



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA
DE QUEIJOS COMERCIALIZADOS EM PORTUGAL**

Seliza Nancy Tavares da Veiga

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

Mestre João Leopoldo Fontainhas de Sousa Cristina

ORIENTADORA

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA
DE QUEIJOS COMERCIALIZADOS EM PORTUGAL**

Seliza Nancy Tavares da Veiga

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek
Mestre João Leopoldo Fontainhas de Sousa Cristina

ORIENTADORA

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

2012

LISBOA

Dedicatória

À minha filha

Agradecimentos

A Doutora Teresa Semedo por ter aceite orientar este trabalho, agradeço a sua paciência, incansável apoio e disponibilidade.

À Maria Helena Fernandes à Maria José Fernandes pelo auxílio prestado no laboratório, sempre com simpatia e carinho.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e meus irmãos, principalmente Rosa e Ginho, pela sua amizade e por me acompanharem e apoiarem durante esta fase.

À empresa JD Lacticinos Lda pelo fornecimento dos leites.

Ao Juka pelo seu apoio e por estar sempre do meu lado.

Aos meus amigos, colegas e todos os que, de uma forma ou outra, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Resumo

As infeções de origem alimentar têm sido a maior causa de doenças humanas nos últimos séculos. O leite e seus derivados merecem destaque na dieta humana por serem muito consumidos e pela sua facilidade de fabrico. A maioria dos queijos é produzida com leite de vaca, sendo os queijos puros de ovelha e cabra consideradas especialidades. A diferença de preço das matérias primas, indisponibilidade de leite de cabra e ovelha em determinados períodos do ano, e o preço do produto final são incentivos que podem levar os produtores a cometerem fraudes ao incorporar leite não declarado no rótulo.

Tendo em conta que os consumidores prezam pela qualidade dos produtos que adquirem e pela confiança de que levam o que é especificado no rótulo, no presente trabalho procedeu-se à avaliação da qualidade microbiológica e química de 12 queijos adquiridos em supermercados da região de Lisboa e ainda de três amostras de leite. Avaliou-se ainda a autenticidade da informação presente nos rótulos relativamente ao tipo de leite utilizado para o seu fabrico.

As análises microbiológicas incidiram sobre contagem de *E. coli*, microrganismos totais a 30°C, enterobactérias, *Staphylococcus* coagulase positivos, bolores e leveduras; pesquisa de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. Em relação às análises químicas, no queijo determinou-se a atividade de água (a_w), pH e cloretos, enquanto no leite as análises químicas incidiram sobre a determinação do extracto seco, proteína, gordura e densidade. Para verificar a autenticidade dos rótulos relativamente ao tipo de leite especificado como ingrediente recorreu-se a provas baseadas na amplificação de DNA-alvo (PCR- “Polymerase Chain Reaction”).

Concluiu-se que os queijos em análise apresentavam boa qualidade microbiológica (*e.g.*, ausência de *E. coli* em 1 g, *L. monocytogenes* em 25 g e *Staphylococcus* coagulase positivos em 1g) e que os parâmetros químicos se encontravam dentro do esperado; a técnica de PCR permitiu verificar a adulteração de queijos de cabra com leite de ovelha e de queijo de cabra-ovelha com leite de vaca.

Palavras- Chave: Queijo, qualidade microbiológica, qualidade físico-química, adulteração.

Microbiological and physico-chemical quality of cheeses merchandized in Portugal

Abstract

In recent centuries food-borne infections have been major causes of human disease. Milk and dairy products are of major importance in the human diet since they are consumed in large amounts and are easy to manufacture. Most cheeses are made from cow's milk, with ewe's and goat cheeses being considered delicacies. Differences in the price of raw materials, unavailability of goat's and ewe's milk in certain periods of the year, and the price of the final product can lead farmers to commit fraud by incorporating milk not declared on the label.

Given that consumers value the quality of the products they purchase and trust the information specified on the labels, in the present work we proceeded to evaluate the microbiological and chemical quality of 12 cheeses purchased at supermarkets in the region of Lisbon and three milk samples. We also assessed for the authenticity of the information included on the labels, regarding the type of milk used in the cheese manufacture.

Microbiological analyzes focused on counting *E. coli*, total microorganisms at 30°C, coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, yeasts and molds; the presence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were also evaluated. Regarding chemical analysis, we determined the cheese water activity (a_w), pH and chloride content, while the milk chemical analyzes focused on the determination of dry matter, protein, fat and density. To verify the authenticity of the labels for the specified type of milk as an ingredient, molecular methods based on the amplification of target DNA (PCR "Polymerase Chain Reaction") were applied.

Overall, the cheeses under analysis showed good microbiological quality (e.g., absence of *E. coli* in 1 g, *L. monocytogenes* in 25 g, and coagulase positive *Staphylococcus* in 1 g) and chemical parameters were within expected, PCR amplification allowed detection of product adulteration, namely goat cheese with ewe's milk and sheep-goat cheese with cow's milk.

Keywords: Cheese, microbiological quality, physico-chemical quality, adulteration.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução----- | 1 |
| 1.1. História do Queijo----- | 2 |
| 1.2. Definição e classificação de queijo----- | 3 |
| 1.2.1. Quanto à cura----- | 4 |
| 1.2.2. Quanto à composição----- | 4 |
| 1.2.3. Quanto à consistência----- | 4 |
| 1.2.4. Quanto à matéria gorda----- | 5 |
| 1.3. Composição nutricional do queijo----- | 5 |
| 1.4. Aspectos microbiológicos----- | 8 |
| 1.4.1. Microbiota benéfico----- | 8 |
| 1.4.2. Microbiota deteriorativo e microrganismos patogénico----- | 10 |
| 1.4.2.1. Microbiota deteriorativo----- | 10 |
| 1.4.2.1.1. Microrganismos totais a 30°C----- | 10 |
| 1.4.2.1.2. Enterobacteriáceas----- | 11 |
| 1.4.2.2. Microrganismos patogénicos----- | 11 |
| 1.4.2.2.1. <i>Listeria</i> ----- | 12 |
| 1.4.2.2.3. <i>Staphylococcus</i> ----- | 13 |
| 1.4.2.2.2. <i>Salmonella</i> ----- | 14 |
| 1.5. Produção de queijo em Portugal----- | 15 |
| 1.6. Consumo de queijo em Portugal----- | 18 |
| 1.7. Adulteração----- | 19 |
| 1.8. Objetivos do trabalho----- | 21 |
| 2. Materiais e Métodos----- | 22 |
| 2.1. Amostras em estudo----- | 22 |
| 2.2. Análises microbiológicas----- | 23 |
| 2.2.1. Preparação das amostras----- | 23 |
| 2.2.2. Preparação das diluições----- | 23 |
| 2.2.3. Análises microbiológicas efetuadas----- | 23 |
| 2.2.3.1. Contagem de microrganismos totais a 30°C----- | 23 |
| 2.2.3.2. Contagem de <i>Enterobactereacea</i> ----- | 23 |
| 2.2.3.3. Contagem de <i>Escherichia coli</i> ----- | 24 |
| 2.2.3.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos----- | 24 |
| 2.2.3.5. Contagem de Bolores e Leveduras----- | 24 |
| 2.2.3.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.----- | 25 |
| 2.2.3.7. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> ----- | 25 |
| 2.3. Análises físico-químicas----- | 26 |
| 2.3.1. Determinação de a_w ----- | 26 |
| 2.3.2. Medição do pH----- | 26 |
| 2.3.3. Determinação de Cloretos----- | 26 |
| 2.3.4. Determinação de Cinza----- | 27 |
| 2.3.5. Determinação de Proteína----- | 27 |
| 2.3.6. Determinação de Gorduras----- | 27 |
| 2.3.7. Determinação de Densidade----- | 27 |
| 2.3.8. Determinação de Extrato seco isento de gordura----- | 28 |
| 2.4. Identificação do tipo de leite utilizado no fabrico dos queijos em estudo por métodos moleculares----- | 28 |
| 2.4.1. Extração de DNA----- | 28 |
| 2.4.2. Amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase----- | 28 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 3. Resultados e discussão----- | 30 |
| 3.1. Análises microbiológicas----- | 30 |
| 3.2. Análises físico-químicas----- | 35 |
| 3.3. Adulteração----- | 38 |
| 4. Conclusões----- | 42 |
| 5. Referências bibliográficas----- | 43 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Peso relativo dos produtos lácteos obtidos a partir do leite recolhido----- | 15 |
| Figura 2 - Peso da produção de queijo por espécie no ano 2005----- | 16 |
| Figura 3 - Produção de queijo (t) no período de 2007 a 2011----- | 17 |
| Figura 4 - Produção de queijo, por tipo de queijo, no período de 2007 a 2011----- | 17 |
| Figura 5 - Consumo humano de leite e produtos lácteos <i>per capita</i> no período de 2006 a 2010----- | 18 |
| Figura 6 – Peso relativo do consumo de leite e produtos lácteos <i>per capita</i> (kg/habitante)----- | 19 |
| Figura 7 - Resultados do multiplex-PCR dos leites----- | 39 |
| Figura 8 - Resultados do multiplex-PCR dos queijos----- | 40 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Classificação dos queijos quanto à consistência----- | 4 |
| Tabela 2- Classificação dos queijos quanto à matéria gorda----- | 5 |
| Tabela 3 - Composição geral do leite de algumas espécies produtoras----- | 6 |
| Tabela 4- Quantidade diária recomendada de queijo----- | 7 |
| Tabela 5- Queijos analisados (informação disponível no rótulo)----- | 22 |
| Tabela 6- Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados----- | 29 |
| Tabela 7- Resultados das análises microbiológicas----- | 30 |
| Tabela 8- Resultados obtidos nas análises físico-químicas dos queijos----- | 37 |
| Tabela 9- Resultados obtidos nas análises físico-químicas dos leites-- | 38 |
| Tabla 10- Resultados das análises por multiplex-PCR dos queijos----- | 41 |

Lista de Abreviaturas

APT- Agua Peptonada Tamponada
a_w- Atividade da água
BAL- Bactérias ácido láticas
BHI- Caldo de Infusão Cérebro Coração
CDC- “Center for Disease Control”
DI- Dose infetante
DNA- Acido desoxirribonucleico
DHPLC- “High Performance Liquid Chromatography”
DOP- Denominação de Origem Protegida
FAO- “Food and Agriculture Organization of the United Nations”
GPP- Gabinete de Planeamento e Politicas
HR- Humidade Relativa
ICMSF- “International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
INE- Instituto Nacional de Estatística
ISO- “International Organization for Standardization”
MKTTn- Caldo Muller Kauffmann Tetrionato.Novobiocina
NaCl – Cloreto de sodio
NaOH- Hidroxido de Sodio
NP – Norma Portuguesa
PCR- “Polymerase Chain Reaction”
pH- Potencial Hidrogeniónico
RAPD- “Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP -PCR- “Restriction Fragment Length Polymorphisms”
RVS -Rappaport Vassiliadis com Soja
SSCP- PCR- “Single-Stranded Conformation Polymorphisms”
TBE- “Tris-borate-EDTA”
TGA- “Tryptose Glucose Extract Agar ”
TSA- Triptona Soja Agar
TSI- “Triple Sugar Iron Agar”
UE- União Europeia
UFC- Unidade Formadora de Colónias
XLD- “Xylose Lysine Desoxycholate”
WDATCP- “Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection”
WHO- “World Health Organization”
VABpm- Valor Acrescentado Bruto Preços de Mercado
VRBD- Agar Violeta de Cristal Vermelho Neutro BÍlis Glucose

1. Introdução

A qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual. Os consumidores esperam que os alimentos que comprem e consomem sejam apetecíveis, nutritivos e ao mesmo tempo seguros. A necessidade de obter leite que reúna as condições higiénicas adequadas para a elaboração de produtos lácteos como o queijo tem vindo a gerar uma grande preocupação com o controlo dos microrganismos presentes no leite (Pfeiffer, 2004).

O processo básico de fabrico de queijos é comum a quase todos e variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação dão origem à imensa variedade conhecida – cerca de 1000 tipos, sendo que só na França se fabricam 400 deles (Perry, 2004). Devido ao elevado teor de humidade, valor de pH, e elevada manipulação durante o processo de fabrico, o queijo é extremadamente suscetível aos fenómenos bioquímicos e microbiológicos que afetam a qualidade, rendimento e vida útil (Perry, 2004).

O mercado oferece uma infinidade de produtos atendendo aos interesses específicos de cada consumidor, com preços variados. Esses consumidores buscam qualidade e produtos mais apetecíveis e prezam pela confiança de que levam o que é especificado no rótulo. No entanto, vários estudos (Di Pinto *et al.*, 2004; Mafra *et al.*, 2004; Maskova & Paulickovai, 2006) têm demonstrado que os produtos lácteos durante décadas vêm sofrendo adulterações de diferentes formas: adição de água, soro, supressão de componentes, mistura de leite de diferentes espécies e adição de espessantes, entre outros.

O leite de cabra, vaca e ovelha apresentam características físico-químicas e composicionais similares, o que impossibilita a deteção da sua mistura por testes convencionais de rotina. Para garantir a genuinidade do leite e dos queijos de cabra e de ovelha há necessidade da aplicação de testes analíticos específicos que permitam o controlo deste tipo de adulteração. Nesse intuito, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, algumas delas já bem estabelecidas e validadas, destacando-se aquelas baseadas na análise das frações proteicas do leite (Velooso *et al.*, 2002). Dentre os métodos encontrados na literatura os mais utilizados são os cromatográficos, eletroforéticos, imunológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a espectroscopia de infravermelho, que muitas vezes, além de identificarem a diferença entre os produtos, quantificam a mistura de forma confiável (Dias, Lobato & Verruma-Bernardi, 2009). A União Europeia utiliza como método de referência para detectar caseína bovina em queijos fabricados com leite cabra, ovelha e búfala a focalização isoelétrica (IEF Isoelectric focusing) da caseína γ (Regulamento CE No. 2073/2005).

1.1.História do Queijo

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra. A arte do fabrico de queijos teve o seu início num passado remotíssimo, milhares de anos antes do nascimento de Cristo. Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram, no leite e no queijo, fonte importante de sua alimentação. Na literatura, são encontradas variadas versões para explicar a sua origem, que vão desde uma versão mitológica, que cita a descoberta do queijo por Aristeu, um dos filhos de Apolo e Rei de Arcádia, até as formas mais sofisticadas de fabrico encontradas nos tempos atuais. Não se sabe com precisão a data de sua origem, mas acredita-se que tenha surgido por volta de 11.000 a.C. Achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra de 6000 a.C. Passagens bíblicas registam o queijo como um dos alimentos dessa época. Na Europa, os gregos foram os primeiros a adotá-lo nos seus cardápios, feito exclusivamente com leite de cabras e de ovelhas, animais que criavam. Entretanto, os romanos foram os responsáveis pela maior divulgação dos queijos pelo mundo na expansão do seu Império (Reed, 1983; Blom & Weréen, 2002; Perry, 2004). Elevaram o nível de importância do queijo, transformando-o de simples alimento em iguaria indispensável nas refeições dos nobres e em grandes banquetes imperiais. Os romanos apreciavam o queijo, do qual fabricavam inúmeras variedades e cujas virtudes conheciam, pois utilizavam-no na alimentação dos soldados e atletas. (O'Connor, 1993; Blom & Weréen, 2002; Perry, 2004).

Como se pode imaginar, nessa altura o queijo não passava por todas as etapas que agora passa. O queijo primitivo surgia apenas da coagulação do leite e era totalmente despromovido de soro e sal. No entanto, a partir da Idade Média, o fabrico de queijos ficaria restrita aos mosteiros católicos, com novas receitas desenvolvidas pelos seus monges. A técnica de produção do queijo começou a modernizar-se ao longo do tempo. (Reed, 1983; Perry, 2004).

Foi fundada em França, em 1267, a primeira “fruitières”, ancestral das cooperativas de lacticínios. A produção em massa de queijo teve seu início no século XIX, com a abertura da primeira fábrica de queijo nos EUA, em 1851, no estado de Nova York, porém a indústria queijeira deu os primeiros passos na Europa apenas no início do século XX, com a abertura da primeira grande queijaria em França. No entanto, e pese todo o desenvolvimento da indústria americana, só em 1874 o laboratório Chr. Hansen na Dinamarca ofereceu o primeiro coalho padronizado aos produtores de queijo (Reed, 1983; Godfrey & West, 1996; Perry, 2004).

