UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia; Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa; Instituto Superior Economia e Gestão; Instituto Superior Técnico

EFEITO DA REFRIGERAÇÃO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO SERPA.

Maria Teresa Matado Infante

Dissertação para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador Científico: ***Engenheiro Agrónomo Décia Frazão Caetano Carreira***

Juri

Presidente: ***Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa.***
Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: ***Doutor Artur Armando de Moura Marinho***
Professor Auxiliar da Universidade de Évora

Doutor Fernando D'Almeida Bernardo
Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

Engenheiro Agrónomo Décia Frazão Caetano Carreira
Professora Auxiliar convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa
1998

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia; Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa; Instituto Superior Economia e Gestão; Instituto Superior Técnico

BIBLIOTECA
INSTITUTO POLITÉCNICO
Beja

EFEITO DA REFRIGERAÇÃO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO SERPA.

BIBLIOTECA
DA ESCOLA SUPERIOR
AGRÁRIA DE BEJA
Qou
N.º 9650
10.10.98

Maria Teresa Matado Infante

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador Científico: ***Engenheiro Agrónomo Décia Frazão Caetano Carreira***

Juri
Presidente: ***Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa***
Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: ***Doutor Artur Armando de Moura Marinho***
Professor Auxiliar da Universidade de Évora

Doutor Fernando D'Almeida Bernardo
Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

Engenheiro Agrónomo Décia Frazão Caetano Carreira
Professora Auxiliar convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

22361
BIBLIOTECA DO
INSTITUTO POLITÉCNICO
DE BEJA
N.º 9650
Cota: 637.1 (043.2)
INF (R)(D)

Lisboa
1998

EFEITO DA REFRIGERAÇÃO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PARA A PRODUÇÃO DE QUEIJO SERPA.

RESUMO

A aplicação da refrigeração se por um lado incrementa o tempo de vida útil do leite cru, por redução da actividade microbiana. Por outro cria condições para o aparecimento da flora específica, os microorganismos psicrotróficos, que se caracterizam por uma intensa produção enzimática de proteáses e lipases com efeitos prejudiciais para a qualidade do leite como matéria prima e, consequentemente, para o rendimento em queijo.

O presente estudo realizou-se no Baixo Alentejo, a partir de leite cru de ovelha refrigerado a 4° C e não refrigerado, obtido por ordenha mecânica e proveniente de dois rebanhos de raças distintas: a Merina Branca e a Lacaune.

Este trabalho teve por objectivo primário a detecção da presença de psicrotróficos em leite de ovelha refrigerado e a avaliação dos efeitos proteolíticos em leite destinado à produção de Queijo Serpa.

Efectuaram-se ensaios sobre leite refrigerado durante 12 e 48 h e executaram-se determinações microbiológicas distinguindo 3 temperaturas de incubação dos psicrotróficos (8°, 5° e 3° C), além da flora total a 30° C e pesquisa de coliformes. A avaliação do grau de proteólise de origem psicrotrófica foi feita por Isoelectrofocagem. A genuinidade do leite foi avaliada com base nos seguintes índices fisicos e químicos: acidez, pH, densidade, proteína e matéria gorda.

Obtiveram-se baixos níveis de contaminação em psicrotróficos no decurso das 48 h de refrigeração, o que se atribui aos cuidados higiénicos satisfatórios da rotina praticada em ambas as explorações, na tecnologia de produção do leite. Os efeitos da proteólise detectados por isoelectrofocagem foram irrelevantes.

Palavras chaves: leite de ovelha cru; refrigeração; psicrotróficos; proteáses; isoelectrofocagem; Queijo Serpa.

