw milk*. Raw Milk. 45–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00003-1>.
- Picon, A., Garde, S., Ávila, M. and Nuñez, M.. 2016. *Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses*. International Dairy Journal. 58: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.010>.
- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L., Pintado, M.M., Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X.. 2008. *Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms*. International Dairy Journal. 18 (6): 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.021>
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Deplano, M., Corda, A. and Cosentino, S.. 2006. *Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional sardinian cheese made from ewe's milk*. International Journal of Dairy Technology. 59 (3): 171–179. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00260.x>.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P, Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D.. 2013. *The complex microbiota of raw milk*. FEMS Microbiology Reviews. 37 (5): 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- Reis, P.J.M. and Malcata, F.X. 2011. *Current state of portuguese dairy products from ovine and caprine milks*. Small Ruminant Research. 101 (1–3): 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.032>.
- Robinson, R.K. 2002. *Dairy Microbiology Handbook*. 3rd ed. New York. John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/0471723959>.
- Rosa. 2018. *Waste generated by food industry and reuse in a circular economy approach: the whey processing*. Concepts of Dairy & Veterinary Sciences. 2 (2): 171–173. <https://doi.org/10.32474/cdvs.2018.02.000132>.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M. and Wilbey, R. A.. 2003. *Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses*. International Journal of Dairy Technology. 56 (2): 76–85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>.
- Sanjuan, S., Rúa, J. and García-Armesto, M.R.. 2003. *Microbial flora of technological interest in raw ovine milk during 6°C storage*. International Journal of Dairy Technology. 56 (3): 143–148. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00091.x>.
- Scintu, M.F. and Piredda, G.. 2007. *Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products*. Small Ruminant Research. 68 (1–2): 221–231.

- <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.005>.
- Tavaria, F.K. and Malcata, F.X.. 1998. *Microbiological characterization of Serra Da Estrela cheese throughout its appellation d'origine protegee region*. Journal of Food Protection. 61 (5): 601–607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.601>.
- Tavaria, F.K. and Malcata, F.X.. 2000. *On the microbiology of Serra Da Estrela cheese: geographical and chronological considerations*. Food Microbiology. 17 (3): 293–304. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0315>.
- Tavaria, F.K., Reis, P.J.M. and Malcata, F.X.. 2006. *Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese*. International Dairy Journal. 16 (8): 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.08.010>.
- Tedeschi, T., Galaverna, G., Dossena, A. and Sforza, S.. 2013. *Cheeses*. Comprehensive Analytical Chemistry. 479-509. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59562-1.00019-0>.
- Tibério, L. and Diniz, F.. 2012. *Agri-food traditional products: from certification to the market - portuguese recent evolution*. Regional Science Inquiry Journal. 57–86.
- Torkar, K. G. and Vengušt, A.. 2008. *The presence of yeasts, moulds and aflatoxin m1 in raw milk and cheese in Slovenia*. Food Control. 19 (6): 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.008>.
- Verraes, C., Vlaemyneck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M. and Herman, L.. 2015. *A Review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk*. International Dairy Journal. 50: 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J.. 2005. *Dairy Science and Technology (2nd ed.)*. Boca Raton. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028010>
- Yamazi, A. K., Moreira, T. S., Cavicchioli, V. Q., Burin, R.C.K. and Nero, L.A.. 2013. *Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk*. Small Ruminant Research. 113: 205–210. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.02.004
- Yoon, Y., Lee, S. and Choi, K.H.. 2016. *Microbial benefits and risks of raw milk cheese*. Food Control. 63: 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>.

ANEXO I

ASSESSMENT OF RAW SHEEP MILK QUALITY USED IN THE PRODUCTION OF PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN CHEESES IN THE CENTER REGION OF PORTUGAL



C. Miguel Pintado¹, M. Resende¹, A. Silveira¹, H. Beato¹, J. Dias¹, M. Cristóvão¹, A. Riscado¹, L. Paulo¹, A. Moitinho Rodrigues^{1,2,3}

¹CATAA - Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar, Portugal

²Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

³CERNAS, Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade, Portugal

THE PURPOSE

to evaluate the **QUALITY OF RAW SHEEP MILK** used to produce Serra da Estrela PDO cheese (SE), Beira Baixa-Amarelo PDO cheese (BB) and Rabaçal PDO cheese (R), regarding **COUNT OF MESOPHILIC MICROORGANISMS** and **CHEMICAL COMPOSITION**.



THE RESULTS

MICROBIOLOGICAL QUALITY

78% of the 362 raw milk samples were of **SATISFACTORY QUALITY**.