A França foi o país que se dedicou mais à fabricação e ao consumo de queijo, permanecendo atualmente como um dos principais países produtores do mundo, ao lado de Itália, Dinamarca,

Alemanha, Suíça e Inglaterra. A autenticidade de cada produto é garantida pela regulamentação própria que cada país possui, para que os seus queijos sejam mundialmente reconhecidos (Perry, 2004).

Uma das variedades universalmente popular de queijo é o Cheddar, assim denominado em homenagem à antiga e bela vila inglesa de Cheddar, sua contribuição foi muito além da criação de uma variedade distinta de queijo. A ele foi creditado o aperfeiçoamento e a sistematização dos métodos empíricos então em uso, que se tornou uma das pedras angulares da vasta indústria de queijos (Godfrey & West, 1996).

De acordo com Perry (2004), o processo básico de fabrico de queijos é comum aos mais diferentes tipos, dependendo de variações como: origem do leite, técnicas de processamento e tempo de maturação. O comércio mundial disponibiliza aos consumidores cerca de 1000 tipos de queijos e a França fabrica 400 desses tipos.

Existem numerosos tipos de queijos, classificados de acordo com a matéria prima e suas diferentes formas de processamento, dentro dos quais encontram-se muitas variedades fabricadas com leite puro de ovelha, cabra ou vaca, assim como com mistura de leite de duas ou três espécies. Alguns dos queijos fabricados com leite cru de ovelha, cabra ou vaca possuem o estatuto de denominação de origem protegida (DOP) sendo alguns elaborados em zonas muito restringidas e com tradição de vários séculos. Em Portugal encontram-se protegidos queijos de 12 origens diferentes e modos de produção específicos (União Europeia, 2012).

1.2. Definição e classificação de queijo

É um concentrado lácteo constituído por proteínas, lípidos, hidratos de carbono, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas (Perry, 2004).

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

Esta portaria estabelece ainda a classificação dos queijos e determina os ingredientes que podem ser adicionados durante o seu fabrico.

O queijo pode ser classificado em (Portaria nº 73/90):

1.2.1. Quanto à cura:

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

1.2.2. Quanto à composição:

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

1.2.3. Quanto à consistência:

Esta classificação é feita tendo em conta a percentagem de humidade para cada tipo de queijo, conforme indica a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos queijos quanto à consistência (fonte: Portaria nº 73/90).

| Classificação | Humidade no queijo |
|----------------------|---------------------------|
| Extraduro | <50% |
| De pasta dura | De 49% a 56% |
| De pasta semidura | De 54% a 63% |
| De pasta semimole | De 61% a 69% |
| De pasta mole | > 67% |

1.2.4.Quanto à matéria gorda:

A classificação quanto a matéria gorda é feita em função da percentagem desta no extrato seco, conforme o indicado na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos queijos quanto à matéria gorda (fonte: Portaria nº 73/90).

| Classificação | Matéria gorda no extracto seco |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Muito gordo ou extragordo | > 60% |
| Gordo | De 45% a 60% |
| Meio gordo | De 25% a 45% |
| Pouco gordo | De 10% a 25% |
| Magro | <10% |

1.3. Composição nutricional do queijo

A composição do leite determina o seu valor nutritivo, sua capacidade para ser utilizada como matéria prima na elaboração de produtos lácteos e suas características físico-químicas e organoléticas. A importância nutricional dos queijos deve-se entre outros fatores a sua elevada concentração de proteínas, contribuindo significativamente ao aporte de aminoácidos.

O queijo, por manter as características do leite (que é considerado um alimento completo), e por se apresentar como uma alternativa a este, nomeadamente nos casos de intolerância à lactose, é considerado um excelente alimento. Uma pequena quantidade de queijo contém proteína e cálcio em quantidades suficientes para substituir um copo de leite, como, por exemplo, 40 gramas de queijo minas substituem um copo de leite (200 mL), em termos de proteínas e cálcio (Valsechi, 2001).

A composição nutricional dos queijos depende, em grande parte, do leite e da tecnologia utilizada. No entanto, a maioria dos queijos destaca-se pelo teor de proteínas, de minerais e oligoelementos (principalmente cálcio, zinco, potássio) e de vitaminas (principalmente A, B2, B9, B12 e D) (Pinho & Ferreira, 2006).

A composição do queijo varia de acordo com o tipo de matéria prima empregada. Leite com maior percentagem de matéria gorda, além de propiciar melhor produto, dará também maior

rendimento, pois há uma estreita relação entre a matéria gorda e a caseína, sendo esta, a base dos queijos (Pinho & Ferreira, 2006). A Tabela 3 apresenta a composição do leite de algumas espécies.

Tabela 3: Composição geral do leite de algumas espécies produtoras (Fox *et al.*, 2000).

| Espécie | Sólidos Totais | % Gordura | % Proteína | % Lactose | Cinza |
|----------------|-----------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|
| Vaca | 12,7 | 3,7 | 3,4 | 4,8 | 0,7 |
| Ovelha | 19,3 | 7,4 | 4,5 | 4,8 | 1 |
| Cabra | 12,3 | 4,5 | 2,9 | 4,1 | 0,8 |

O teor de aminoácidos essenciais das proteínas dos queijos confere-lhes um alto valor biológico e uma digestibilidade próxima de 95%. Por outras palavras, as proteínas dos queijos são absorvidas quase integralmente e fornecem ao organismo os aminoácidos necessários ao seu desenvolvimento. A caseína é a proteína predominante no queijo incluindo α – caseína, β – caseína, κ – caseína entre outras. A quantidade de hidratos de carbono é reduzida (Pinho & Ferreira, 2006).

A gordura exerce um papel preponderante na geração do flavor e textura dos queijos. Excesso de gordura origina uma coagulação mais lenta, maior período de maturação, maior rendimento, pouca resistência a ambientes desfavoráveis, enquanto que pouca gordura dá origem a um queijo com pasta dura e retarda o período de maturação. (Pinho & Ferreira, 2006).

Os lípidos dos queijos encontram-se sob a forma de emulsão, aumentando assim a sua digestibilidade. São compostos de uma mistura de ácidos gordos saturados, mas também mono e poliinsaturados. O teor de ácidos gordos trans dos queijos depende fundamentalmente do leite utilizado e da região produtora. É ainda de realçar a presença de dois ácidos gordos trans: o ácido vacénico e o ácido ruménico, os quais tem efeitos benéficos sobre a saúde como a prevenção do cancro, aterosclerose e ação imunológica (Ochoa *et al*; 2004).

O queijo é ainda um alimento rico em vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E, e K. O teor de vitaminas lipossolúveis dos queijos (A, D e E), depende do teor de lípidos. Já o teor de vitaminas hidrossolúveis varia consideravelmente dependendo do tipo de queijo (Scott, 1991).

Os sais minerais são também uma parte importante da sua constituição, sendo uma fonte importante de cálcio e fósforo. Os minerais são importantes tanto no aspeto nutricional quanto no tecnológico, onde a maioria dos minerais que são considerados ser essenciais para a dieta humana estão presentes no leite, e eles possuem um papel muito importante nas indústrias de queijo (Scott, 1991).

Existem ainda para além destes macroelementos, vários oligoelementos, presentes em quantidades mínimas ou simples vestígios, cujos teores podem variar muito, segundo as condições de produção de leite. Os principais oligoelementos, pela sua indisponibilidade na alimentação, são: zinco, ferro, iodo, molibdénio, flúor, selénio e cobalto. Fisiologicamente servem à formação e manutenção do esqueleto, bem como ao equilíbrio de muitas funções orgânicas (Valsechi, 2001; Carvalho, 2002).

Os queijos, pelas suas propriedades nutricionais, ocupam um lugar importante na alimentação humana em todas as idades mas a sua dosagem deve ser equilibrada e adequada a cada faixa etária como exemplifica a Tabela 4.

Tabela 4: Quantidade diária recomendada de queijo (fonte: Eck & Gillis, 1997, adaptado).

| Idade | Quantidade diária Recomendada de queijo (g) |
|------------------------------|--|
| Crianças de 2 a 6 anos | 20-30 |
| Crianças de 7 a 11 anos | 30 |
| Adolescentes de 12 a 15 anos | 50 |
| Adolescentes de 15 a 20 anos | 50-80 |
| Adultos | 30-50 |
| Grávidas | 50 |
| Idosos | 30 |

1.4. Aspectos microbiológicos

Em termos gerais, dentro do campo da microbiologia de alimentos, sem dúvida as contaminações microbianas dos alimentos são indesejáveis e inclusive nocivas. Este aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para microrganismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogênicos que encontram no alimento um meio propício para o desenvolvimento e até mesmo a liberação de substâncias tóxicas (Franco & Almeida, 1992).

O microbiota dos queijos é constituída por microrganismos desejáveis ou benéficos e indesejáveis ou patogênicos. A presença de microrganismos benéficos contribui para as características organolépticas, conservação e condições higieno-sanitárias do produto. A presença de microrganismos patogênicos pode ser resultante de contaminações relacionadas com higiene inadequada.

1.4.1. Microbiota benéfico

O microbiota natural benéfico do leite, compreendido por lactobacilos, estreptococos e lactococos, preserva o queijo e, em muitos casos, compete com bactérias patogênicas. Apesar de o leite poder ser uma fonte de microrganismos indesejáveis do ponto de vista de segurança microbiológica, ele também é fonte de BAL (bactérias ácido-lácticas). Estas bactérias contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do produto. Elas fermentam hidratos de carbono, produzindo ácido, e são consideradas as principais responsáveis pela acidificação do queijo, favorecendo a sua conservação. Outras atividades metabólicas destes microrganismos também permitem aumentar a sua vida útil. (Medici *et al.*, 2004).

As BAL são microrganismos Gram-positivos, não esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (Holzapfel *et al.*, 2001).

As primeiras definições de bactérias lácticas baseavam-se na capacidade de fermentação e coagulação do leite por esse grupo de microrganismos, incluindo também os coliformes. A descrição de *Lactobacillus* por Beijerinck em 1901 como bactérias Gram-positivas separou os coliformes das bactérias lácticas. Atualmente as BAL associadas a alimentos incluem espécies do género *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Beresford *et al.*, 2001). Desses 11 gêneros existentes, apenas cinco são comumente encontrados em queijos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (Fox *et al.*, 2000).

O interesse pela presença dos lactobacilos na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff – Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses microrganismos para a bacterioprevenção e bacterioterapia (Stiles & Holzapfel, 1997).

O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas é um foco importante das indústrias de alimentos e, geralmente, a produção de alimentos contendo probióticos específicos, com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida útil, é um desafio tecnológico (Kourkoutas *et al.*, 2005). Vários trabalhos propuseram que a dose mínima diária de culturas probióticas considerada terapêutica corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 6 a 7 log UFC/g (Hoier *et al.*, 1999 ; Talwalkar & Kailasapathy 2004). A principal função das BAL nos alimentos é a acidificação a um pH próximo de 4, que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, permitindo que o período de conservação dos produtos fermentados seja maior que o dos produtos onde a matéria-prima não é fermentada (Piard *et al.*, 1999).

Dentre as várias características associadas às bactérias lácticas, particularmente à espécie *Lactobacillus casei*, destaca-se, também, o fato delas possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (Schwenninger *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2007).

Os fermentos lácticos são compostos de BAL, comumente chamadas de culturas starters, e de microrganismos secundários que também são denominados de culturas adjuvantes (Carvalho, 2007). As BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante a elaboração do queijo e contribuem para o processo de cura, enquanto que os microrganismos secundários geralmente estão envolvidos na definição das características sensoriais do queijo (Beresford *et al.*, 2001; Cavalcante *et al.*, 2007). As BAL “non starter” são constituídas por lactobacilos mesófilos e *Pediococcus* spp., presentes na maioria dos queijos curados. Não pertencem à cultura de arranque pois, em regra, não são capazes de se multiplicar no leite e não produzem uma quantidade de ácido que contribua para a acidificação inicial do queijo (Cogan *et al.*, 1997).

1.4.2. Microbiota deteriorativo e Microrganismos patogénicos

1.4.2.1. Microbiota deteriorativo

O leite é um excelente meio de cultura para os microrganismos devido às suas características intrínsecas como elevada atividade de água, pH próximo do neutro e riqueza de nutrientes. As substâncias inibitórias para os microrganismos, como lactoperoxidase e aglutininas, presentes no leite cru recém-ordenhado são inativadas rapidamente. De acordo com Silva Junior (1992) e Peresi *et al.*, (2001), uma temperatura inadequada durante a preparação e conservação dos alimentos, a contaminação cruzada, equipamentos e utensílios higienizados inadequadamente e a manipulação por pessoas infetadas (assintomático ou não) são os fatores mais incriminados no processo de contaminação alimentar, principalmente queijos, cuja contaminação microbiana assume destacada relevância em saúde pública.

1.4.2.1.1. Microrganismos totais a 30°C

A contagem dos microrganismos a 30°C é muito importante na microbiologia alimentar uma vez que pode ser utilizada para avaliar a qualidade higiénica, para determinar a aceitabilidade organolética, para verificar a aplicação de boas práticas de fabrico e ainda permite ao processador alimentar obter informações sobre matérias-primas, condições de processamento, de armazenamento e de manipulação dos alimentos (Downes & Ito, 2001).

A determinação dos microrganismos aeróbios totais a 30°C baseia-se no pressuposto que cada célula, na presença de nutrientes, se replica e forma uma colónia visível. Embora não seja uma medida da população bacteriana total, nem permita diferenciar por tipo de microrganismo, é uma determinação genérica para microrganismos como bactérias, bolores e leveduras, que crescem a temperaturas intermédias e que se desenvolvem de forma aeróbia (Downes & Ito, 2001).

Contagens elevadas de microrganismos totais a 30°C pode ser uma indicação de higienizações insuficientes ou problemas ao nível do controlo dos processos de fabrico ou das matérias primas. Certos produtos têm naturalmente contagens elevadas, como é o caso dos produtos fermentados, no entanto, baixas contagens não é uma garantia de que as amostras se encontram livres de microrganismos potencialmente patogénicos por isso os resultados deste parâmetro devem ser complementados com outras determinações (Downes & Ito, 2001; Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection [WDATCP], 2002).

1.4.2.1.2. Enterobacteriaceas

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas, algumas pertencem ao microbiota intestinal normal de humanos e animais, como a *Escherichia coli*, enquanto outras existem no solo ou na água, podendo estar implicadas em vários processos patogénicos, como é o caso dos membros dos géneros *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Assim, a utilização das enterobacteriaceas como indicadores das condições higieno-sanitárias em alimentos é praticada há anos. Dos agentes bacterianos, as enterobacteriaceas são internacionalmente considerados microrganismos indicadores da segurança microbiológica de alimentos (Bonassi, 1984; Frezier & Westhoff, 1993).

Escherichia coli, é considerado o principal representante deste grupo microbiano e, segundo Forsythe (2002), esta bactéria desenvolve-se em atividade água mínima de 0,935, pH em torno de 4,0 e 9,0 e faixa de temperatura de 7 a 49,4°C; sendo considerada indicadora de contaminação fecal em alimentos processados.

1.4.2.2. Microrganismos Patogénicos

Devido à sua rica composição em nutrientes, os produtos lácteos podem apresentar contaminações por microrganismos, inclusive patogénicos. A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, porém as principais fontes de contaminação serão os equipamentos utilizados durante a manipulação, o transporte, o processamento e o armazenamento. A qualidade de todos os produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima. Dentre as bactérias que podem crescer em queijos destacam-se, principalmente, os coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium* spp. *Listeria*, e algumas espécies do género *Bacillus*.

Os queijos podem apresentar diferenças significativas na contaminação por patógenos, em decorrência de sua presença no leite cru usado na produção e subsequente sobrevivência durante o processo de fabrico (Donnelly, 2004).

Alternativamente, bactérias patogénicas podem contaminar o queijo pós-processamento, se as condições de higiene na linha de produção não forem suficientes para prevenir a recontaminação (Little *et al.*, 2008).

Historicamente, surtos de infeções têm sido associados ao consumo de queijos e os microrganismos predominantemente envolvidos incluem *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (VTEC) e *Staphylococcus aureus* (Pintado *et al.*, 2008).