THE REFRIGERATION EFFECTS IN MICROBIOLOGY QUALITY OF MILK IN PRODUCTION THE SERPA CHEESE

ABSTRACT

The milk refrigeration limits the microbiological activity increasing the keeping quality. It those not prevent the development of the psychrotrophic bacteria which produce high quantities of proteases and lypases. Therefore the quality of the milk as raw material is deteriorated and also the yield in cheese. The work was done at Baixo Alentejo, with raw ewe's milk refrigerated at 4° C and milk not refrigerated, from two herd's and to differents breed's (Merina Branca e Lacaune) using a milking machine. The purpose of the present study is to detect the psychrotrophic in refrigerated raw ewe's milk and their effects on the protein on the milk for Serpa cheese production. Regarding the detection of most favourable for the psychrotrophic development the milk samples where stored at three differents temperatures: 8°, 5° e 3° C. We used the plate counts tests at 30°, 8°, 5° e 3° C and also the presumptive test for cloakrooms. The proteolyses was tested by issoelectrofocusing. The physical and chemical tests: acidity, pH, density, protein and butter fat. The refrigerated raw milk during the 48-h of storage had a reasonable hygienic quality according the counts. The proteolysis effects detected by isoelectrofocusing were irrelevant.

Key words: Ewe milk raw; refrigeration; psychrotrophic; proteases; isoelectrofocusing; Serpa Cheese.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, é com grata satisfação que aqui se expressa o mais profundo agradecimento a todas as pessoas e instituições que de uma forma mais ou menos participativa contribuíram para a sua realização.

À Sr.a Investigadora Principal Engenheira Décia Carreira, na qualidade de orientadora cientifica, é com alguma emoção que dirigimos o nosso profundo reconhecimento e gratidão, pela disponibilidade, empenho e interesse demonstrados desde logo por orientar e delinear esta tese, pelas constantes palavras de incentivo e apoio, assim como da total disponibilização de documentação bibliográfica e ainda pela paciente leitura critica do texto original, a partir da qual emergiram correcções que lhe emprestam uma preciosa valorização.
O seu grande rigor cientifico e sentido prático, bem como a transmissão de imprescindíveis conhecimentos e sugestões de carácter cientifico, tiveram para nós importância crucial no desenrolar do elenco experimental, pelo que lhe testemunhamos a nossa gratidão e admiração.

Ao Sr. Dr. João Fialho, Director da Estação de Melhoramento Animal do Baixo Alentejo, Herdade da Abóboda e ao Sr. Armando Venâncio, proprietário da Herdade dos Coteis, o nosso sincero agradecimento pela amizade, amabilidade e disponibilidade na cedência gratuita das amostras, recurso sem o qual este estudo não teria sido possível concretizar.

Queremos também deixar expresso o nosso profundo agradecimento ao Sr. Engenheiro António Nunes Ribeiro, na qualidade de Director da Escola Superior Agrária de Beja, o simpático acolhimento e as facilidades concedidas, ao disponibilizar recursos técnicos, materiais e laboratoriais tão imprescindíveis na execução deste trabalho.

À Sr.a Mestre Silvina Ferro Palma, à Sr.a Dr. Teresa Santos e ao Sr. Engenheiro João Canada, agradecemos os preciosos ensinamentos e ajuda na montagem de algumas técnicas laboratoriais, bem como pelo apoio bibliográfico dispensado e total disponibilidade com que sempre fomos acarinhados.

À Sr.a Doutora Maria Armanda Almeida, Departamento de Nutrição e Alimentação Animal da Estação Zootécnica Nacional, a nossa sincera gratidão pelo acolhimento, amabilidade e ensinamentos transmitidos relativamente às técnicas electroforéticas.

Ao Sr. Doutor Claudino Matos, Técnico da Estação de Melhoramento Animal do Baixo Alentejo, Herdade da Abóboda, pela permanente disponibilidade e precioso auxilio na realização da análise estatística dos resultados obtidos no estudo e, ainda pela revisão de algumas partes do texto, úteis aconselhamentos e pelas constantes palavras de incentivo e de amizade, o nosso profundo reconhecimento.