Raw sheep milk for Rabaçal PDO cheese presented the lower ($p \leq 0,05$) mean value of mesophilic microorganisms count ($4.72 \log\text{CFU mL}^{-1}$) than milk from Serra da Estrela ($5.11 \log\text{CFU mL}^{-1}$) and Beira Baixa ($5.55 \log\text{CFU mL}^{-1}$).

CHEMICAL QUALITY

Raw sheep milk for Serra da Estrela PDO cheese production, from Bordaleira Serra da Estrela native breed, presented higher contents ($p \leq 0,05$) of protein (6.14%), fat (7.68%), solids-not-fat (11.76%) and total solids (19.34%) than milk used to produce Beira Baixa and Rabaçal PDO cheeses, from Merino, Lacaune and Awassi crossbreed sheep (Figure 1).

Raw sheep milk for Rabaçal cheese production exhibited the highest lactose content (4.82%, $p \leq 0,05$) (Figure 1).

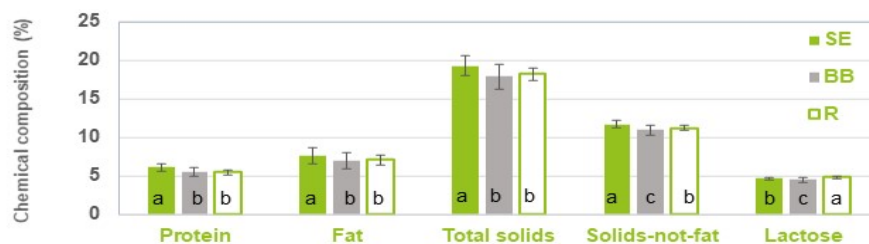


Figure 1. Chemical composition of raw sheep milk used to produce Serra da Estrela PDO cheese (SE, n=163), Beira Baixa PDO cheese (BB, n=156) and Rabaçal PDO cheese (R, n=43). Mean and standard deviation (n=362). Means with different superscript letters differ significantly ($p \leq 0.05$). Sampling was conducted on a fortnightly basis from February 2019 to April 2021.

CONCLUSION

The results suggest that it is necessary to improve the microbiological quality from Portugal Central Region sheep milk farms.

Program for the Valorization of Cheese of Portugal's Center Region. CENTRO 04-3928-FEDER-000014. Co-financed by the Centro 2020, Portugal 2020, and the European Union through the ERDF.



ANEXO II

CARACTERIZAÇÃO SUMÁRIA DA UNIDADE DE PRODUÇÃO DE LEITE					
IDENTIFICAÇÃO EXPLORAÇÃO	DA				
LOCALIZAÇÃO EXPLORAÇÃO	DA				
Entrevistado		Nome		Telefone	
1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO					
1.1	Área da exploração				
1.2	Superfície Agrícola Utilizada				
1.3	Nº de colaboradores	Familiar		Assalariado	
1.4	Fontes de rendimento da exploração	Leite	Carne	Outras (Quais?)	
1.5	Ovinos	Nº total		Nº reprodutoras	
		Raças			
1.6	Caprinos	Nº total		Nº reprodutoras	
		Raças			
1.7	Bovinos	Nº total		Nº reprodutoras	
		Raças			
1.8	Outros animais de espécie pecuária	Aves	Suínos	Equídeo	
		Leporídeos	Outros (Quais)		
1.9	Certificação sanitária do rebanho	B2	B3	B4	
1.10	Produção de leite em 2020 (L)	Vaca	Ovelha	Cabra	
1.11	Convivência do rebanho com animais de companhia	Sim		Não	
		Quais?			
2. SAÚDE DOS ANIMAIS					
2.1	Apoio veterinário	Sim		Não	
2.2	Registo de medicamentos (Livro de medicamentos)	Sim		Não	
2.3	Armário de medicamentos	Sim		Não	
2.4	Isolamento de animais doentes	Sim		Não	
2.5	Local para quarentena/isolamento de animais	Sim		Não	
		Onde?			
2.6	Cumprimento período de carência	Sim		Não	