1.4.2.2.1. *Listeria*

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogénica, aeróbia, Gram positiva não esporulada, que provoca listeriose em humanos, doença com um período de incubação de 5 a 30 dias. Esta bactéria desde a década de 80 tem sido relacionada com doenças de origem alimentar, sendo atualmente, uma preocupação para a saúde pública. A sua importância está relacionada com a sua ampla distribuição no meio ambiente e suas características fisiológicas como a resistência a ambientes ácidos e com cloreto de sódio, a capacidade de sobreviver por longos períodos em condições adversas, de criar biofilmes e aderir a superfícies, o que torna *L. monocytogenes* um fator preocupante também para a indústria alimentar (Martin *et al.*, 2010)

As bactérias do género *Listeria* toleram altas concentrações de cloreto de sódio, 10-12%, sobrevivendo a 25,5% de NaCl (Donnelly, 2001). São pequenos bastonetes Gram-positivos, não esporulados nem capsulados, anaeróbios facultativos e móveis. Em meio sólido a 20-25⁰C apresentam mobilidade típica de guarda chuva (Bille & Rocourt, 2003). Crescem a uma temperatura de 0,4 a 50⁰C (Lou & Yousef, 1999) com o crescimento ótimo a 30-37⁰C e um pH de 5,6 a 9,6. Lou & Yousef (1999) constatou seu desenvolvimento a um pH abaixo de 4,0. A atividade de água ótima é superior a 0,97.

Listeria monocytogenes é um importante microrganismo patogénico de origem alimentar, uma vez que a presença desse microrganismo em alimentos pode causar listeriose. A listeriose causa gastrite e, em casos mais graves, provoca septicemia, meningite e meningoencefalite. Surtos de listeriose ocorrem sobretudo em grupos de risco bem definidos (ex: idosos, grávidas, fetos e pessoas imunodeprimidas), podendo levar à morte em 30% dos casos (Maia, 2009). A indústria dos laticínios, principalmente a dos queijos, tem sido associada a casos e surtos de listeriose em vários países durante as três últimas décadas. A contaminação dos queijos por *L. monocytogenes* tem sido associada, principalmente, ao leite usado no fabrico (cru ou pasteurizado inadequadamente) ou ao ambiente de processamento tendo assim, como principais vias de introdução o leite cru, o ar, os utensílios e equipamentos contaminados, os pisos e drenos da sala de produção, as prateleiras de madeira da sala de maturação, as botas e roupas dos trabalhadores, o sistema de ventilação, a água condensada e os carros de transporte e, ainda, operários ou visitantes doentes (Menendez *et al.*, 1997; Swaminathan, 2001).

Embora o grau de virulência possa variar entre diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, considera-se que todas as estirpes isoladas a partir de alimentos são potencialmente virulentas. Não está ainda determinada a dose mínima infecciosa para humanos e, dependendo da estirpe e do estado imunitário do hospedeiro, esta dose pode variar. Alguns dados epidemiológicos

sugerem que seja elevada. De acordo com Vázquez-Boland *et al.* (2001), os alimentos implicados nalguns surtos apresentam concentrações superiores a 10^3 células de *L. monocytogenes* por grama de alimento. O mesmo autor refere ainda que o consumo de alimentos com concentrações de *L. monocytogenes* inferiores a 10^2 células por grama representa um baixo risco para o consumidor, no entanto, podem ser suficientes para causar toxinfecção em grupos de risco. Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por essa bactéria, principalmente os de alta e media humidade.

1.4.2.2.2. *Staphylococcus*

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, catalase positivo pertencentes à família *Staphylococcaceae* e anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias. Os estafilococos tem um diâmetro aproximado de 0,8 – 1,0 μm e por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos em microscópios aparecem na forma de cachos de uva. Estes microrganismos não formam esporos, contudo, são resistentes ao dessecação, sendo disseminados por partículas de poeira presentes no ar e nas superfícies (Madigan, 2004; Franco & Landgraf, 2005). As suas colónias apresentam uma coloração amarelada em meios ricos e desenvolvidas a 37°C. São anaeróbios facultativos, e sobrevivem a concentrações de NaCl entre 10% a 20%. Todas as estirpes de *S. aureus* são catalase positiva e oxidase negativa (Baird-Parker, 1990; Bowen & Henning, 1994; Holt *et al.*; 1994;). *Staphylococcus* coagulase positivos multiplicam-se a temperaturas compreendidas entre 7,0 e 47,8°C, com temperatura ótima de 37°C; sendo as toxinas produzidas entre 10 e 46°C, com temperatura ótima de 40 a 45°C. A má utilização da temperatura durante o processo de transporte e conservação de alimentos pode contribuir para a multiplicação de microrganismos patogénicos, como os *Staphylococcus* coagulase positivos, sendo um importante fator no controle de qualidade de produtos alimentícios (Jay 1994; Fernandes *et al.*, 2006). Os estafilococos são ubíquos no meio ambiente e existem no ar, água, esgotos, poeira, superfícies ambientais, humanos e animais. Os principais veículos de contaminação cruzada dos alimentos por *S. aureus* são as narinas e as mãos (European Commission, 2003; Pereira *et al.*, 2000).

Embora *S. aureus* cresça em meios de cultura sem NaCl, pode multiplicar-se em concentrações de 7 a 10%, sendo que algumas estirpes podem crescer em 9 até 20% de sal. A concentração máxima que permite o crescimento depende de outros parâmetros, como temperatura, pH, atividade de água (a_w) e potencial de oxi-redução. Considerando o pH, *S.*

aureus pode multiplicar-se entre 4,0 e 9,8, mas sua faixa ótima está entre 6,0 e 7,0. Em relação à atividade de água (a_w) o valor mínimo para crescimento é 0,86 (Jay, 2005). *S. aureus* coagulase-positiva produz a enzima coagulase que constitui uns dos fatores de virulência pelo fato de coagularem o plasma humano, tornando-os um importante patógeno associado a infecções em humanos (Jawetz *et al.*, 1998).

Após o consumo dos alimentos contaminados por *S. aureus*, os sintomas aparecem de 1 a 6 horas e incluem náusea intensa, vômito e diarreia moderada, normalmente sem febre. Os sintomas desaparecem em menos de 12 horas e, embora sejam muito desagradáveis, a doença raramente é fatal. O primeiro caso de intoxicação alimentar associada a *S. aureus*, foi registado em 1884 por Vaughan e Sternberg. Estes investigadores descobriram que o surto tinha sido motivado pela ingestão de queijo contaminado por organismos esféricos designados na época de “micrococos” só trinta anos mais tarde, em 1914, demonstrou-se claramente a intoxicação alimentar estafilocócica após consumo de leite sem refrigeração proveniente de uma vaca com mastite estafilocócica. Este tipo de intoxicação é uma das mais comuns, sendo de ocorrência mundial (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 1996; Ortega *et al.*, 2010).

1.4.2.2. 3. *Salmonella*

As bactérias do género *Salmonella* são patogénicas e responsáveis por um elevado número de surtos de toxinfecções alimentares. *Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado por longo período de tempo (Modi *et al.*, 2001). A contaminação, deste e outros produtos, ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação incorretas ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. A sua presença no alimento implica a rejeição de todo o lote de produto.

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, constituída por bacilos Gram negativos não esporulados, anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e capazes de utilizar o citrato como fonte de carbono. A maioria é móvel, apresentando flagelos peritricos, exceções feitas à *S. pullorum* e à *S. paratyphi* (Franco & Landgraff, 2008).

Salmonella é um importante microrganismo patogénico de origem alimentar, a sua presença em alimentos pode causar salmonelose, uma doença que provoca diarreia, dor abdominal e febre. Estas manifestações iniciam-se de 12 a 72 horas após a infeção. A doença dura de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas recupera sem tratamento. No entanto, em algumas pessoas

infetadas, a diarreia pode ser severa a ponto de ser necessária a hospitalização devido à desidratação. Os idosos, crianças e pessoas imunocomprometidas são os grupos mais prováveis de ter a forma mais severa da doença. Uma das complicações mais graves é a difusão da infecção para o sangue e daí para outros tecidos, provocando septicemia (Germano & Germano, 2001).

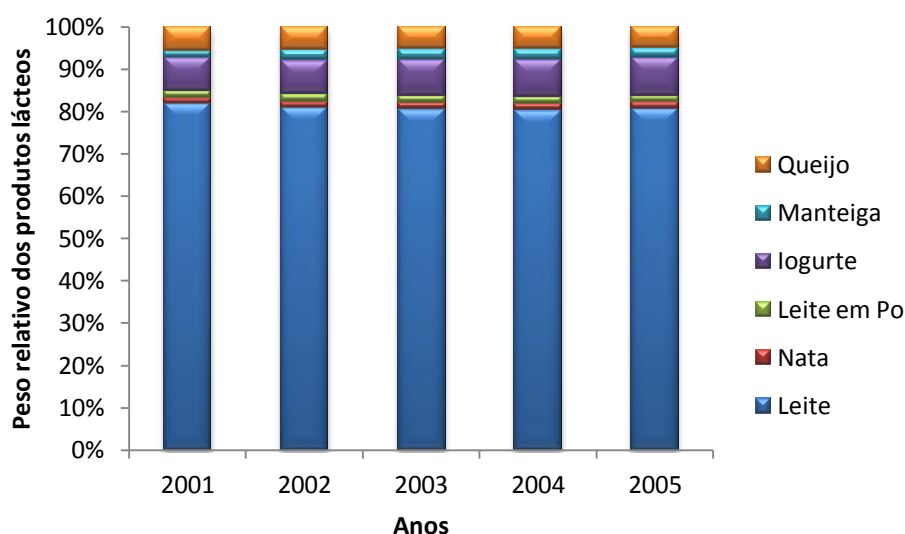
1.5. Produção de queijo em Portugal

A maior quantidade do leite de vaca produzido atualmente na União Europeia (UE) é destinada à produção de queijo. Em 2010 produziram-se 136,1 milhões de toneladas de leite, das quais 36,1% foram convertidas em queijo, 28,7% em manteiga e 11,5% em leite para consumo (União Europeia, 2011).

Em 2005, a indústria de lacticínios representava, em Portugal cerca de 11% do Valor Acrescentado Bruto Preços de Mercado (VABpm) total gerado pela indústria agro-alimentar e bebidas. No subsector dos queijos, a indústria encontrava-se muito suprimida, coexistindo empresas de grandes e pequenas dimensões, muitas delas com fracos recursos tecnológicos e com baixo nível de diferenciação da produção (Gabinete de planeamento e politicass [GPP], 2007).

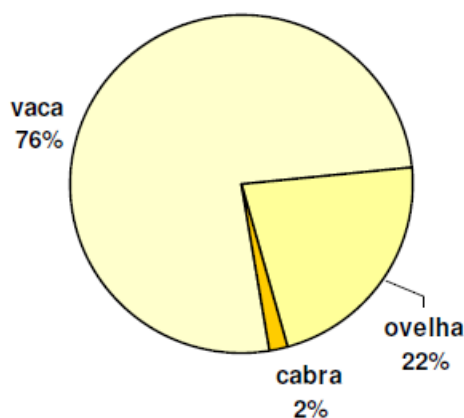
A maior parte do leite recolhido e destinada ao consumo *in natura*, leite fermentado e produção de queijo, apresentaram valores estáveis no período de 2001 a 2005, conforme a Figura 1.

Figura 1: Peso relativo dos produtos lácteos obtidos a partir do leite recolhido (Fonte: GPP, 2007).



O sector dos lacticínios, em 2007, representava cerca de 11,5% da produção agrícola nacional, com uma oferta crescente de leite e produtos lácteos, e uma melhoria global da qualidade da matéria-prima e dos produtos transformados. No subsector do queijo, existia um número muito significativo de empresas de média/pequena dimensão, com produção média anual de 13,6 t, muitas das quais relacionadas com a produção de queijos de ovelha e cabra. Os leites de ovelha e de cabra são utilizados, quase integralmente, na produção de queijo, quer em mistura com leite de vaca quer em uso exclusivo, sendo o seu peso relativo significativo face ao volume total de queijo produzido (Figura 2) (GPP, 2007).

Figura 2: Peso da produção de queijo por espécie no ano 2005 (Fonte: GPP, 2007).

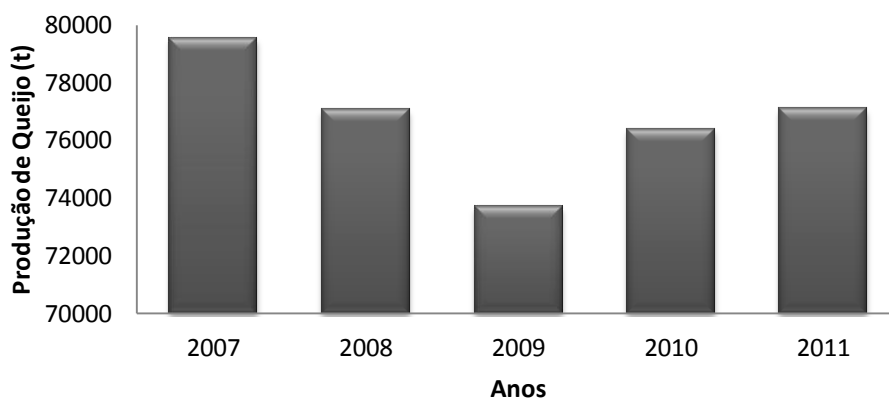


De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), a produção total de queijo registou uma redução de cerca de 3%, no ano de 2008, face ao ano anterior, devido aos decréscimos da produção de queijo de vaca e ovelha. A produção destes queijos foi, aproximadamente, 4% inferior, correspondendo a 56 mil toneladas e 15 mil toneladas, respetivamente. Em relação ao queijo de mistura e de cabra, verificou-se um aumento do volume produzido, cerca de 5 mil e 1,6 mil toneladas, respetivamente (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2009).

Em 2008, o volume da produção do leite de vaca foi de 1962 milhões de litros, representado um aumento de 2,7%, relativamente ao ano transacto. As produções de leite de ovelha e de cabra foram de 89 milhões de litros e 27 milhões de litros, respetivamente, o que, comparativamente a 2007, reflete uma quebra de cerca de 4% para o leite de ovelha e uma variação pouco significativa (+1%) para o leite de cabra produzido (INE, 2009).

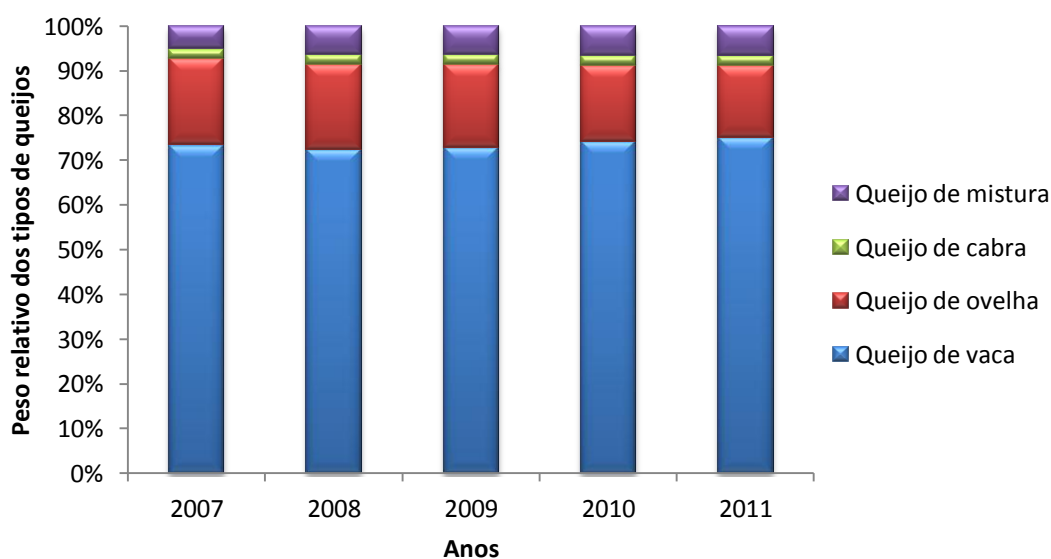
Dados de 2011, mostram um aumento na produção de queijo, devido à aposta feita pelos produtores na certificação da qualificação e valorização no mercado dos produtos tradicionais (Figura 3).

Figura 3: Produção de queijo (t) no período de 2007 a 2011 (Fonte: INE 2012a).



No período de 2007 a 2011, o queijo de vaca apresentou maior produção, mas teve um decréscimo de aproximadamente 3%, que se traduziu no aumento da produção de queijo de ovelha. Quanto aos queijos de cabra e mistura, apresentaram produções inferiores às dos queijos de vaca e ovelha, mas constantes no período considerado (Figura 4).

Figura 4: Produção de queijo, por tipo de queijo, no período de 2007 a 2011 (Fonte: INE, 2012a).