À Sr.a Doutora Filomena Nobrega, Investigadora Auxiliar Coordenadora do Departamento de Bioquímica e Fertilidade do Solo da Estação Florestal Nacional, o nosso muito obrigado pela forma carinhosa e interessada com que se empenho em tornar possível a leitura densitométrica das placas de isoelectrofocagem.

À Dr. Catarina Silva, pela amabilidade e simpatia com que sempre nos prestou alguns esclarecimentos técnicos sobre Isoelectrofocagem, queremos manifestar a nossa gratidão.

Ao Sr. Engenheiro António Louro Martíns, professor do Instituto Superior de Agronomia agradeço o apoio bibliográfico facultado.

À Sr.a Engenheira Técnica Alda Fontes o nosso sincero obrigado pela inestimável simpatia, ajuda e disponibilidade por alguns conselhos e ensinamentos práticos de electroforese.

À toda a equipa de pessoal técnico e auxiliar do Departamento de Agro Industrias da Escola Superior Agrária de Beja, nomeadamente à Maria Caetana Borges e Célia Lampreia, pela importante ajuda, amizade e boa disposição vivida no decurso do trabalho experimental, dirigimos o nosso reconhecido agradecimento.

Queremos também expressar o nosso grato reconhecimento à Sr.a Engenheira Técnica Teresa Palma, pela grande amizade que surgiu de longas horas de companhia laboratorial e óptimo convívio, tão importantes nos momentos de maior desânimo, e ainda pela prestimosa ajuda e ensinamentos laboratoriais a que prontamente se disponibilizou.

Aos Senhores meus pais, João e Maria Teresa, pelos sentimentos de amor, dedicação e incentivo que se tornaram uma constante nas palavras que nos dirigiram durante estes dois anos, e ainda, pelos meios financeiros que amavelmente colocaram ao nosso dispor, o nosso grande e reconhecido agradecimento.

O meu sentimento de gratidão é ainda extensível a todos os amigos, cuja amizade, incentivo e ajuda contribuíram para a concretização deste estudo. Um obrigado especial à Renata e António, pela sua ajuda na revisão bibliográfica e revisão ortográfica do texto original.

LISTA DE ABREVIATURAS

h - horas

Gram – - Gram negativo

Gram +- Gram positivo

a.C. - antes de Cristo

ha - hectare

Set. - Setembro

Out. - Outubro

Nov. - Novembro

Dez. - Dezembro

g - grama

Q. do - quadro

fig. - figura

-CN - caseína

u.f.c. - unidade formadora de colónias

UNESUL - Associação Universidade Empresa do Sul

DTT - ditiotreitol

TEMED - **N, N, N', N'** - tetrametiletilenodiamina

PER - persulfato de amónio

Sol. - solução

C.N.E.R.N.A. - Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et L'Alimentation

MSD - Matéria Seca Desengordurada

U. E. - União Europeia

Ser - Serina

Asn - Asparagina

P - Fosfato

Phe - Fenilanina

Met - Metionina

M. S. - Matéria Seca

a. a. - aminoácidos

ÍNDICE

Pág.