2.7	Controlo de mamites	Sim	Não	
		Como faz?		
		Nº mamites em 2020		
2.8	Controlo de pragas	Sim	Não	
		Quais?		
3. ALIMENTAÇÃO E ÁGUA				
3.1	Alimentação	Pastagem	Pasto cultivado	Feno/palha
		Concentrado		Outro (Qual?)
3.2	Formulação de regime alimentar com acompanhamento técnico	Sim	Não	
3.3	Abeberamento	Bebedouros		Charca ou barragem
3.4	Água utilizada na exploração	Rede pública	Furo (água tratada)	Água não tratada
3.5	Controlo de qualidade da água	Sim	Não	
		Parâmetros analisados e frequência de análises		
4. ESTÁBULO				
4.1	Tipo de estabulação	Fixa	Livre	Mista
4.2	Pavimento	Terra	Ripado	Cimento
		Outro (Qual?)		
4.3	Tipo de cama	Palha	Mato	Aparas madeira
		Terra	Outro (Qual?)	
4.4	Frequência da muda de cama			
4.5	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim	Não	

5. CONDIÇÕES DA ORDENHA				
5.1	Paredes e tetos: material adequado e facilmente lavável	Sim	Não	
5.2	Pavimento	Terra	Cimento	Outro (Qual?)
5.3	Ventilação	Sim	Não	
5.4	Iluminação	Natural		Artificial
5.5	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim	Não	

5.6	Água quente e água fria	Sim	Não
5.7	Lava-mãos com comando não manual, toalhetes descartáveis e dispositivo para sabonete líquido	Sim	Não
		Como lava as mãos?	
5.8	Vestuário limpo e adequado (bata, avental, luvas ...)	Sim	Não
5.9	Cobrem cortes com curativo ou uma luva impermeável	Sim	Não
5.10	Caixa de primeiros socorros	Sim	Não
5.11	Plano de higiene de instalações e equipamentos	Sim	Não
5.12	Frequência da limpeza da sala de ordenha		
5.13	Tipo de ordenha	Manual	Mecânica
5.14	Horários da ordenha		
5.15	Fornecimento de alimento durante a ordenha	Sim	Não
5.16	Observação dos animais para detetar sinais de doença	Sim	Não
		Quais?	
5.17	Limpeza do úbere e partes adjacentes antes da ordenha	Sim	Não
		Como?	
5.18	<i>Pré dipping</i>	Sim	Não
		Como?	
5.19	Eliminação do primeiro jato de leite	Sim	Não
5.20	<i>Post dipping</i>	Sim	Não
5.21	Avaliação do leite: cor, cheiro, ...	Sim	Não
5.22	Separação de leite com aspeto, cheiro...suspeitos	Sim	Não
		Destino	
5.23	Separação de animais doentes na ordenha	Sim	Não
		Local?	
5.24	Ordenha de animais doentes	Início da ordenha	Fim da ordenha
5.25	Separação de leite animais doentes	Sim	Não
		Destino	
5.26	Separação de colostro do leite	Sim	Não
5.27	Limpeza do equipamento de ordenha	Antes da ordenha	Depois da ordenha

	<i>(Procedimento: Pré-lavagem, lavagem, enxaguamento Utilização de água fria/ água quente Detergente/desinfetante utilizado)</i>	Como?		
5.28	Água para lavagem do equipamento de ordenha	Rede pública	Furo (ág. tratada)	Água não tratada
5.29	Manutenção do equipamento de ordenha	Sim		Não
		Frequência		
		Em que consiste?		
6. CONDIÇÕES DA SALA DE ARMAZENAMENTO DO LEITE				
6.1	Localização da sala de armazenamento do leite			
6.2	Paredes e tetos: material adequado e facilmente lavável	Sim		Não
6.3	Pavimento	Terra		Cimento
		Mosaico		Outro (Qual?)
6.4	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim		Não
6.5	Instalação de água quente	Sim		Não
6.6	Limpeza da sala de armazenamento do leite	Frequência		
		Produtos de limpeza		
6.7	Armazenamento de outros produtos na sala	Sim		Não
6.8	Acesso de animais à sala	Sim		Não
6.9	Material do recipiente para armazenamento do leite	Inox		Outro (Qual?)
6.10	Armazenamento de leite em tanque com refrigeração	Sim		Não
		Temperatura definida (°C)		
6.11	Mistura de leite de diferentes ordenhas no tanque	Sim		Não
6.12	Frequência da recolha de leite			
6.13	Permanência máxima do leite no tanque (h)	<i>(Fim de semana)</i>		
6.14	Limpeza do tanque de refrigeração	Frequência		
		Produtos de limpeza utilizados		