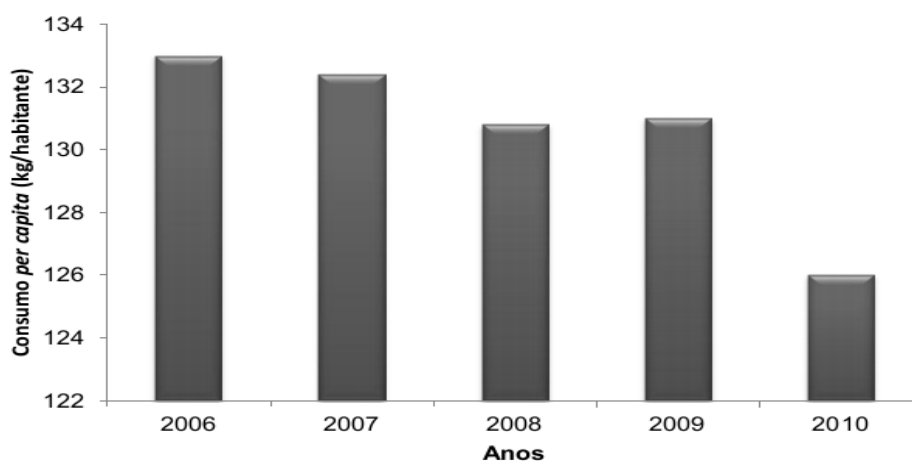


1.6. Consumo de queijo em Portugal

De acordo com dados do INE, observa-se, desde 2006, uma diminuição do consumo *per capita* de leite e produtos lácteos, tendo sido essa diminuição particularmente expressiva no ano de 2010 (Figura 5).

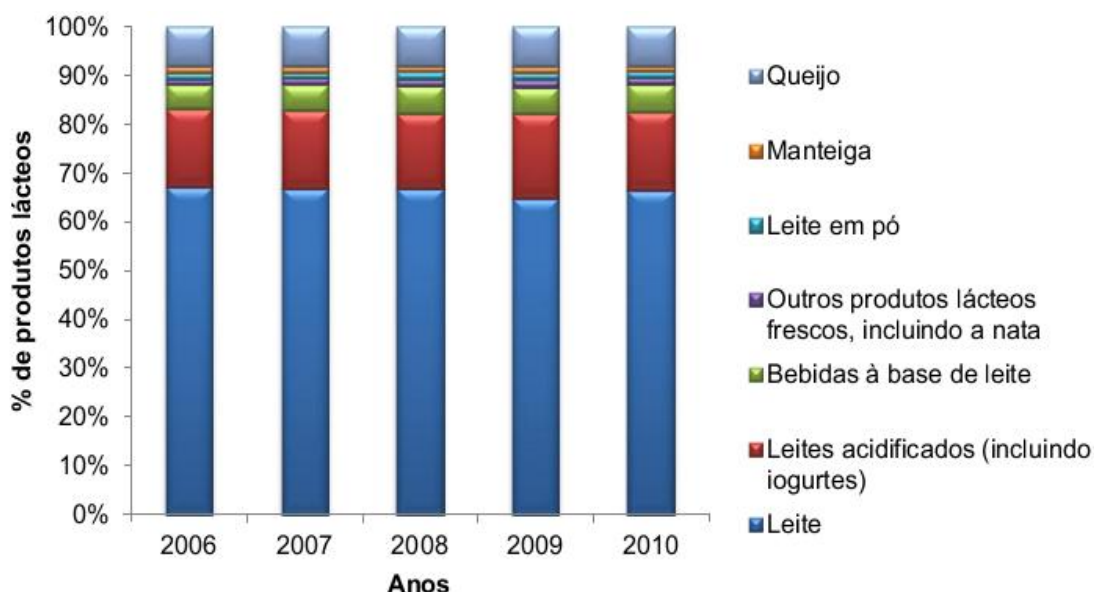
Portugal apresentava, em 2004, um consumo *per capita* semelhante aos do Reino Unido e Irlanda, que são aqueles que têm um menor consumo de queijo, exibindo valores inferiores a 10 kg/habitante (Nunes, 2009).

Figura 5: Consumo humano de leite e produtos lácteos *per capita* no período de 2006 a 2010 (Fonte: INE, 2012b).



Tendo em conta o consumo de leite e produtos lácteos, observa-se que o leite continua a ser o género alimentício com maior importância no contexto do consumo *per capita*, devido ao seu preço no mercado, com um peso relativo aproximadamente de 70%. Quanto ao queijo, representa cerca de 10% do peso relativo do consumo de produtos lácteos, apresentando um valor constante ao longo do tempo (Figura 6).

Figura 6: Peso relativo do consumo de leite e produtos lácteos *per capita* (kg/habitante) (Fonte: INE, 2012b).



No grupo do leite e derivados, o leite representava em 2003 cerca de 70% do consumo *per capita* diário total, seguido dos iogurtes (14%) e do queijo (7%). No entanto, entre 1990 e 2003, assistiu-se ao grande aumento do consumo de iogurtes, que aumentou 1,5 vezes no período em análise, seguido do consumo de queijo que atingiu em 2003 as 24,4 gramas diárias *per capita*. (GPP, 2007).

Quando comparado com o nível do consumo na União Europeia, o consumo de queijo tem estagnado nos últimos anos, essencialmente, devido à mudança de hábitos alimentares por parte dos consumidores. (GPP, 2007).

1.7. Adulteração

Por razões económicas e de saúde pública é cada vez mais importante que seja efetuado um rigoroso controlo dos alimentos, para que deste modo sejam detectadas fraudes. De entre as referidas fraudes, podem-se destacar as relativas aos produtos com rotulagem inapropriada (não correspondentes à realidade comercial) e aos produtos de qualidade inferior à esperada. A autenticação dos alimentos é então um problema a nível global. Os produtos lácteos durante décadas vêm sofrendo adulterações de diferentes formas, incluindo adição de leite de vaca ao leite de ovelha e/ou cabra para a preparação de queijo ou incorporação de proteínas do soro na produção de queijos. A maioria dos queijos são produzidas com leite de vaca, enquanto que os queijos puros de ovelha e cabra são consideradas especialidades com propriedades sensoriais

características. As flutuações na disponibilidade de leite de espécies diferentes da bovina, e o preço mais elevado em comparação ao leite de vaca, incentivam a adulteração desses produtos. (Beer *et al.*, 1996).

São considerados matérias-primas ou produtos fraudados aqueles que apresentem “modificações espontâneas ou propositadas de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, ou sua composição intrínseca, comprometendo seu valor nutritivo” (Evangelista, 1989). Assim, o produto pode ser considerado adulterado quando tenha sido empregada uma substância de qualquer qualidade, tipo ou espécie diferente das expressas na formulação original.

Diferentes métodos podem ser utilizados para avaliar a adulteração dos produtos alimentares, das quais se destaca a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase). Esta técnica baseia-se na análise de DNA presente na amostra em estudo, amplificando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias ou β - caseína (Reale *et al.*, 2008).

Essa técnica apresenta sensibilidade elevada, de acordo com Feligini *et al.*, (2005), ao nível de 0,5% de mistura de espécies, podendo chegar a 0,1% de limite de detecção; para Masková & Paulicková (2006) essa sensibilidade não ultrapassa o limite de 1% de mistura. A sua alta sensibilidade e especificidade na análise de adulterações compensam o preço alto da técnica, sendo amplamente utilizada na Europa.

Variantes desta técnica podem ser utilizadas na ampliação de diferentes fragmentos de DNA-alvo como: Multiplex-PCR e Simplex-PCR (Bottero *et al.*, 2003), SSCP-PCR (Single-Stranded Conformation Polymorphisms) (Plath & Einspanier, 1997; Rea *et al.*, 2001) Duplex-PCR, SYBR-Green Real-Time-PCR e RFLP -PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Bania *et al.*, 2001; Bottero *et al.*, 2003). Para análise dos produtos de amplificação obtidos utiliza-se a técnica de eletroforese, mais comumente com gel de agarose (Plath & Einspanier 1997; López *et al.*, 2005) e em alguns casos gel de poliacrilamina (Plath & Einspanier, 1997).

1.8. Objetivos do trabalho

- ❖ Avaliar a qualidade microbiológica e fisico-química de alguns queijos comercializados em Portugal.
- ❖ Verificar a autenticidade dos rótulos dos queijos, relativamente ao tipo de leite utilizado no seu fabrico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras em estudo

Foram analisadas 15 amostras, dos quais 12 de queijos(dois queijos de vaca, dois de ovelha, dois de cabra, um de vaca-ovelha, dois de vaca-cabra, dois de cabra-ovelha e um de vaca-cabra-ovelha), e três amostras de leite (um de vaca, um de cabra e um de ovelha). Os queijos foram adquiridos em supermercados da região de Lisboa e os leites facultados pela empresa JD Lacticínios Lda. Todas as amostras adquiridas no comércio encontravam-se dentro do prazo de validade estipulada nas embalagens (Tabela 5).

Tabela 5: Queijos analisados (informação disponível no rótulo).

| Identificação da amostra | Tipo de Queijo | Pasteurização | Lote | Validade |
|--------------------------|----------------------|---------------|---------|------------|
| Q1 | Cabra | Sim | 010312 | |
| Q2 | Vaca | Sim | | |
| Q3 | Ovelha | Não | 209 | 31/07/2012 |
| Q4 | Vaca e cabra | Sim | 5600M36 | 04/2012 |
| Q5 | Vaca e ovelha | Sim | 52565PA | 8/2012 |
| Q6 | Ovelha e cabra | Não | | |
| Q7 | Vaca, cabra e ovelha | Sim | | |
| Q8 | Cabra | Sim | 27 | 31/10/2012 |
| Q9 | Ovelha | Não | 8870 | 08/08/2012 |
| Q10 | Vaca | Sim | | |
| Q11 | Ovelha e cabra | Não | | |
| Q12 | Vaca e cabra | Sim | | |

2.2. Análises microbiológicas

2.2.1. Preparação das amostras (ISO 6887-2:2003)

A preparação das amostras foi efetuada, de acordo com a Norma ISO 6887-2.

De cada amostra foram retiradas, assepticamente, porções aleatórias, de diversos locais, para um saco esterilizado de “Stomacher” perfazendo 25 g. De seguida adicionaram-se 225 ml de APT (agua peptonada tamponada, Panreac, Espanha), tendo-se procedido à homogeneização durante cerca de 2 minutos, no homogeneizador Stomacher Lab-Blender 400 a fim de obter-se a suspensão inicial (diluição 10^{-1}).

Paralelamente, faz-se o mesmo com outros 25 g de amostra, a que se adicionaram 225 ml de Fraser I (Scharlau, Espanha) (ver ponto 2.2.3.7.) para pesquisa de *Listeria Monocytogenes*

2.2.2. Preparação das diluições (NP 3005:1985)

As diluições decimais foram realizadas conforme a técnica descrita na NP 3005:1985.

Assim, foi retirada 1 ml de suspensão inicial e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 ml de triptona sal (Scharlau, Espanha) obtendo-se a diluição 10^{-2} e homogeneizou-se no vórtex. Procede-se sucessivamente até às diluições consideradas necessárias.

2.2.3. Análises microbiológicas efetuadas

2.2.3.1. Contagem de microrganismos totais a 30°C (Norma ISO 4833:2003)

Foram tomadas, a partir das diluições decimais, alíquotas de 1,0 ml de inóculo e semeadas por incorporação em meio de cultura TGA (*Tryptose Glucose Extract Agar*) (Scharlau, Espanha), As placas foram homogeneizadas e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas em aerobiose. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.

2.2.3.2. Contagem de *Enterobactereacea* (Norma ISO 21528-2:2004)

Como descrito na ISO 21528-2:2004, semeou-se a partir das diferentes diluições decimais, por incorporação, 1ml de inóculo em meio de cultura VRBD (agar violeta de cristal vermelho neutro bÍlis glucose, Scharlau, Espanha). A contagem das colónias características (coloração

rosa a vermelha, com ou sem halo de precipitação de sais biliares) foi efetuada após incubação a 37°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

2.2.3.3. Contagem de *Escherichia coli* (NP 4396:2002)

Foi efetuada a sementeira por incorporação de 1 ml de inóculo de cada uma das diluições em meio de cultura Tergitol (com peptona, tergitol e substrato cromogénico, Biokar Diagnostics, França). A contagem de colónias características (coloração azul turquesa), foi efectuada após incubação a 44°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

2.2.3.4. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (Norma ISO 688-2:1999)

Utilizou-se o meio agar Baird Parker (Scharlau, Espanha), depositando-se 0,1 ml da diluição, sobre a superfície do agar solidificado. Com o auxílio de um espalhador, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio e as placas foram incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas as placas contendo colónias típicas: negras, lisas e pequenas, circundadas por zona opaca e/ou halo transparente. Em seguida, 10% das colónias típicas de cada placa que apresentou mais de 50 colónias, foram inoculadas em tubos contendo 1 ml de caldo infusão cérebro coração (BHI), incubando-se a 37°C, por 24 horas. A partir da cultura desenvolvida em BHI, realizou-se a prova de coagulase com plasma de coelho liofilizado, que consistiu em transferir 0,1 ml do inóculo para um tubo de ensaio e adicionar 0,1 ml do plasma de coelho e incubar a 37°C durante 4 horas. Considerou-se como positivo a formação do coágulo no fundo do tubo.

2.2.3.5. Contagem de Bolores e Leveduras (NP 3277-1, 1987)

Foram tomadas, a partir das diluições decimais, alíquotas de 0,2 mL de inóculo e semeadas por espalhamento com ajuda de um semeador em 5 placas com meio de Rose Bengal (Scharlau, Espanha), perfazendo um total de 1 ml de inóculo. As placas foram incubadas a 25°C durante 120 horas e os resultados expressos em UFC/g.

2.2.3.6. Pesquisa de *Salmonella* spp. (Norma ISO 6579:2002)

Os sacos de Stomacher com a suspensão-inicial foram incubados em estufa a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, foram transferidas de cada amostra 1 ml do caldo de pré-enriquecimento para um tubo de ensaio contendo 10 ml de MKTTn (caldo Muller Kauffmann tetrionato.novobiocina, Scharlau, Espanha) e incubou-se a 37°C durante 24 horas; noutro tubo de ensaio contendo 10 ml de caldo RVS (Rappaport Vassiliadis com soja, Scharlau, Espanha) adicionou-se 0,1 ml do caldo de pré-enriquecimento e incubou-se a 42°C por 24 horas. Do crescimento nos meios de enriquecimento seletivo semeou-se por estria em placas de Hektoen enteric agar, (Oxoid Inglaterra) e de XLD (*Xylose Lysine Desoxycholate* - Scharlau, Espanha).

Numa placa colocou-se o inóculo proveniente do RVS e na outra placa o inóculo proveniente do MKTT. Incubou-se a 37°C durante 24 horas.

As colónias típicas (Meio XLD – colónias vermelhas, transparentes e com halo negro, Meio Hektoen – colónias verdes com ou sem centro negro) foram repicadas para TSI em bisel, por picada central e estria na rampa. Incubou-se a 37°C durante 24 horas.

Considerou-se um resultado positivo sempre que se observou fundo vermelho, bisel amarelo, produção ou não de gás.

2.2.3.7. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (Norma ISO 11290-1:1995)

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo a Norma ISO 11290-1:1995. Os 25 g de amostra, referidos no ponto 2.2.1. a que foram adicionados 225 ml de Fraser I (meio de enriquecimento seletivo primário, Scharlau, Espanha), foram homogeneizados no “Stomacher” e incubado a 30°C durante 24 horas, sendo depois recolhido do saco de “Stomacher” 1 ml da suspensão para um tubo de ensaio com 10 ml de Fraser II (meio de enriquecimento seletivo secundário, Scharlau, Espanha) e incubou-se durante 24 horas a 37°C; com uma ansa retirou-se um inóculo da suspensão inicial (Fraser I) e semeou-se por esgotamento na superfície do meio de cultura seletivo OXFORD (Scharlau, Espanha), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte retirou-se do tubo com Fraser II nova amostra com uma ansa e semeou-se por esgotamento em placa com meio OXFORD e incubou-se a 37°C durante 24 horas.

No caso de surgirem colónias suspeitas (negras com halo negro), repicaram-se colónias isoladas para meio de cultura TSA (Tripton Soja Agar, Scharlau, Espanha), que se incubou a 37°C durante 24 horas; para confirmação da identificação presuntiva, as colónias suspeitas foram observadas em transluminescência com lâmpada de Henry.

2.3. Análises físico-químicas

No queijo determinou-se a atividade de água (a_w), pH e cloretos enquanto no leite as análises químicas incidiram sobre a determinação da proteína, extrato seco, gordura, extrato seco isento de gordura e densidade.

As amostras do queijo foram homogeneizadas com a casca na picadora Moulinex tipo D56.