Resumo i

Abstract ii

Agradecimentos iii

Lista de Abreviaturas iv

Índice de Figuras x

Índice de Quadros xii

Introdução 1

Capítulo 1. Revisão Bibliográfica 5

1 - Leite - Breve Resenha Histórica 6

2- Produção de Leite no Alentejo 8

2.1- Caracterização da Região 8

2.2 - Evolução do Efectivo 9

2.3 - Caracterização do Sistema de Produção 13

3 - Leite. Definição e sua Importância 16

4 - Composição e Propriedades Físicas e Químicas 18

4.1 - Composição 24

4.1.1 - Água 25

4.1.2 - Proteína 25

4.1.2.1 - Caseínas 27

4.1.3 - Glícidos 40

4.1.4 - Lípidos 41

4.1.5 - Minerais 43

4.1.6 - Biocatalizadores (Vitaminas e Enzimas) 44

4.2- Propriedades Físicas e Químicas 45

5- Caracterização da Flora Microbiana do Leite Cru 48

5.1 - Bácterias Psicrotróficas 52

5.1.1- Actividade Enzimática dos Psicrotróficos 55

5.1.1.2 - Métodos para Avaliação da Proteólise 58

6 - Refrigeração do leite 61
6.1- Finalidade e Eficácia 62
6.2 - Efeitos do Processo de Refrigeração 63
6.2.1 - Ao nível da Composição Física e Química 65
6.2.2 - Ao Nível da Composição Microbiana 68

Capitulo 2. Material e Métodos 72
1 - Regime de Exploração dos Animais 73
2 - Recolha de Amostras 75
3 - Índices Físicos e Químicos 77
4 - Índices Microbiológicos 77
5 - Isoelectrofocagem 80
5.1- Colheita de Leite 80
5.2 - Amostras 80
5.2.1- Separação das Diferentes Fracções Caseínas 80
5.2.2.- Otenção da Caseína do Leite 81
5.2.3- Solução Tampão para Dissolução das Caseínas 82
5.3 - Isoelectrofocagem em Gel de Poliacrilamida - Ureia 82
5.3.1 - Geís de Poliacrilamida-Ureia 82
5.3.2 - Focagem Isoeléctrica 83
5.3.2.1 - Preparação das Soluções Electrolíticas 83
5.3.2.2.- Condições de Isoelectrofocagem 83
5.4 - Coloração das Proteínas 86
5.4.1 - Soluções de Coloração 86
5.4.2 - Coloração 86
5.5.- Densitometria 87
6 - Análise Estatística 87

Capitulo 3. Apresentação e Discussão dos Resultados 91
1- Análise Crítica Genérica 82
2 - Análises Físicas e Químicas 90
2.1 - Variáveis Descritivas 90

2.2 - Análise de Variância 92
Exploração A - Lacaune 92
Exploração B - Merino 95
3 - Análises Microbiológicas 98
3.1 - Variáveis Descritivas 98
3.2 - Análise de Variância 99
Exploração A - Lacaune 102
Exploração B - Merino 105
Resumo 108
4 - Análise Instrumental - IEF 110
4.1- Apresentação de Resultados 110
4.2 - Discussão dos Resultados da IEF 115
Exploração A - Lacaune 115
Exploração B - Merino 120

Considerações Finais 125

Anexos 128
Bibliografia 131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Mapa da área de produção de Queijo Serpa 11

Figura 1.2 - Comportamento dos príncipais constituintes do leite de ovelha durante a fase de lactação (raça Lacaune- região de Roquefort)..... 22

Figura 1.3 - Composição bruta do leite..... 24

Figura 1.4 - Modelo de submicelas (A) e de micelas (B) de caseína (Schmidt, 1982)..... 28

Figura 1.5 - Fracções Caseínicas em % da Caseína total de leite de ovelha. 29

Figura 1.6 - Sequência de resíduos de a. a. da α_{S1}-CN. A variante A_1 corresponde à sequência dos a.a. 141 a 148 (Adaptado de Ferranti et al., 1995)..... 32

Figura 1.7 - Sequência de a.a. da forma longa da α_{S2}-CN. Os a.a. númerados negativamente são os correspondentes ao péptido de sinalização. As zonas sublinhadas indicam locais de restrição de enzimas MboII (GAAGANg), MaeI (C/TAG), Hinf I (G/ANTC) e RSa I (GT/Ac)..... 34

Figura 1.8 - Sequência de a.a. da β-CN. Os a.a. em itálico correspondem à variante B_1 (Richardson et al., 1979)..... 37