ANEXO III

	LBB1	LSE1	LSE3	LSE9	
1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO					
1.1	Área da exploração (hectares)	340	190,8	1874	90
1.2	Superfície Agrícola Utilizada	340	61,98	1757	-
1.3	Nº de colaboradores familiares	0	0	0	2
	Nº de colaboradores assalariados	4	1	1	4
1.4	Fontes de rendimento da exploração	Leite + Carne	Leite + Carne	Leite + Carne	Carne + Queijo
1.5	Ovinos: Nº total	1100	241	80	260
	Ovinos: Nº reprodutoras	1068	235	76	230
	Ovinos: Raça	-	Bordaleira Serra da Estrela	Bordaleira Serra da Estrela	Bordaleira Serra da Estrela
1.6	Caprinos: Nº total	-	-	-	-
	Caprinos: Nº reprodutoras	-	-	-	-
	Caprinos: Raça	-	-	-	-
1.7	Bovinos: Nº total	-	-	-	-
	Bovinos: Nº reprodutoras	-	-	-	-
	Bovinos: Raça	-	-	-	-
1.8	Outros animais de espécie pecuária	Não	Não	Não	Não
1.9	Certificação sanitária do rebanho	B4	B4	B4	B4
1.10	Produção de leite em 2020 (L) Ovelha	30000	-	-	16000
	Produção de leite em 2020 (L) Cabra	-	-	-	-
1.11	Convivência do rebanho com animais de companhia	Cão	Cão	Cão	Cão
2. SAÚDE DOS ANIMAIS					
2.1	Apoio veterinário	Sim	Sim	Sim	Sim
2.2	Registo de medicamentos (Livro de medicamentos)	Não	Sim	Sim	Sim
2.3	Armário de medicamentos	Não	Não	Não	Sim
2.4	Isolamento de animais doentes	Sim	Sim	Sim	Sim

	Onde	Estábulos separados	Estábulos separados	Estábulos separados	Estábulos separados
2.5	Quarentena de animais	Sim	Sim	Sim	Sim
	Onde	Estábulos separados	Estábulos separados	Estábulos separados	Estábulos separados
2.6	Cumprir período de carência	Sim	Sim	Sim	Sim
2.7	Controlo de mamites	Sim	Sim	Sim	Sim
	Como	TCM	TCM	TCM	TCM
	Nº mamites em 2020:	7	0	0	10
2.8	Controlo de pragas	Não	Não	Não	Não
3. ALIMENTAÇÃO E ÁGUA					
3.1	Alimentação - Pastagem	Sim	Sim	Sim	Sim
	Alimentação - Pasto cultivado	Sim	Sim	Sim	Sim
	Alimentação - Feno/Palha	Sim	Sim	Sim	Sim
	Alimentação - Concentrado	Sim	Sim	Sim	Sim
3.2	Regime alimentar com acompanhamento técnico	Sim	Sim	Sim	Sim
3.3	Abeberamento	Bebedouro + Charca ou barragem	Bebedouro	Bebedouro	Bebedouro
3.4	Água utilizada na exploração	Furo (água tratada)	Rede Pública	Rede Pública	Água não tratada
3.5	Controlo de qualidade da água	Sim	-	-	Não
	Frequência	2 vezes por ano	-	-	-
4. ESTÁBULO					
4.1	Tipo de estabulação	Mista	Mista	Mista	Livre
4.2	Pavimento	Terra	Ripado	Ripado	Cimento
4.3	Tipo de cama	Palha	Palha	Palha	Palha + Mato
4.4	Frequência da muda de cama	Semanal	1 a 2 vezes por ano	1 a 2 vezes por ano	Quinzenal
4.5	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim	Sim	Sim	Sim
5. CONDIÇÕES DA ORDENHA					
5.1	Paredes e tetos: material adequado e facilmente lavável	Não	Não	Não	Sim
5.2	Pavimento	Azulejo	Cimento	Azulejo	Mosaico
5.3	Ventilação	Natural	Natural	Natural	Natural