2.3.1. Determinação de a_w

A atividade de água foi determinada no Higroscópio da Rotronic Hygroskop DT com banho termostático SBS MOD BI-22 previamente calibrado com ampolas de humidade relativa (HR) conhecida, 0,5% HR Rotronic Art. EA-50-SCS e 80% HR Rotronic Art EA-80-SCS. A calibração foi posteriormente confirmada utilizando uma ampola de 50% HR Rotronic Art. EA-00-SCS 0,5%.

Foi colocada uma amostra do queijo no copo de poliestireno Ref.PS 14 que se introduziu na estação de medida WA14TH. A leitura foi feita a $23 \pm 0,5$ °C.

2.3.2. Medição do pH

Foi efetuado no aparelho HI 9025 da HANNA Instruments previamente calibrado com soluções padrão pH=4 e pH=7. A medição do pH do queijo foi realizada por introdução direta do eletrodo no produto.

2.3.3. Determinação de Cloretos - Método de Charpentier-Volhard

Pesagem de 10 g da amostra seguido de extração dos cloretos por meio de água quente e precipitação destes por um excesso de nitrato de prata. Titulação do excesso de nitrato de prata com tiocianato de potássio em presença de alumínio férrico como indicador. Expressou-se o resultado em percentagem de massa de cloreto de sódio (%NaCl).

2.3.4. Determinação de Cinza - Método de Incineração (NP 477: 1983)

Evaporação de 25 ml de leite à secura em banho de água Memmert W350T. Carbonização da matéria orgânica (chama) seguida de incineração em mufla Hobersal JB20 a 450°C. Pesagem do resíduo mineral obtido.

2.3.5. Determinação de Proteína Total – Método de Kjeldahl (NP 1986: 1991)

Baseou-se no método de Kjeldahl que consiste na mineralização da amostra com ácido sulfúrico, em presença de um catalisador à base de cobre e selênio, para a digestão até que o carbono e o hidrogénio sejam oxidados. O azoto da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amónia. Alcalinização dos produtos da reação adicionando-se NaOH concentrado, destilação e titulação do amoníaco libertado para quantificação do teor de azoto total da amostra.

O teor de proteína bruta é determinado multiplicando o teor de azoto total pelo fator 6,38.

2.3.6. Determinação de Gorduras – Método de Gerber (NP 469:2002)

O método de Gerber é efetuado em butirómetro, com utilização de uma hidrólise ácida para a digestão da proteína com ácido sulfúrico, seguida de separação da matéria gorda do leite por centrifugação e utilização de álcool amílico. Esse método extrai a gordura que está presente na forma de emulsão cercada por um filme de proteína e esta é libertada após a adição de ácido sulfúrico e álcool amílico, que facilita a separação da gordura e reduz o efeito de carbonização do ácido sulfúrico sobre a gordura. Leitura direta na escala do butirómetro.

2.3.7. Determinação de Densidade (NP 474: 1983)

A determinação da densidade foi feita com um lactodensímetro Quexenne Schneider &Co, SA à temperatura de 20°C.

2.3.8. Determinação de Extrato seco isento de gordura(NP 475: 1983)

A determinação do extrato seco isento de gordura foi efetuado por método indireto, ou seja, por cálculo., recorrendo ao calculador de Ackerman Schneider &Co, SA. Recorrendo aos valores de densidade e de gordura, os quais utilizados em conjunto e aplicando estes valores num calculador de Ackerman, podemos obter o extrato seco total. Este calculador é constituído por dois discos de diferentes tamanhos justapostos. Num dos discos estão escritos os valores de densidade a 20°C, no outro, as percentagens de gordura. Fazendo coincidir os dois valores pré-determinados, um pequeno ponteiro indica imediatamente o valor do extrato seco total. Para obter o extrato seco no produto isento de gordura basta subtrair do extrato seco total, a percentagem de gordura encontrada.

2.4. Identificação do tipo de leite utilizado no fabrico dos queijos em estudo por métodos moleculares

2.4.1. Extração de DNA

O DNA presente nos queijos e leites em estudo foi extraído, recorrendo ao método do tiocianato de guanidina, adaptado do descrito de Pitcher *et al.*, (1989), e utilizando um kit comercial (i-genomic food DNA extraction kit - iNtRON Biotechnology).

Depois foi analisada numa reação de PCR onde foi escolhida a técnica que apresentou melhor resultado tanto para o leite como para o queijo, que nesse caso foi o método do tiocianato de guanidina.

2.4.2. Amplificação de DNA por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

Posteriormente à extração do DNA este foi utilizado numa reação de PCR com *primers* específicos para cada espécie em estudo (Tabela 6) e combinados em Multiplex para otimizar o protocolo. Realizou-se um ensaio com os DNA dos leites e outro com DNA dos queijos. Para cada reação foi introduzido um controlo negativo que consistiu numa amostra sem DNA. Os reagentes utilizados nas reações de amplificação foram adquiridos à Nzytech e as reações feitas em tubos de 0,2 ml.

O método padrão utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA consistiu na electroforese em gel de agarose.

O sistema de amplificação da PCR foi realizado conforme protocolo adaptado de Bottero *et al.* (2003), em reação contendo: 2x Green Master Mix, (50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM NaCl); 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,5 µl de cada primer, 1 U de ‘Taq DNA polimerase’ e água sigma até perfazer um volume de 25 µl. As reações de PCR foram realizadas num termociclador Doppio[®] e sujeitas a seguintes etapas:

- ❖ Desnaturação a 94°C, durante 5 minutos;
 - ❖ Desnaturação a 94°C durante 30 segundos;
 - ❖ Hibridação dos *primers* a 55°C durante 1 minuto;
 - ❖ Extensão a 72°C, durante 1 minuto;
 - ❖ Extensão final a 72°C, durante 5 minutos;
 - ❖ Refrigeração a 4°C ∞
- } 35 ciclos

As amplificações foram visualizadas em gel de agarose a 1,2% feita em tampão TBE a 0,5x, e sujeito a uma voltagem de 200 volts durante 2 horas. Para tal, uma alíquota do produto de amplificação de 8 µl foi misturada com 2 µl de gel red (Biotium Inc) e aplicada em gel, tal como o marcador NZYDNA Ladder V. O gel foi visualizado registrando a fluorescência emitida num transiluminador (Uvitec STX-35M).

Tabela 6: Sequência nucleotídica dos primers utilizados.

| Gene | Sequência | Dimensão (pb) | Referência |
|-------------------------|--|---------------|------------------------------|
| <i>Ovis aries</i> For | 5'- ATA TCA ACC ACA GGA GAG GAG AC- 3' | 172 | Bottero <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Ovis aries</i> Rev | 5'- TAA ACT GGA GAG TGG GAG AT- 3' | | |
| <i>Capra hircus</i> For | 5'- CGC CCT CCA AAT CAA TAA G- 3' | 326 | |
| <i>Capra hircus</i> Rev | 5'- AGT GTA TCA GCT GCA GTA GGG TT- 3' | | |
| <i>Bos taurus</i> For | 5'- 5GTA CTA CTA GCA ACT GCT TA- 3' | 256 | |
| <i>Bos taurus</i> Rev | 5'- GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G- 3' | | |

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises microbiológicas

Relativamente à avaliação da qualidade microbiológica, foram analisadas 12 amostras de queijo adquirido em supermercados da região de Lisboa e 3 amostras de leite.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos para a contagem de Enterobacteriaceas , *E. coli*, microrganismos totais a 30°C , bolores e leveduras nas 12 amostras de queijo e 3 leites em estudo.

Para além das análises apresentadas na Tabela 7 também se efectou pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivos*, *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.*, cujos resultados foram todos de ausência dos microorganismos pesquisados em 25 g.

Tabela 7: Resultados das análises microbiológicas

| Amostra | Leite | Bolores UFC/g | Leveduras UFC/g | <i>E. coli</i> UFC/g | M30 UFC/g | Ent. UFC/g |
|---------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| L1 | Cabra | <10 | $7,7 \times 10^5$ | <10 | $3,1 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^5$ |
| L2 | Ovelha | <10 | $2,3 \times 10^5$ | $5,2 \times 10^2$ | $1,1 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^5$ |
| L3 | Vaca | $1,0 \times 10^3$ | $1,8 \times 10^5$ | $8,8 \times 10^2$ | $1,7 \times 10^7$ | 1×10^5 |
| Q1 | Cabra | <10 | <10 | <10 | $2,8 \times 10^2$ | $2,7 \times 10^1$ |
| Q2 | Cabra | $1,5 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^4$ | $3,8 \times 10^2$ | $1,9 \times 10^9$ | $1,6 \times 10^7$ |
| Q3 | Ovelha | <10 | $2,4 \times 10^3$ | <10 | $3,3 \times 10^7$ | $2,9 \times 10^7$ |
| Q4 | Ovelha | $1,0 \times 10^3$ | $6,6 \times 10^4$ | <10 | $2,6 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ |
| Q5 | Vaca | <10 | 1×10^2 | <10 | $1,4 \times 10^7$ | $7,5 \times 10^2$ |
| Q6 | Vaca | $1,4 \times 10^2$ | $1,1 \times 10^4$ | <10 | $2,8 \times 10^8$ | <10 |
| Q7 | Ovelha e cabra | $2,7 \times 10^2$ | $7,8 \times 10^3$ | <10 | $1,1 \times 10^7$ | <10 |
| Q8 | Ovelha e cabra | <10 | $2,0 \times 10^5$ | <10 | $2,1 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^6$ |
| Q9 | Vaca e cabra | $2,6 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^3$ | <10 | 2×10^8 | $4,8 \times 10^8$ |
| Q10 | Vaca e cabra | <10 | $3,1 \times 10^5$ | <10 | $1,3 \times 10^7$ | <10 |
| Q11 | Vaca e ovelha | $5,6 \times 10^4$ | $3,6 \times 10^4$ | <10 | $2,9 \times 10^8$ | $8,3 \times 10^2$ |
| Q12 | Vaca, cabra e ovelha | <10 | <10 | <10 | $1,5 \times 10^7$ | <10 |

O leite e os produtos lácteos oferecem aos microrganismos condições necessárias à multiplicação, o que a torna potenciais veiculadores de bactérias patogênicas (Zottola & Smith, 1991). Surtos de doenças relacionados com o consumo de queijo têm sido relatados com frequência (Linnan *et al.*, 1988; Le Loir *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2007). Na linha de produção dos queijos existem várias etapas em que os microrganismos podem ser introduzidos no produto. Assim, a qualidade do produto final é influenciada pelas condições higio-sanitárias em que o leite foi obtido, pelo processamento, qualidade da água, armazenamento, transporte da matéria--prima e do produto, devendo, portanto, cada etapa ser rigorosamente controlada, a fim de assegurar a inocuidade do produto final (Forsythe, 2002). Apesar da listeriose poder ocorrer em adultos saudáveis, a maioria dos casos (80%) ocorrem em pessoas com sistema imunitário comprometido, grávidas, recém-nascidos e idosos (Jay, 1996). A listeriose transmitida por alimentos é uma doença relativamente pouco comum mas grave, com elevadas taxas de mortalidade (20 a 30%), quando comparadas com as de outros microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos, como a *Salmonella* (FAO/OMS, 2004). A maioria dos casos de listeriose humana são esporádicos ou surtos cuja delimitação geográfica e/ ou temporal é geralmente difusa. A *L. monocytogenes* também pode ter transmissão vertical (de mãe para filho), zoonótica (de animal para humanos) ou nosocomial (contraída em hospitais). A importância dos alimentos como via primária de transmissão de *L. monocytogenes* aos humanos foi reconhecida na década de 80, quando aconteceram inúmeras grandes epidemias de listeriose de origem comum, no Norte da América e na Europa (Miller *et al.*, 1990).

Os dados existentes indicam que, todas as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas a partir de alimentos são potencialmente patogênicas e que os isolados individuais têm uma variação considerável de virulência relativa (Hof & Rocourt, 1992). Em estudos experimentais com animais, as variações da virulência definidas podem alcançar até um fator de 1000, de forma similar, existem provas de que há variação da virulência entre as diferentes estirpes isoladas de *L. monocytogenes* em alimentos (Neves *et al.*, 2008; Farber & Peterkin, 1991). Os casos de listeriose são frequentemente associados à ingestão de alimentos contaminados, especialmente alimentos prontos para consumo (Cox *et al.*, 1989; Bille 1990; Salvat *et al.*, 1995; Aureli *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2005). Ao longo dos tempos foram reportados vários surtos de listeriose associados a produtos lácteos contaminados, particularmente queijo, casos estes, ocorridos nos Estados Unidos da América (Linnan *et al.*, 1988), Europa (Bille 1990; Goulet *et al.*, 1995) e Japão (Makino *et al.*, 2005). A dose infetante (DI) para humanos não está estabelecida. Schlech (1988) nas suas pesquisas, relatou uma DI oral $< 10^2$ células, mas

Golnazarian *et al.* (1989) estimaram DI entre 10^3 e 10^9 células e Stephens *et al.* (1991) o valor de 10^{10} células. Dados recolhidos em surtos de listeriose sugerem que os alimentos incriminados continham contagens elevadas de *L. monocytogenes*, cerca de 10^6 UFC/g (United, 2003), o que realça a necessidade de minimizar a exposição humana a altas populações da bactéria. Dados mais recentes (FAO/WHO, 2004) sugerem que contagens menores do que 10^2 UFC/g em alimentos não são infetantes, mas não excluem essa possibilidade. Assume-se que menos do que 1000 células possam causar a doença em populações susceptíveis (United, 2007). Apesar da controvérsia sobre os valores de DI para *L. monocytogenes*, considera-se o critério de “ausência em 25 gramas” como o limite para a categoria de alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o seu crescimento, antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu. (FAO/WHO, 2004; Regulamento (CE) nº 1441/2007).

No presente estudo todas as amostras analisadas demonstraram ausência de *Listeria monocytogenes*, resultado satisfatório uma vez que se encontra dentro dos padrões estabelecidos pelo Regulamento (CE) nº 1441/2007 e Gilbert *et al.*, (2000). Este resultado em queijo curado e leite pasteurizado indica a eficiência do processamento térmico, do período de cura, cumprimento de boas práticas de higiene e inexistência de contaminações cruzadas.

Alexandre *et al.*, (2002) e Neto *et al.*, (2005) nos seus estudos em queijos artesanais evidenciam a atividade inibitória de bactérias lácticas frente a vários microrganismos patogénicos s como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* ssp.

Entre os microrganismos que comprometem a qualidade dos produtos lácteos, o *S. aureus* e os coliformes podem ser destacados. Os primeiros são importantes devido à possibilidade de produção de toxinas no alimento, enquanto que os coliformes são indicadores de contaminação fecal do produto e, portanto, do risco de transmissão de microrganismos patogénicos presentes nas fezes (Forsythe *et al.*; 2002).

No presente estudo a ocorrência de colónias suspeitas de *S. aureus* foi observada em 3 amostras de queijo com contagens variando entre 10 a 10^2 UFC/g. Destas amostras positivas para a presença de estafilococos foram seleccionadas 10% das colónias características para realizar a prova da coagulase, considerando-se colónias típicas, todas as que eram negras, brilhantes, bem delimitadas e com halos. Nenhum dos isolados produziu a enzima coagulase, sendo este resultado considerado satisfatório. Segundo Orden *et al.*, (1992) e Center for Disease Control [CDC], (2000) é importante considerar, que estafilococos coagulase positivos podem estar associadas a surtos de intoxicação estafilocócica, uma vez que existe uma relação estreita entre a capacidade do microrganismo produzir coagulase e sintetizar

enterotoxinas. Segundo Forsythe, (2002), 10^5 UFC/g podem propiciar a produção de enterotoxinas, sendo o limite mínimo para produzir toxinas 10^4 UFC/g (Bergdoll, 1990).

Microrganismos totais a 30°C e *E. coli* têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos (Calciti *et al.*, 1998). Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade microbiológica de um produto alimentício, os coliformes, em geral, a *Escherichia coli* e os *Enterococcus*, têm merecido maior consideração (Sharf, 1972).