Figura 1.9 - Comparação da sequência de resíduos de a.a. da K-CN ovina com a sua homologa bovina. Os a.a. de 1 - 105 e 106 - 171 correspondem à fracção paraKA-caseína e KA-caseínoglçicopéptideo, rtespectivamente. As alterações encontram-se assinaladas por: ▲ - diferenças no conteúdo em N; • - delecção; ▭ - sequência de glícidos obtidos por proteólise enzimática..... 39

Figura 1.10 - Classificação dos microorganismos de acordo com a temperatura óptima de desenvolvimento..... 52

Figura 1.11 - Efeito da temperatura no crescimento dos microorganismos psicrotróficos em leite cru.... 69

Figura 2.1 - Esquema analítico das amostras de leite Lacaune..... 78

Figura 2.2 - Esquema analítico das amostras de leite Merino..... 79

Figura 2.3 - Aplicação das amostras para Isoelectrofocagem..... 85

Figura 3.1 - Rebanho Lacaune. Pesquisa de coliformes nas amostras (xLy) ao longo do período de amostragem (x = 1 a 6) e para tempos de refrigeração diferentes (y toma valores de o, 12 e 48 h)..... 99

Figura 3.2- Rebanho Merino. Pesquisa de coliformes nas amostras (xLy) ao longo do período de amostragem (x = 1 a 6) e para tempos de refrigeração diferentes (y toma valores de o, 12 e 48 h)..... 99

Figura 3.3 - **A)** IEF de cada um dos tipos de caseína, assinalados pelas letras α_{S1} (α_{S1}-CN), α_{S1} + β (α_S-CN + β-CN) e β + K (β-CN + K-CN) e da amostra de leite Merino a partir da qual se realizou fraccionamento ($5M_0$). **B)** Perfil densitométrico de cada uma das diferentes fracções caseínicas [α_{S1}-CN (a), α_{S1}-CN + β-CN (b) e β-CN+ K-CN(c)] e da amostra $5M_0$ (d)..... 111

Figura 3.4 - IEF das amostras de leite Lacaune, identificadas por xLy. As amostras foram recolhidas durante seis períodos (x = 1 a 6) e sujeitas a diferentes tempos de refrigeração (y toma valores de 0, 12 e 48 horas). A amostra P_c, padrão comercial de caseína ovina. O gradiente de pH 4.2 - 5.4; a concentração das soluções de caseína para aplicação no gel: 5.o a 6.0 mg/ml. A posição dos diferentes tipos de caseína está assinalada →..... 111

Figura 3.5 - IEF das amostras de leite Merino, identificadas por xM_y. As amostras foram recolhidas durante seis períodos (x = 1 a 6) e sujeitas a diferentes tempos de refrigeração (y toma valores de 0, 12 e 48 horas). A amostra P_c, padrão comercial de caseína ovina. O gradiente de pH 4.2 - 5.4; a concentração das soluções de caseína para aplicação no gel: 5.o a 6.0 mg/ml. A posição dos diferentes tipos de caseína está assinalada →..... 113

Figura 3.6 - Densitogramas das amostras $5L_o$ (a), $5L_{12}$ (b), $5L_{48}$ (c) e densitograma de comparação (d)..... 116

Figura 3.7 - Densitogramas das amostras $6L_o$ (e), $6L_{12}$ (f), $6L_{48}$ (g) e densitograma de comparação (h)..... 117

Figura 3.8 - Densitogramas das amostras $3M_o$ (A), $3M_{12}$ (B), $3M_{48}$ (C) e densitograma de comparação (D)..... 121

Figura 3.9 - Densitogramas das amostras $1M_o$ (E), $1M_{48}$ (F) e densitograma de comparação (G)..... 122

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 - Evolução do Efectivo Ovino..... 9

Quadro 1.2 - Evolução da Produção de Leite de ovelha e Queijo no Continente..... 10

Quadro 1.3 - Distinção e Distribuição do Efectivo Ovino em Produção na Região de Denominação de origem do Queijo Serpa, referente ao a 1996/97..... 11