5.4	Iluminação	Artificial	Artificial	Artificial	Artificial
5.5	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim	Sim	Sim	Sim
5.6	Água quente e água fria	Sim	Sim	Sim	Sim
5.7	Lava-mãos com comando não manual, toalhetes descartáveis e dispositivo para sabonete líquido	Não	Não	Não	Não, usa torneira na fossa da sala de ordenha ou wc
5.8	Vestuário limpo e adequado (bata, avental, luvas ...)	Avental	Avental	Avental	Casaco para ordenha
5.9	Cobrem cortes com curativo ou uma luva impermeável	Não	Não	Não	Sim
5.10	Caixa de primeiros socorros	Sim	Não	Não	Sim
5.11	Plano de higiene de instalações e equipamentos	Sim	Sim	Sim	Sim
5.12	Frequência da limpeza da sala de ordenha	15 em 15 dias	Diária	Após cada ordenha	Diária
5.13	Tipo de ordenha	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Manual + Mecânica
5.14	Horários da ordenha	Manhã e noite	Manhã e noite	Manhã e noite	Manhã e noite
5.15	Fornecimento de alimento durante a ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim
5.16	Observação dos animais para detetar sinais de doença	Sim	Sim	Sim	Sim
5.18	Limpeza do úbere e partes adjacentes antes da ordenha	Não	Não	Não	Não, mas se os tetos estiverem sujos com fezes limpam com toalhetes
5.19	Pré dipping	Não	Não	Não	Não
5.20	Eliminação do primeiro jato de leite	Não	Não	Não	Não
5.21	Post dipping	Não	Não	Não	Não
5.22	Avaliação do leite: cor, cheiro, ...	Não	Não	Não	Sim
5.23	Separação de leite com aspeto, cheiro...suspeitos	Não	Não	Não	Sim, é eliminado
5.24	Separação de animais doentes na ordenha	Não	Sim	Sim	Sim
	Onde	Robot de ordenha deteta e separa	Estábulo	Estábulo	Ordenhados no final
5.25	Ordenha de animais doentes	-	Ordenha manual	Ordenha manual	Ordenha Manual
5.26	Separação de leite animais doentes	-	Sim	Sim	Sim

	Destino	-	Eliminado	Eliminado	Eliminado
5.27	Separação de colostro do leite	Sim	Sim	Sim	Sim
5.28	Limpeza do equipamento de ordenha	Depois da ordenha	Depois da ordenha	Depois da ordenha	Depois da ordenha
	Como?	Sistema de limpeza automático com ácido ou alcalino	Automática com I31M/I601 (homologados)	Adiciona-se manualmente os detergentes no sistema de ordenha, I31M/I601 (homologados)	Detergente/desinfetante
5.29	Água para lavagem do equipamento de ordenha	Furo (água tratada)	Rede Pública	Rede Pública	Rede Pública
5.30	Manutenção do equipamento de ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim
	Frequência	Semestral	Anual	Anual	Anual
	Como	Revisão da marca a cada 6 meses verificação diária pelo técnico de ordenha	O técnico da associação verifica o equipamento anualmente verificação diária pelo técnico de ordenha	O técnico da associação verifica o equipamento anualmente verificação diária pelo técnico de ordenha	O técnico da associação verifica o equipamento anualmente verificação diária pelo técnico de ordenha
6. CONDIÇÕES DA SALA DE ARMAZENAMENTO DO LEITE					
6.1	Localização da sala de armazenamento do leite	Separada fisicamente do local de ordenha	Na queijaria, o leite para bilhas no local e depois transportado até à sala de armazenamento do leite	Separada fisicamente do local de ordenha	Separada fisicamente do local de ordenha
6.2	Paredes e tetos: material adequado e facilmente lavável	Sim	Não	Não	Sim
6.3	Pavimento	Mosaico	Mosaico	Cimento	Mosaico
6.4	Drenagem no pavimento (declive e ralos)	Sim	Sim	Sim	Sim
6.5	Instalação de água quente	Sim	Sim	Sim	Sim
6.6	Limpeza da sala de armazenamento do leite	15 em 15 dias	Diário	Diário	Diário
	Produtos de limpeza	-	Lixívia	Lixívia	Desinfetante
6.7	Armazenamento de outros produtos na sala	Não	Não	Não	Não
6.8	Acesso de animais à sala	Não	Não	Não	Não
6.9	Material do recipiente para armazenamento do leite	Inox	Inox	Inox	Inox

6.10	Armazenamento de leite em tanque com refrigeração	Sim	Sim	Sim	Sim
	Temperatura definida (°C)	4	4	4	4
6.11	Mistura de leite de diferentes ordenhas no tanque	Sim	Sim	Sim	Sim
6.12	Frequência da recolha de leite	1,5 dias	2 em 2 dias	Todos os dias de manhã exceto domingo	Todos os dias de manhã exceto domingo
6.13	Permanência máxima do leite no tanque (d)	1,5 dias (Fim de semana)	2 dias (Fim de semana)	2 dias (Fim de semana)	2 dias (Fim de semana)
6.14	Limpeza/higienização do tanque de refrigeração	1,5 dias	2 em 2 dias	Diário	Diário
	Produtos de limpeza	Detergente	Lixivia	Lixivia	Detergente/Desinfetante (o mesmo que é utilizado na queijaria para limpar equipamentos e utensílios)
6.15	Utilização da sala para outros fins	Não	Não	Não	Não