Quanto à contagem de *E. coli* observou-se crescimento numa amostra de queijo de cabra ($3,8 \times 10^2$ UFC/g) e nos leites de ovelha e vaca apresentando valores de ($5,2 \times 10^2$ UFC/g) e ($8,8 \times 10^2$ UFC/g), respectivamente. De acordo com o Regulamento (CE) nº 1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, o valor a partir do qual a qualidade microbiológica do queijo fresco pode ser considerada não satisfatória é 3 log UFC/g, enquanto Gilbert *et al.*, (2000) estabelece o limite de 10^5 UFC/g. Tomando este valor como referência, tendo em conta que os valores encontrados nas amostras em estudo, estão dentro dos limites estabelecidos pode afirmar-se que as boas práticas de fabrico e higiene foram eficazes. Em produtos processados pelo calor como os pasteurizados, pode-se recorrer à contagem de *E. coli* para comprovar a eficácia do processo térmico. A presença desta bactéria após processamento pelo calor é vista com grande preocupação, pois há uma elevada possibilidade da presença de patogénicos entéricos no género alimentício. A sua presença permite ainda dar uma indicação sobre as condições higiénicas da fábrica e/ou da possibilidade de ocorrência de contaminação pós-processamento (Downes & Ito, 2001; Ray, 2004). Tendo em conta que leite utilizado no fabrico deste queijo passou pelo processo de pasteurização, assim como o leite em estudo, pode-se colocar em evidência a eficácia do processo térmico, assim como as boas práticas de fabrico dos produtos em análise.

Segundo Reis *et al.* (2006), a contagem dos aeróbios totais deve ser realizada para avaliar principalmente as condições de higiene da indústria. No caso dos queijos, por serem produtos fermentados, a contagem dos microrganismos aeróbios totais a 30°C não pode ser aplicada com o mesmo objetivo, nestes casos, a aceitabilidade do produto baseia-se na aparência, cheiro, textura, presença e contagem de microrganismos patogénicos (Giannuzzy, Contreras & Zaritzky, 1999). No entanto, Gilbert *et al.*, (2000) estabelece um limite máximo de 10^4 UFC/g para queijos fabricados com leite não pasteurizada.

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas dos produtos em estudo (ver Tabela 7), referente a microrganismos aeróbios a 30°C alcançaram valores bastante elevados, atingindo $1,9 \times 10^9$ UFC/g. No entanto, tendo em conta que os queijos em análise não eram frescos mas

sim produtos fermentados, esta contagem está sobrestimada, uma vez que a contagem de aeróbios totais inclui as bactérias ácido lácticas que segundo Giannuzzy *et al.* (1999) nos produtos fermentados podem alcançar 10^6 UFC/g. Sendo que os mesmos autores referem que valores superiores a 10^7 UFC/g podem afetar a qualidade do queijo por diminuição da sua vida útil.

Atualmente a contagem de *Enterobacteriaceae* substitui a de coliformes, tradicionalmente utilizadas como indicadores de higiene e contaminação após o processamento pois a sua presença pode estar relacionada com contaminação de origem fecal (Tornadijo *et al.*; 2001). Segundo Adams & Moss (2008), a sua contagem é utilizada com mais frequência como indicador da qualidade higiénica do que como indicador da contaminação fecal, fornecendo desta forma, mais informação sobre a qualidade microbiológica geral do que possíveis perigos para a saúde associados a um género alimentício. Tornadijo *et al.*, (2001) evidenciaram o interesse tecnológico desta família, uma vez que algumas *Enterobacteriaceae* podem produzir alterações nos alimentos, em particular nos queijos, quer ao nível do aspecto, quer a nível organolético.

Pelos resultados encontrados (ver Tabela 7) observou-se que os queijos analisados apresentaram uma elevada população de enterobactérias, $1,2 \times 10^8$ UFC/g o que pode indicar deficiência na qualidade higiénica dos queijos, não cumprimento de boas práticas de fabrico ou existência de contaminação cruzada. Este resultado também fornece informações gerais sobre a qualidade microbiologia dos queijos, a sua deficiência provoca alterações organoléticas dos queijos e diminuição da sua vida útil.

Quanto à pesquisa de *Salmonella* spp., esta bactéria não foi detectado em 25 g de nenhuma das amostras em estudo. Este resultado é satisfatório porque se apresenta dentro dos padrões estabelecidos pelo Regulamento (CE) nº 1441/2007, que referem a ausência desse microrganismo em 25 g de alimento. A ausência de *Salmonella* spp. nas amostras pode estar relacionada com a presença de bactérias lácticas, que tornam o queijo um meio adverso à sobrevivência de microrganismos patogénicos ou pela condição estressante advinda do próprio processamento (Flowers *et al.*, 1992 ; Almeida & Franco, 2003). D'Aoust (1989), atribui a ausência de *Salmonella* sp., basicamente, a mudanças que ocorrem durante o processo de maturação dos queijos, principalmente pela presença de grupos microbianos distintos, como bactérias lácticas e também enzimas, e outras substâncias que modificam as características do produto, tornando-o desfavorável para sua sobrevivência. Vários autores (Alexandre *et al.*, 2002; Caridi *et al.*, 2003; Neto *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006; Chioda *et al.*, 2007) já comprovaram a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas face a

microrganismos patogénicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*.

Os fungos são conhecidos por alterarem os alimentos, pois produzem enzimas que hidrolisam proteínas, lípidos e hidratos de carbono, dando origem a uma série de produtos dessa degradação, que promovem modificações na coloração, aparência desagradável, perda de sabor e também produção de metabólitos tóxicos, conhecidos como micotoxinas, tornando-os impróprios para o consumo (Franco & Landgraf, 1996). A presença de bolores e leveduras viáveis em número elevado podem indicar deficientes condições higiénicas de equipamentos, falhas no processamento e/ou armazenamento, além de matéria prima excessivamente contaminada (Lima, 2005; Franco & Landgraf, 1996). Na Tabela 7 estão representados os resultados referentes às análises de bolores e leveduras, que atingiram 10^5 UFC/g. O Regulamento (CE) 1441/2007 não apresenta limites para bolores e leveduras para os queijos. Os fungos fazem parte do microbiota normal das câmaras de maturação de queijos e, neste ambiente, podem tornar-se indesejáveis por provocar alterações sensoriais nos queijos. O controlo de bolores e leveduras em queijos é muito importante porque podem provocar perdas económicas devido a alteração sensorial dos produtos e, também podem representar riscos para saúde pública uma vez que algumas espécies de bolores produzem micotoxinas.

3.1. Análises Físico-Químicas

Um dos parâmetros mais críticos no que diz respeito ao controlo de qualidade do processo de fabrico e à segurança alimentar do queijo é a sua acidez. O leite, por ter um pH próximo de 6,8, é um meio adequado ao crescimento da maioria das bactérias. A sua fermentação, por acção das bactérias lácticas, conduz a uma redução significativa do pH variando de 4,5 a 5,5, tornando-se um dos principais fatores capaz de determinar o crescimento, a sobrevivência ou destruição dos microrganismos existente nos queijos (Cabezas *et al.*, 2005). A sobrevivência e o crescimento dos microrganismos nos queijos dependem também de outros parâmetros, como a atividade de água. A capacidade de sobreviver ou de se multiplicar em meios com reduzida atividade da água varia de acordo com os microrganismos (Eyles, 1992). No início do seu fabrico o queijo apresenta a_w aproximadamente de 0,99. Após o dessoramento, a salga e durante a cura estes valores diminuem para 0,917 a 0,988 (Beresford *et al.*, 2001).

Considerando que há exceções, os principais grupos de microrganismos apresentam valores de atividade de água mínimos para o seu desenvolvimento: maioria das bactérias: 0,90-0,91; maioria das leveduras: 0,87-0,94; maioria dos bolores: 0,70-0,80. Os queijos com maior

atividade da água apresentam uma maior tendência para se deteriorarem ou para suportarem o crescimento de bactérias patogênicas uma vez que, quanto a este aspecto, constituem um meio de desenvolvimento mais favorável para os microrganismos do que os queijos com atividade da água mais baixa.

A atividade da água vai decrescendo quando passamos de um queijo de pasta mole (por ex: 0,95) para um queijo de pasta dura (por ex: 0,85), fator que reforça a proteção do produto contra a presença de microrganismos. Nos queijos com baixa atividade da água crescem preferencialmente leveduras e bolores (Cabezas *et al.*, 2005; Eyles 1992; Spahr & Url, 1994). Bachmann & Spahr (1995), estudaram os queijos de pasta semidura e concluíram que a sobrevivência de bactérias patogênicas é maior do que em queijos de pasta dura. Isto pode ser devido ao aumento do número de microrganismos patogênicos na coalhada porém, depois de 90 dias de cura, os queijos de pasta semidura apresentaram valores abaixo dos limites de detenção para todas as bactérias com exceção da *Listeria monocytogenes*. Para além do pH e atividade da água a qualidade do queijo também é influenciada pela quantidade de sal presente, devido à sua propriedade antimicrobiana. A maioria dos microrganismos sobrevive a uma concentração de sal inferior a 3%, sendo inibidos a partir dos 5%. No entanto, existem algumas exceções como o *Staphylococcus* spp, que pode sobreviver e crescer em meios contendo mais de 15% de sal e *L. monocytogenes* que pode sobreviver na presença de 20% a 30% de sal até 10 dias. O teor em sal e os valores de a_w estão intrinsecamente ligados, sendo que a ação inibitória do crescimento bacteriano do sal é o principal fator de inibição microbiana no queijo (Fernandes *et al.*, 2006).

O resultado das análises químicas dos 12 queijos avaliados neste trabalho é apresentado na Tabela 8. A composição média do queijo encontra-se dentro de valores referenciados na bibliografia, nomeadamente Mendes & Almeida (1948), Vieira de Sá *et al.* (1970), David (1982), Marcos *et al.* (1985), Amaral (1996), Bettencourt *et al.* (1996) e Freitas (1998).

Tabela 8: Resultados obtidos nas análises físico-químicas dos queijos.

| Amostra | Leite | pH | Cloretos (%) | a_w (23°c) |
|----------------|----------------------|-----------|---------------------|-----------------------------|
| Q1 | Cabra | 4,76 | 1,93 | 0,919 |
| Q2 | Cabra | 5,16 | 1,38 | 0,920 |
| Q3 | Ovelha | 5,15 | 1,28 | 0,920 |
| Q4 | Ovelha | 5,04 | 1,63 | 0,921 |
| Q5 | Vaca | 5,31 | 0,79 | 0,920 |
| Q6 | Vaca | 5,12 | 2,06 | 0,922 |
| Q7 | Ovelha e cabra | 6,06 | 1,58 | 0,923 |
| Q8 | Ovelha e cabra | 4,98 | 2,11 | 0,914 |
| Q9 | Vaca e cabra | 5,25 | 2,05 | 0,921 |
| Q10 | Vaca e cabra | 5,05 | 3,59 | 0,926 |
| Q11 | Vaca e ovelha | 4,90 | 1,05 | 0,926 |
| Q12 | Vaca, cabra e ovelha | 4,83 | 1,61 | 0,929 |

Os valores de pH das amostras analisadas variaram de 4,76 a 6,06, sendo os valores médios mais elevados observados para a amostra Q7 (6,06), e o mais baixo para a amostra Q1 (4,76). A percentagem dos cloretos variou de 0,79 % para o queijo amanteigado de vaca a 3,59%, valor encontrado na amostra Q10. Os valores de a_w variaram de 0,914 a 0,929.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos descritos por Freitas e Malcata (2000), e Alves *et al.*, (2003). Os resultados diferenciam entre si, o que pode ser atribuído a alguns fatores como tempo e temperatura de cura, microflora de cura, método de salga, diferentes formas de tecnologia de fabrico e processamento e o tipo de leite. A acidez pode atribuir-se ao facto dos queijos serem produtos fermentados por ação das bactérias lácticas que ao produzir ácido láctico levam a uma diminuição do pH.

Na Tabela 9 são representados os resultados obtidos nas análises químicas dos leites incluídos neste estudo.

Tabela 9: Resultados obtidos nas análises físico-químicas dos leites.

| Amostra | Gordura | Densidade | Proteína | Cinza | Extrato seco isento de gordura |
|------------------------|----------------|------------------|-----------------|--------------|---------------------------------------|
| Leite de Cabra | 4,5 | 1,031 | 3,76 | 0,83 | 9,92 |
| Leite de Ovelha | 6,2 | 1,034 | 5, 15 | 0,90 | 3.39 |
| Leite de Vaca | 4 | 1,031 | 3,41 | 0,74 | 8,83 |

Analisando os valores encontrados podemos observar que o leite de ovelha contém maior percentagem de gordura (6,2), seguido do leite de cabra (4,5) e vaca (4), tal como esperado. Os resultados referentes a proteínas, densidade e cinza tiveram um comportamento semelhante, tendo o leite de ovelha maior percentagem de proteína e cinza, seguido do leite de cabra e vaca. No extrato seco isento de gordura o leite de cabra teve maior percentagem (9,92), seguido do leite de vaca (8,83) e leite de ovelha (3,39). Estes resultados encontram-se de acordo com os valores médios registados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2006) para este tipo de produtos.

3.3. Adulteração

A possibilidade de determinar as percentagens do leite que intervêm na composição dos queijos tem um grande interesse científico e uma enorme repercussão comercial e económica tanto para a administração, com a finalidade de garantir o cumprimento da legislação, assim como para a indústria para evitar adulterações antes e durante o processo de fabrico dos queijos.

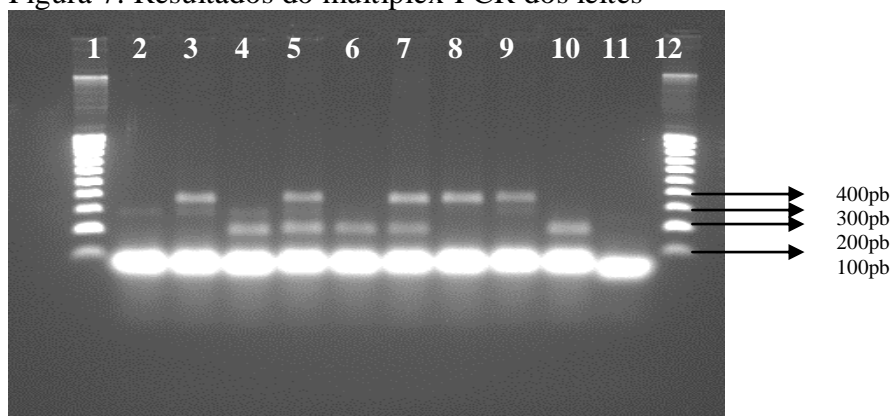
A adulteração de matérias primas como o leite de uma espécie com outra acontece frequentemente, sobretudo quando existem marcadas diferenças de preço ou disponibilidade dos produtos. Tradicionalmente, para identificação das espécies presentes, estudavam-se as proteínas através da técnica de electroforese de proteínas solúveis (Cartoni *et al.*, 1998), separação através de HPLC (*High-performance liquid chromatography*) e métodos imunoenzimáticos (Addeo *et al.*, 1995). Estes métodos apresentam algumas limitações como no caso de existirem algumas etapas no processo de fabrico que podem levar a desnaturação

das proteínas, o que não acontece com a molécula de DNA uma vez que é mais estável a tratamentos como o calor e a salga. Assim sendo, mais recentemente, a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), ao tornar possível localizar um pequeno fragmento de DNA numa complexa mistura de moléculas mais ou menos fragmentadas e replicá-lo milhões de vezes, permitindo a sua posterior identificação, tem contribuído para a identificação de espécies componentes em diferentes produtos alimentares, inclusivé no leite e queijo (Hurng-Yi *et al.*,2000). O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado como marcador de espécies, particularmente a região 12S do RNAr por preencher uma série de requisitos como tamanho aceitável, diferenciação entre espécies, ser específica da espécie, e por acumular pontos de mutação interessantes que originam mudanças pontuais capazes de diferenciar géneros ou espécies, ideais para este tipo de estudo (Rastogi *et al.*, 2004; Hurng-Yi *et al.*, 2000; Maudet & Taberlet, 2001).

Multiplex PCR, uma variante do PCR amplamente utilizada, foi a técnica escolhida por Bottero *et al.* (2003) por permitir a deteção simultânea do leite de vaca, cabra e ovelha em queijos através da análise da presença dos genes mitocondriais 12S e 16S do RNAr. A grande vantagem das técnicas de DNA está na sua elevada sensibilidade e possibilidade de aplicação em amostras muito deterioradas como consequência do próprio processo de fabrico do produto, como é o caso dos queijos.

Assim, neste trabalho aplicou-se a técnica de multiplex-PCR, segundo Bottero *et al.* (2003), para identificação dos DNA das diferentes espécies presentes nos leites (Figura 7) assim como para identificar o tipo de leite presente em 12 amostras de queijos comercializados em Portugal (Figura 8).