Quadro 1.4 - Valores médios dos diferentes componentes do leite de ovelha (%)..... 19

Quadro 1.5 - Composição do leite de ovelha comparado com o de outras espécies..... 20

Quadro 1.6 - Efeitos da raça na composição do leite de ovelha..... 21

Quadro 1.7- Distribuição das substâncias azotadas no leite de ovelha e vaca..... 26

Quadro 1.8 - Características dos leites de vaca e de ovelha..... 45

Quadro 1.9 - Características dos leites de ovelha das raças Merina e Lacaune..... 46

Quadro 2.1- Determinações analíticas efectuadas, com menção para temperaturas e tempos de incubação..... 77

Quadro 2.2 - Condições de Isoelectrofocagem..... 85

Quadro 2.3 - Soluções de coloração..... 86

Quadro 3.1 - *Rebanho Lacaune*. Estatísticas descritivas para a Acidez, pH, Densidade, Proteina e Gordura em função do tempo de refrigeração (0, 12 e 48 h)..... 90

Quadro 3.2 - *Rebanho Merino*. Estatísticas descritivas para a Acidez, pH, Densidade, Proteina e Gordura em função do tempo de refrigeração (0, 12 e 48 h)..... 90

Quadro 3.3 – *Rebanho Lacaune*. Fontes de variação, graus de liberdade (G.L.), valor de F, coeficiente de variação (C.V.) e coeficiente de determinação (R^2) para as características fisicas e químicas do leite..... 92

Quadro 3.4 - *Rebanho Lacaune*. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão dos parâmetros físicos e químicos para as variáveis período de amostragem e tempo de refrigeração (0, 12 e 48 horas)..... 93

Quadro 3.5 - *Rebanho Merino*. Fontes de variação, graus de liberdade (G.L.), valor de F, coeficiente de variação (C.V.) e coeficiente de determinação (R^2) para as características físicas e químicas do leite..... 95

Quadro 3.6 - *Rebanho Merino*. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão dos parâmetros físicos e químicos para as variáveis período de amostragem e tempo de refrigeração (0, 12 e 48 horas)..... 92

Quadro 3.7 - *Rebanho Lacaune*. Estatísticas Descritivas referentes à contagem de microorganismos Coliformes (Coli), Mesófilos (Meso), Psicrotróficos (P), a três temperaturas de incubação (8°, 5° e 3° C) e a diferentes tempos de refrigeração (0, 12 e 48 h)..... 98

Quadro 3.8 - *Rebanho Merino*. Estatisticas Descritivas referentes à contagem de microorganismos coliformes (coli), Mesófilos (Meso), Psicrotróficos (P), a três temperaturas de incubação (8°, 5° e 3° C) e a diferentes tempos de refrigeração (0, 12 e 48 h)..... 98

Quadro 3.9 - *Rebanho Lacaune*. Fontes de variação [graus de liberdade (G.L.), valores de F, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de variação (C.V.)] para microorganismos Coliformes (Coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8, log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação de Psicotróficos pelos Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)]..... 102

Quadro 3.10 - *Rebanho Lacaune*. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão (X±EP) em função do período de colheita e tempos de refrigeração para os microorganismos Coliformes (coli), Logaritmo de Mesófilos log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8, log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação de Psicotróficos/ Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)]..... 104

Quadro 3.11 - *Rebanho Merino*. Fontes de variação [graus de liberdade (G.L.), valores de F, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de variação (C.V.)] para microorganismos Coliformes (Coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8, log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação de Psicotróficos/ Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)]..... 105

Quadro 3.12 - *Rebanho Merino*. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão (X±EP) em função do período de colheita e tempos de refrigeração para os microorganismos Coliformes (coli), Logaritmo de Mesófilos log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8, log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação de Psicotróficos/ Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)]..... 107

Quadro 3.13 - Quantificação dos picos do densitograma da fig. 3.1. e atribuição do tipo de caseína correspondente..... 110

Quadro 3.14 - Contagens de psicrotróficos a 8° C, referentes às amostras quantificadas por densitómetro..... 115

Quadro 3.15 - Proporção relativa dos picos dos densitogramas da fig. 3.4. a, b, c, e, f, g, e correspondência com os diferentes tipos de caseína..... 118

Quadro 3.16 - Valores das contagens de psicrotróficos a 8° C referentes às amostras quantificadas por densitómetro..... 120

Quadro 3.17 - Proporção relativa dos picos dos densitogramas da fig. 3.4. a, b, c, e, f, g, e correspondência com os diferentes tipos de caseína..... 123

INTRODUÇÃO

É lugar comum que o leite, de qualquer espécie, é um substracto ideal para o desenvolvimento de microorganismos cujo metabolismo necessariamente que afecta o equilíbrio estrutural do produto destinado a ser consumido em natureza (no estado líquido) e transformado, designadamente sob a forma de queijo fresco e curado.

Múltiplos estudos são conhecidos tendo por objectivo identificar os vários grupos de microorganismos, com ênfase para os tipos de bactérias predominantes. Em paralelo investigam-se os efeitos específicos de cada grupo, tipo ou microorganismo isoladamente.

Estes estudos incidem, como é obvio, em leite de vaca dada a expansão que tem na alimentação humana, suscitando preocupações quanto às alterações detectadas no leite, como matéria prima e nos produtos acabados, nas diferentes fases do respectivo circuito comercial, alterações consequentes do metabolismo microbiano.

Contudo as investigações de natureza microbiana em leite de outras espécies (cabra, ovelha, bufala, camela e rena), designadamente o leite dos pequenos ruminantes, estão merecendo o interesse dos investigadores e tecnologistas, tomando em consideração a necessidade de diversificar os produtos lácteos a obter, formando uma mais valia para a exploração agrícola, principalmente nos países com tradição na criação de ovinos e caprinos localizados na orla mediterrânica.

O presente estudo constitui uma contribuição para o melhor conhecimento do leite de ovelha, sob o ponto de vista microbiológico, destinado à produção do Queijo Serpa, face ao interesse económico regional deste tipo de queijo e acerca do qual se dispõe de diminuta informação sobre a respectiva caracterização.

Aliás este aspecto assim como o da tecnologia do leite dos pequenos ruminantes, particularmente, o da ovelha, está pouco estudado tanto em Portugal como noutros países devido ao respectivo aproveitamento estar restrito à produção de queijo e de requeijão.

Acresce destacar que o Queijo Serpa, tradicionalmente de produção artesanal a partir de leite de ovelha das raças Merina e Campaniça, passou gradualmente a ser produzido a partir de leite de outras raças que não as locais, nomeadamente a Lacaune e Serra da Estrela, as mais especializadas raças leiteiras.

O problema do Queijo Serpa situa-se pois na composição química do leite, a par da composição microbiológica e relacionados com os outros factores condicionantes (raça, sanidade animal, alimentação, maneio, clima) e práticas tecnológicas aplicadas, as quais estão a ser profundamente alteradas sem fundamento cientifico. Pode mesmo afirmar-se que os fundamentos são empíricos e com manifesto prejuízo para a típicidade respectiva.

É evidente que a qualidade da matéria prima é decisiva para garantir a excelência do produto final, de acordo com as exigências dum mercado conhecedor acerca das características condicionadas pelo equilíbrio físico, químico e microbiológico.

Uma das práticas introduzidas com tendência a generalizar-se, é a refrigeração do leite a nível das explorações, por períodos de 48 h/4° C, para controlo do desenvolvimento da flora microbiana proveniente da contaminação inicial e inevitável no decurso das diferentes etapas de produção do leite. Esta prática altera a composição microbiana dos grupos predominantes relativamente à composição quando o leite é mantido à temperatura ambiente antes de ser transformado.