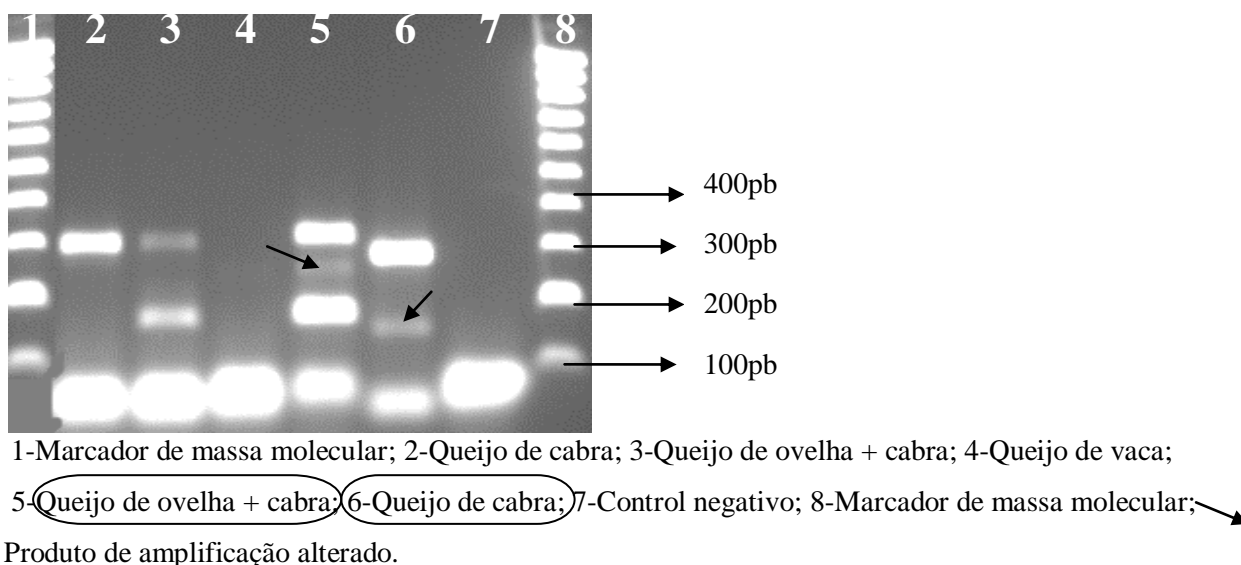
Figura 7: Resultados do multiplex-PCR dos leites



1-Marcador de massa molecular; 2- Leite de vaca; 3-Leite de vaca + cabra; 4-Leite de vaca + ovelha; 5-Leite de vaca + ovelha + cabra; 6-Leite de cabra; 7-Leite de ovelha + cabra; 8-Leite de cabra + cabra; 9-Leite de vaca + cabra; 10-Leite de ovelha; 11-Controlo negativo; 12-Marcador de massa molecular.

Com o objetivo de otimizar o protocolo efetuou-se um PCR com os DNA extraídos dos leite (usou-se DNA dos leites puros e de mistura de duas e três espécies). Os padrões dos produtos amplificados por PCR obtidos de cada uma das amostras correspondem exatamente aos tamanhos esperados (Fig 7) permitindo assim a confiabilidade da técnica.

Figura 8: Resultados do multiplex-PCR dos queijos



Os padrões dos produtos amplificados por PCR, obtidos de cada uma das amostras correspondem exatamente aos tamanhos esperados (Fig 8). Das amplificações obtiveram-se fragmentos que oscilaram entre 172 a 326 pares de base (pb), sendo estes específicos de 172 pb para leite de ovino, 256 pb para leite de bovino e 326 pb para leite de cabra (ver Tabela 6, Material e métodos). No resultado da corrida de electroforese observa-se a presença do produto de amplificação correspondente ao leite de vaca no queijo de mistura de cabra e ovelha na amostra 5 (Figura 8) e a presença do produto de amplificação correspondente ao leite de ovelha no queijo de cabra na amostra 6 (Figura 8). Assim, os resultados obtidos indicam que estes queijos foram adulterados com leite de vaca e ovelha, uma vez que estes não estavam declarados no rótulo.

Na Tabela 10 apresenta-se o resumo dos resultados obtidos por multiplex-PCR para os 12 queijos analisados neste estudo.

Tabela 10: Resultados das análises por multiplex-PCR dos queijos.

| Queijo | Leite declarado no rótulo | Leite identificada nas análises |
|---------------|----------------------------------|--|
| Q1 | Cabra | Cabra e ovelha |
| Q2 | Cabra | Cabra |
| Q3 | Ovelha | Ovelha |
| Q4 | Ovelha | Ovelha |
| Q5 | Vaca | Vaca |
| Q6 | Vaca | Vaca |
| Q7 | Ovelha e cabra | Ovelha, cabra e vaca |
| Q8 | Ovelha e cabra | Ovelha e cabra |
| Q9 | Vaca e cabra | Vaca e Cabra |
| Q10 | Vaca e cabra | Vaca e cabra |
| Q11 | Vaca e ovelha | Vaca e ovelha |
| Q12 | Vaca, cabra e ovelha | Vaca cabra e ovelha |

Analisando a Tabela 10, ou seja, comparando os leites declarados no rótulo com os detectados por multiplex-PCR, pode-se observar a presença não declarada de leite de vaca e ovelha em dois queijos, sendo um de cabra (Q1) onde se detectou leite de ovelha e outro de mistura de cabra e ovelha (Q7), em que se detectou leite de vaca.

A maioria dos trabalhos realizados, utilizando a técnica de PCR, para estimar adições não declarados de leite de vaca nos queijos de ovelha e cabra conseguiram um limite de detecção de 0,1 a 1%. Rea *et al.* (2001), detectaram a adição de 1% de leite de vaca em leite de búfala e Di Pinto *et al.*, (2004), conseguiram detectar a adição de 1,5% de leite de vaca no queijo mozzarella. Klotz & Einspanier (2001) detectaram 2% de adição do leite de vaca em queijos de cabra. Plath *et al.*, (1997) identificaram 0,5% de leite de vaca em queijos de cabra e ovelha e Feligini *et al.*, (2005) detectaram 0,5% de leite de vaca em queijo mozzarella italiana. Bottero *et al.*, (2003) através do método de multiplex-PCR analisaram 19 queijos para verificar a autenticidade dos rótulos, e verificaram que 15 das amostras analisadas se encontravam de acordo com a rotulagem e 4 em desacordo. Encontraram somente leite de vaca em 2 queijos de mistura ovelha e vaca e em um de cabra e ovelha, também detetaram presença de leite de vaca no queijo de cabra.

O método de referência para a Comunidade Europeia (CE) é a focagem isoeléctrica de das caseínas do leite e possui 1% de limite de detecção. Cozzolino *et al.*, (2001) consideram limite de detecção de 5% como prova suficiente para presença de leite não declarado, acrescentando ainda que qualquer adulteração inferior a 5% não tem nenhum efeito económico. Mafra *et al.*, (2004) nos seus estudos constataram que apenas 8 dos 10 queijos analisados continham como ingredientes os leites conforme o indicado no rótulo, sendo que, dois dos queijos analisados apresentavam só o leite de vaca como ingrediente e foi detectada presença de leite de ovelha nos dois queijos. Santos *et al.*, (2003) analisaram 13 queijos de vaca, cabra, e ovelha e detetaram presença não declarada de leite cabra em dois queijos de ovelha. Para a identificação das respectivas espécies, eles utilizaram a experiência de alguns autores como Matsunaga *et al.* (1999). Píknova *et al.* (2002), também observaram que 90% dos 10 queijos de ovelha e de cabra analisados no seu laboratório continham leite de vaca não declarada. Di Pinto *et al.*, (2004) analisaram 30 queijos mozzarella e encontraram presença de leite de vaca em 22 amostras. Maskova & Paulickovai (2006) nos seus estudos analisaram 17 queijos de cabra e 7 queijos de ovelha procedente de Eslováquia, França, Alemanha, Republica Checa e Itália e encontraram presença não declarada de leite de vaca em 3 queijos de cabra e em 1 queijo de ovelha.

O Multiplex PCR demonstrou ser uma técnica eficiente na detenção do tipo de leite presente nos queijos o que a torna útil, podendo ser utilizada na certificação de autenticidade de produtos lácteos. A sua alta sensibilidade e especificidade na análise de adulterações compensam o preço alto da técnica.

4. Conclusões

De uma forma geral os queijos em análise apresentaram boa qualidade microbiológica (ex: ausência de *E. coli* em 1 g, de *L. monocytogenes* em 25 g e de *Staphylococcus coagulase* positivos em 1 g) e os parâmetros físico-químicos encontravam-se dentro do esperado.

A técnica de PCR permitiu verificar a ocorrência de uma possível adulteração de queijo de cabra com leite de ovelha e de queijo de cabra-ovelha com leite de vaca.

Com este resultado podemos presumir que em Portugal existe a possibilidade da comercialização de queijos com matéria prima em desacordo com a rotulagem.

5. Referências bibliográficas

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. (3th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Addeo, F.; Nicloai, M.A., Chianese, L.; Mojo, L.; Spagna-Musso, S.; Bocca, A.; Del Giovine, L. (1995). A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo chesse using immunoblotting. *Milchwissenschaft*. 50: 83-85..
- Alexandre, D.P.; Silva, M.R.; Souza, M.R. (2002). Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54(4), 5-13.
- Almeida P.M.P.; Franco, R.M. (2003). Avaliação bacteriológica de queijo tipo minas frescal com pesquisa de patógenos importantes a saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes fecais. *Higiene Alimentar*, 17(111), 79-85.
- Alves, M.M.; R.B. Martins, A.; Raymundo & M. Barbosa. (2003). Queijo de Cabra Transmontano. Aprofundamento da caracterização do leite de cabra Serrana, ecotipo transmontano e respectivo Queijo DOP - Caracterização Preliminar do Queijo. Acta do 6º Encontro de Química de Alimentos. Lisboa, 22-25 de Junho de 2003.
- Amaral, O.M.R.P. (1996). *Caracterização de Queijo Serpa Proveniente de Três Genótipos Ovinos*. Tese de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Nova de Lisboa..
- Aureli, P.; Fiorucci, G. C.; Caroli, D.; Marchiaro, G.; Novara, O.; Leone, L.; Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine* 342, 1236-1241.
- Bachmann, H. & Spahr, U. (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheese from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 476–483.
- Bair-Parker, A. C. (1990). The Staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*. Symposium Supplement, 1S-8S.
- Bania, J.; Ugorski, M.; Polanowski, A.; Adamczyk, E. (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goat's milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research*; 68, 333-6.
- Beer M.; Krause I.; Stapf M.; Schwarzer C.; Klostermeyer H.; (1996). Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native heat-denatured bovine β -lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 21–26
- Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L.; Cogan, T. M. (2001). Recents advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bergdoll, M.S. (1990). Staphylococccal food poisoning. Em: Cliver, D.O.(Ed) *Foodborne Diseases*. *Academic Press*.USA. 85-106 .

- Bettencourt, C.M.V.; Matos, C.A.P.; Batista, T.; Canada, J. & Fialho, J.B.R.(1996). Preliminary data on the ewe breed effect on the quality of Portuguese Serpa Cheese [Abstract] In: Symposium International EAAP-CIHEAM-FAO, Badajoz, Spain.
- Bille, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In Miller, A. J., Smith, J. L., Somkuti, G. A. (Eds), *Foodborne Listeriosis*. Elsevier, Amsterdam, p. 71-74.
- Bille, J.; Rocourt, J. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Tenover, M. C.; Tenover, F. C. (Eds). *Manual of clinical microbiology*. (8th ed.). (pp. 461-471). Washington D. C.: ASM.
- Blom, U. N. & Weréén, P. (2002). Cheese and cheese-making – with special emphasis on Swedish cheeses. *Bioscience explained*. 1(2).
- Bonassi, A.T. (1984). Metodos atuais e modernos para análises do leite e derivados. *Instituto de laticínios Candido Tostes* 39 (235) 17-22.
- Bottero, M.T.; Civera, T.; Nucera, D.; Rosati, S.; Sacchi, P.; Turi, R.M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 13, 277-82
- Bowen, D. & Henning, D. (1994). Coliform bacteria and *Staphylococcus aureus* in retail natural cheese. *Journal of Food Protection*, 57 (3), 253 – 255.
- Cabezas, L.; Sanches, I.; Poveda, J. M.; Seseña, S.; Palop, M.L.L. (2005). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*.
- Calciti, K.R.; Burkhart III, W.; Watkins, W.D. (1998). Occurrence of malespecific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human-associated wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(12), 5027-5029.
- Calderón, O.; Padilla C.; Chaves C.; Villalobos L.; Arias ML. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Arch Latinoamer Nutric*. 57 (1), 51-56.
- Caridi, A.; Micari, P.; Foti, F.; Ramondino, D.; Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13(2-3), 191-200.
- Cartoni, G.P.; Coccocioli F.; Jasionowka, R.; Ascì, M. (1998). Determination of cow milk in buffalo milk and mozzarella cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Ital. J. Food Sci.* 2, 127-131.
- Carvalho, A. (2002). *Curso de Tecnologia de Leite e Derivados*. Goiânia.
- Carvalho, J. D. G. (2007). *Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas*. Tese de

Doutoramento em Tecnologia de Alimentos. Campinas: Departamento de Tecnologia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas..

- Cavalcante, J. F. M.; Andrade, N. J.; Furtado, M. M.; Ferreira, C. L. L. F.; Pinto, C. L. O.; Elard, E. (2007). Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 205-214.
- Center for Disease Control. (CDC). (2000), Guidelines for confirmation of Foodborne-Disease outbreaks, Morb e Mort, W. Report.49,54-62 Acedido em Jul. 30, 2012 disponível em:
http://www.cdc.gov/outbreaknet/references_resources/guide_confirming_diagnosis.html
- Chioda, T.P.; Schocken-Iturrino, R.P.; Garcia, G. R.; Pigatto, C.P.; Ribeiro, C. A.M.R.; Ragazzani, A. V. F. (2007). Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo Minas Frescal por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciencia Rural*, 37(2) Acedido em Jul. 4. 2012, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n2/a48v37n2.pdf>
- Cogan, T. M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P. S.; Fernandez, I.; Gomez, J.; Gomez, R.; Kalantzopoulos, G. Ledda, A.; Medina, M.; Rea, M. C.; Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 409-421.
- Colak, H.; Hampikyan H.; Bingol, E.; Ulusoy, B. (2007). Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. In Tulum cheese. *Food Control*, 8, 576-579.
- Cox, J. L.; Kleis, T.; Cordier, J. L.; Cordellana, C.; Konkel, P.; Pedrazzini, C.; Beumer, R.; Siebenga, A., (1989). *Listeria* spp, in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* 6, 49-61.
- Cozzolino, R.; Passalacqua S.; Salemis S.; Malvagna P.; Spina E.; Garozzo D. (2001): Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1031–1037.
- D'Aoust, J-Y. (1989). *Salmonella*. In: Doyle, M.P. (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. (pp.327-446.) INC, New York,
- David, M.T.C.M. (1982). Contribuição para o estudo de algumas variedades de queijo, I. A. A., Lisboa.
- Di Pinto, A.; Conversano, M.CH.; Forte V.T.; Novello L.; Tantillo G.M. (2004): Detection of cow milk in buffalo “Mozzarella” by polymerase chain reaction (PCR) assay. *Journal of Food Quality*, 27, 428–435.
- Dias, S. S.; Lobato, V.; Verruma-Bernardi, M. R. (2009) Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Inst Adolfo Lutz*, São Paulo, 68(3), 327-33.
- Donnelly, C. W. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: Hui, Y. H.; Pierson, M.D.; Gorham, J. R.(Ed.). *Foodborne disease handbook*. (2nd ed.). (pp.213-246). New York: M. Dekker,

- Donnelly, C. W.. (2004). Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In: Fox, P.F.;McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Ed.). *Cheese chemistry, physics and microbiology*. (pp.541-558). London: Elsevier
- Downes, F. P. & Ito, K. (Eds.) (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.). Washington: American Public Health Association.
- Eck, A. & Gillis, J. C. (1997). *Le fromage – De la science à l’assurance qualité*. Lavoisier Tec & Doc.
- European Comission, (2003). *Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products, Particularly Cheeses*. Health & Consumer Protection Directorate-General. Acedido em Jul. 30, 2012, disponivel em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf.
- Evangelista, J. (1989). *Tecnologia de alimentos*. Rio de Janeiro: Atheneu.
- Eyles, M. (1992). Raw milk cheese: The issues. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (7), 102 – 105.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). (2004) . *Risk assessments of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*: technical report. Geneva.
- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. *Microbiology Reviews*, 55, 476–511.
- Felligini, M.; Bonizzi I.; Curik, V. C.; Parma, P.; Greppi, G.F.; Enne, G. (2005). Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkes. *Food Techonology Biotechnology*; 43(1), 91-5.
- Fernandes, A. M.; Andreatta, E.; Oliveira, C.A.F. (2006). Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. *Higiene Alimentar*, São Paulo, 20(144), 49-56.
- Flowers, R. S.; D’Aoust, J.; Andrews, W. H.; Bailey, J.S. (1992). *Salmonella*. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (3.ed). (pp.371-422).Washington, APHA.
- Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre, ArtMed Editora.
- Fox, P. F.; Guinne, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. (1996). *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraff, M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu.
- Franco, R. M.; Almeida, L. E. F. (1992). Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. *Higiene Alimentar*, 6(21), 33-36.
- Frezier, W & Westhof, D. (1993). *Microorganismos importantes en microbiologia de alimentos*. Microbiologia de alimentos. Ditorial Acribia, S.A. Zaragoza, Espanha.

- Freitas, A .C. (1998). *Microbiological, Physicochemical, Biochemical and Organoleptical Contributions to the Characterization of Picante de Beira Baixa Cheese and Attempts of Technological Improvement*. Ph.D. Thesis. Porto: ESB, UC Portugal.
- Freitas, C.; Malcata, F.X. (2000). Our Industry Today. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protegée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science* 83, 584-602.
- Gabinete de Planeamento e Políticas (2007). *Leite e Lacticínios – Diagnóstico Sectorial*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa.
- Germano, P. M. L.; Germano, M. I. S. (2001). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Varela.
- Giannuzzy, I.; Contreras E.; Zaritzky N. (1999). Modeling the aerobic growth and decline of *staphylococcus aureus* as effect by PA and potassium sorbate concentration of food protect 62(2), 356-3 62.
- Gilbert, R. J.; Louvois, J.; Donovan, T.; Little, C.; Nye, K.; Ribeiro, C. D.; Richards, J.; Roberts, D.; Bolton, F. J. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, 3, 163-167.
- Godfrey, T. & West, S. (1996). *Industrial Enzymology*. 2ª Ed. The Macmillan Ltd.
- Golnazarian, C.; Donnely, C.W.; Pitauro, S.J.; Howard, D.B. (1989). Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C67B1/6J mice. *Journal of Food Protection*, 5(10), 696-701.
- Goulet, V.; Jacquet, C.; Vallant, V.; Rebière, I.; Mouret, E.; Lorente, C.; Maillot, E.; Stainer, F.; Rocourt, J.; (1995). Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet* 345, 1501-1502.
- Hof, H. & Rocourt, J. (1992). Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? *International Journal of Food Microbiology*, 16, 173–182.
- Hoier, E.; Janzen, T.; Henriksen, C.M.; Rattray, F.; Brockmann, E.; Johansen, E. (1999). The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law BA, editor. *Technology of cheesemaking*, (pp90-131). Boca Raton: CRC.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Stanley, J. T.; Willians, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9º ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Holzapfel, W. H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J.; Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.*; 73(2), 365S-373. Acedido em Jul. 7, 2012, disponivel em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050000413X> .
- Hurng-Yi, W.; Mung-Pei, T.; Ming-Chung, T.; Sinche, L. (2000). Universal primers for amplification of the complete mitochondrial 12S rRNA gene in vertebrates. *Zool. Stud.* 39, 61-66.

- Instituto Nacional de Estatística. (2009). Produção de queijo em Portugal. Acedido em Mai. 20, 2012, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=000214&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística (2012a). Consumo de queijo em Portugal. Acedido em Jul. 7, 2012, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=000920&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística. (2012b). Produção de queijo em Portugal. Acedido em Jul. 7, 2012, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=000214&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge. (2006). *Tabela da composição de alimentos*.
- ISO 11290-1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal. method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization. Switzerland
- ISO 688-2:(1999) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*. Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium (British Standard)
- ISO 6579: (2002) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*
- ISO 6887-(2003). *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. Switzerland.
- ISO 4833: (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C*. International Organization for Standardization. Switzerland.
- ISO 11290-1:1996+A1 (2004)- *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes. Detection method*.
- ISO 21528-2:(2004) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method*.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (ICMSF) (1996). *Microorganismos de los Alimentos: Características De Los Patógenos Microbianos*; Editorial Acribia, S.A., Zaragoza-España.
- Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A. (1998). *Microbiología Médica*. 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Jay, J. M. (1996). *Modern Food Microbiology*, (5th. Ed.). New York: Chapman & Hall.

- Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. (6^a ed). São Paulo: Artmed.
- Kabuki, D. Y.; Kuaye, A. Y.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2004). Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 87(9), 2803-2812.
- Klotz, A.; Einspanier, R. (2001). Development of a DNAbased screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCREIA-technique. *Milchwissenschaft*, 56, 67–70.
- Kourkoutas, Y.; Xolias, V.; Kallis, M.; Bezirtzoglou, E.; Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochem*, 40 (1), 411-416.
- Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, 2(1), 63-67.
- Lima, C. D. C. (2005). *Avaliação microbiológica e química do queijo minas artesanal da Serra do Salitre-MG*. Tese Doutorado em Microbiologia. Minas Gerais: Instituto de Ciências biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.
- Linnan, M. J.; Mascola, L.; Lou, X. D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.W.; Yonekura, M. L.; Hayes, P.; Weaver, R.; Audurier, A.; Plikaytis, B. D.; Fannin, S. L.; Kleks, A.; Broome, C. V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319, 823-828.
- Little, A. L.; Rhoades, J. R.; Sagoo, S. K.; Harris, J.; Greenwood, M.; Mithani, V.; Grant, K.; Mclauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25, 304-312
- López-Calleja, I.; González –Alonzo, I; Fajardo, V.; Rodríguez, M. A.; Hernández, P. E.; García, T.; Martín, R. (2005). PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 15, 1122-9.
- Lou, Y.; Yousef, A. E. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: Ryser, E.; Marth, E.H. (Ed.). *Listeria, listeriosis and food safety*. (2nd ed). New York: M. Dekker.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Paker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. (10^a ed.) São Paulo: Prentice Hall.
- Mafra, I.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Faria, M.A.; Oliveira, B.P.P. (2004). A novel approach to the quantification of bovine Milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4943-4947.
- Maia, C. (2009). Tipagem molecular de *Listeria monocytogenes* proveniente de queijo de ovelha e de origem humana por AFLP , Instituto Superior de Agronomia.
- Makino. S. L.; Kawamoto, K.; Takeski, K.; Okada, Y.; Yamasaki, M.; Yamamoto, S.; Igimi, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology* 104, 189-196.

- Marcos, A.; Fernández-Salguero, J.; Esteban, M. A.; León, F.; Alacalá, M.; Beltrán de Heredia, F. H. (1985). Quesos Españoles. Tablas de composición, valor nutritivo e estabilidad. Universidade de Córdoba, Faculdade de Veterinária, Dept. Tecn. e Bioq. de los alimentos, Córdoba, Spain.
- Martins, A. D. O.; Mendonça, R.C.S.; Silva, D.L. (2006). Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 5(1), 53-59.
- Maskova E.; & Paulickova I. (2006): PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci*, 24, 127– 132.
- Maudet, C.; Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 229–235.
- Matsunaga T.; Chikuni K.; Tanabe, R.; Muroya S.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51 (2) 143–148
- Medici, M.; Vinderola, C. G.; Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J*, 14 (7), 611-618.
- Mendes, M. E. S. G & Almeida, R. C. (1948). Contribuição para o estudo da composição química e valor alimentar dos Queijos Nacionais. Separata do Boletim do Instituto Superior de Higiene Doutor Ricardo Jorge, 12, 112. Ano III-vol. XII – Lisboa.
- Menendez, S.; Godínez, M. A. R.; Rodríguez-Otero, J. L.; Centeno J. A. (1997). Removal *Listeria* spp. in a cheese factory. *Journal Food Safety, Trumbull*, 17(2), 133-139.
- Miller, A. J.; Ssmith, J. L.; Somkuti, G.A. (1990). Foodborne Listeriosis. Elsevier *Science Pub.*, 61-65, Nova Iorque, USA.
- Modi, R.; Hirvi, Y.; Hill, A.; Griffiths, M.W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal Food Protection*, Ames, 64(7), 927-933.
- Neto, L.G. G.; Souza, M.R.; Nunes, A.C.; Nicoli, J.R.; Santos, W.L.M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(2), 245-25.
- Neves, E.; Silva, A.C.; Roche, S.; Velge, P.; Brito, L. (2008). Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment other foods and clinical cases. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 411-415. NP 3005 (1985). *Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 474 (1983) (Ed. 2) *Leites. Determinação da densidade relativa. Processo corrente*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 475 (1983) (Ed. 2). *Leites. Determinação do resíduo seco e resíduo seco isento de matéria gorda*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

- NP 477 (1983) (Ed. 2) *Leites Determinação da cinza total*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 3277-1 (1987). *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25 °C*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 1986 (1991). *Leites Determinação do teor de proteína bruta Técnica de Kjeldahl*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 4396 (2002). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de Escherichia Coli. Método corrente*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 469 (2002) *Leites: Determinação de matéria gorda (Técnica de Gerber): Processo corrente*. Lisboa: Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- Nunes, A. (2009). *O Sector do Leite e Produtos Lácteos na Perspectiva da Segurança Alimentar*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Nova de Lisboa.
- O'Connor, C. (1993). *Traditional cheesemaking manual*. ILCA (International Livestock Centre for Africa) Addis Ababa. Ethiopia.
- Ochoa, J. J.; Farquharson, A.J.; Grant, I.; Moffat, L.E.; Heys, S. D.; Wahle KW (2004). Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* 25,1185-91.
- Orden, J.A; Goyache, J.; Hernandez, J.; Domeneche, A; Suarez, G.; Gomez-Lucia, E. (1992). Production of staphylococcal enterotoxin and TSST 1 by coagulase negative staphylococci isolated from ruminant mastitis. *J. Vet. Med. B.*, 39, 144-148.
- Ortega, E.; Abriouel, H.; Lucas, R.; Galvez, A. (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*, 2: 2117-2131.
- Pereira, M. L.; Pereira, J. L.; Serreno, A. M.; Bergdoll, M. S. (2000). *Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos?* *Rev. Higiene Alimentar.*, 44(68/69), 32-40.
- Peresi, J.T.M.; Graciano, R.A.S.; Almeida, I.A.Z.C. (2001). Queijo Minas tipo Frescal Artesanal e Industrial: qualidade macroscópica, microscópica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Higiene Alimentar*, 15(83), 63.
- Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova.*; 27 (2), 293-300 Acedido em Mai. 3, 2012, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19276.pdf>
- Pfeifer, I.; Burger, J.; Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genet.* 5, 30-36.
- Piard, J-C.; Le Loir, Y.; Poquet, I.; Langella, P. (1999). Bactérias lácticas. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 2(8), 80-84.

- Piknova, L.; Krahulcova J.; Kuchta T.(2002). Detection of the cow's milk component in ewe's and goat's cheese using polymerase chain reaction. *Bull. Food Res.* 41,163-167.
- Pinho, O. & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2006). Queijo, um alimento para todas as idades. Entre o queijo tradicional e os novos alimentos funcionais. *Leite I + D + T*, 1, 10-11.
- Pintado, M. E.; Gomes, A. M. & Malcata, F. X. (2008). Laticínios funcionais – Uma revisão sucinta. *Leite I + D + T*, 7, 8-10.
- Pitcher, D.G.; Saunders, N. A.; Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8, 151-156.
- Plath, A. Krause, I.; Einspanier, R. (1997). Species Identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z Lebensm Unters Forsch A*; 205, 437-41.
- Portaria nº 73/90 (1990) de 1 de Fevereiro. *Diário da República nº 27– I Série.* p.436-438
- Rastogi, G.; Dharne, M.; Bharde, A.; Panay, V.S.; Ghumtkar, S.V.; Krishnamurthy, R.; Patole, M.S; Shouche, Y. (2004). Species determination and authentication of meat samples by mitochondrial 12S rRNA gene sequence analysis and conformation sensitive gel electrophoresis. *Curr. Sci.* 87, 1278-1280.
- Ray, B. (2004). *Fundamental food microbiology.* (3th ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Rea, S.; Chikuni, K.; Branciaro, R.; Sangamayya, R.S.; Ranucci, D.; Avellini, P. (2001). Use of duplex polymerase chain reaction (duplex - PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research*; 68, 689-98.
- Reale, S; Campanella, A.; Mergiolli, A.; Pilla, F. (2008). A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of dairy Research*; 75, 107-12.
- Reed, G. (1983). *Biotechnology: A comprehensive treatise in 8 volumes. Volume 5: Food and Feed Production with Microorganisms.* Verlag Chemie GmbH.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 de 15 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia L 338/1.* Comissão Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro. *Jornal Oficial da União Europeia L 322/12.* Comissão Europeia. Bruxelas.
- Reis, J.A.; Hoffmann, P.; Hoffmann, F.L. (2006). Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, em amostras de águas minerais envasadas, comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. *Higiene. Alimentar*, 20(145), 109-115.
- Salvat, G.; Toquin, M. T.; Michel, Y.; Colin, P. (1995). Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *International Journal of food Microbiology* 25, 75-81.

- Santos, J.; Fernandes, P.; Bardslry, R. (2003): Portuguese “PDO“ cheese and species origin of milk. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2, 476–479.
- Schlech, W.F. (1988). Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*. 42(4) 176-178.
- Schwenninger, S. M.; Von, A. U.; Nieder, B.; Teuber, M.; Meile, L. (2005); Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J Food Prot.* 68 (1), 111-119.
- Scott, R. (1991). *Fabricación de Queso*. (2.ed). Espanha: Editora Acríbia S.A.
- Sharf, J.M. (1972). *Exame microbiológico de alimentos*. São Paulo: Polígono.
- Silva, J.E.A. (1992). Contaminação microbiológica como indicadora das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais para a determinação de pontos críticos de controle. Dissertação de Mestrado. São Paulo : Universidade de São Paulo.
- Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A. (1997). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo-SP: Livraria Varela Ltda.
- Spahr, U. & Url, B. (1994). Behaviour of pathogenic bacteria in cheese – A synopsis of experimental data. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 298, 2 – 13.
- Stephens, J.C.; Roberts, I.S.; Jones, D.; Andrew, P.W. (1991). Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. *Journal of Applied Microbiology*, 70(3), 239-244.
- Stiles, M.E.; Holzappel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, 36 (1), 1-29.
- Swaminathan, B. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M. P.; Beucht, L. R.; Montville, T. J. (Ed.). *Food microbiology, fundamentals and frontiers*. (2nd ed) Washington D. C.: ASM.
- Talwalkar, A.; Kailasapathy, K. (2004). Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *Int Dairy J*, 14 (2), 143-149.
- Tornadijo, M. E.; García, M. C.; Fresno, J. M.; Carballo, J. (2001). Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, 18, 499-509.
- União Europeia. (2011). *Eurostat Statistics Explained Agricultural products*. Disponível em: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/. Acedido em: 30 de Junho de 2012.
- União Europeia. (2012). *Agricultura e desenvolvimento rural DOOR - Lista Produtos de Origem Protegida*. Acedido em Jun. 30, 2012, disponível em:

<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html;jsessionid=pL0hL%20qqLXhNm%20FQyFl1b24mY3t9dJQPflg3xbL2YphGT4k6zdWn34!-370879141>:

United States .Food and Drug Administration. (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Acedido em Jul. 10, 2012, disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-toc.html>

United States. Food and Drug Administration. (2007). Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. chapt.6. *Listeria monocytogenes*. Acedido em Jun. 30, 2012, disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>

Unsel, M.; Beyermann, B.; Brandt, P.; Hiesel, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR, Meth. Appl.* 4, 241-243.

Valsechi, O. A. (2001). Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal: O leite e seus derivados. Universidade Federal de São Carlos, Araras – São Paulo. Acedido em Mai. 7, 2012, disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf>

Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, G.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzalez-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, 14, 309-318.

Veloso, A.; Teixeira, N.; Ferreira, M.P.L.V.O.; Ferreira, A. (2002). Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quím. Nova*, 25(4), 609-615.

Vieira de Sá, F.; Machado, B. R.; Pinto, O.P. R.; Carneiro, M. J. D.; Barbosa, M. M. A & Reis, M. M. C. (1970). Maturação em queijos de ovelha Serra e Serpa. *INII-Química e Biologia*, 6, INETI, Lisboa, Portugal.

WDATCP (2002). Fact sheet for food processors: aerobic plate count. Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection. Disponível em: <http://datcp.wi.gov/uploads/Food/pdf/StandardPlateCount.pdf> Acedido em: 30 de Junho de 2012.

Zottola, E.A.; Smith, L.B. (1991). Pathogens in cheese. *Journal Food Microbiology*, 8, 71-182.