Os psicrotróficos são definidos como microorganismos que se desenvolvem a ± 7° C. Não constituem um grupo taxonómico especifico. Pertencem pelo menos a 15 géneros diferentes isolados a partir do leite e produtos lácteos , mas o género Pseudomonas domina na maioria dos casos (Thomas e Thomas, 1973).

A sua presença afecta prejudicialmente o poder de conservação do leite cru mantido à temperatura de refrigeração (isto é, a finalidade da refrigeração do leite cru na produção é a manutenção das propriedades originais até ao momento de tratamento ou de transformação). Embora os microorganismos sejam sensíveis ao calor e sejam mortos pela pasteurização produzem enzimas termolábeis proteolíticas e lipolíticas (Adams et al., 1976, Law et al, 1977) que dão origem a lipólise e proteólise com efeitos desagradáveis no leite e produtos lácteos. Leites de qualidade higiénica aceitável mantém-se em condições durante 48 h de armazenagem mas além deste

vezes é necessário armazenar o leite por períodos mais longos e por isso torna-se necessário impedir o desenvolvimento de psicrotróficos.

A matéria prima usada foi o leite de 2 rebanhos e de 2 raças distintas de ovelhas: a Lacaune e a Merina Branca, em diferentes regimes de exploração.

Todo o trabalho visou uma prospecção para leite de ovelha, destinado ao fabrico de Queijo Serpa no Baixo Alentejo, tomando em consideração as temperaturas de conservação do leite antes de fabricar o queijo. Os objectivos pretendidos foram:

- avaliar a carga microbiana psicrotrófica no leite de ambas as explorações, refrigerado durante 12 h e 48 h, quando sujeitos a três temperaturas de incubação, a partir da qual poderá ser prejudicado no seu equilíbrio físico e químico;
- avaliar se os níveis psicrotróficos existentes terão sido suficientes na detecção de proteólise de origem enzimática;
- avaliar a temperatura mais adequada à imobilização da flora psicrotrófica.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- LEITE - BREVE RESENHA HISTÓRICA

Desde o princípio da história da humanidade que o leite terá vindo a ser incluído nos hábitos alimentares do homem. Muito embora o consumo regular provavelmente remonte ao período Mesolítico (10.000 e 8.000 a.C.), momento em que o homem se sedentariza, dá início à actividade silvo-pastorícia, domesticando e mantendo em cativeiro os animais que captura (Meyer, 1969) (cit. Amiot, 1991).

Trémolíers (1973) considera que terá sido nesta altura que homem ocidental iniciou a domesticação de animais como a ovelha, a cabra, a camela, o bovino, a rena, o cavalo, o cão e o porco, na sua maioria vindos do Oriente (cit. Amiot, 1991). A Mesopotamia, segundo Androuët et al. (1978), é considerada o berço da domesticação ovina e remonta ao 11° milénio a.C.

Testemunhos arqueológicos de há 4 ou 5 mil anos antes de Cristo, confirmam-nos que desde logo o homem se apercebeu que o leite de mamíferos fêmeas possui reconhecido valor alimentar, aliado à circunstância de ser de fácil aquisição. Chegou mesmo a atribuir-se-lhe propriedades sagradas (Davis, 1965; Rebelo, 1983).

A própria Bíblia faz alusão ao valor inestimável deste precioso líquido. Adquiriu tal importância que os Hebreus calculavam a fortuna dos proprietários de acordo com a quantidade de leite fornecida pelos rebanhos de que eram possuidores (Androuët et al.,1978).

Se é certo que o leite entrava no regime alimentar humano, por consumo directo, com o andar dos tempos e sem saber concretamente onde e quando, o Homem terá descoberto de forma casual que o poderia consumir transformado sob a forma de queijo e de manteiga.

Davis (1965) refere que provavelmente os mais antigos registos são os da Babilónia relativos ao ano de 2.000 a.C. que fazem menção ao leite, ao leite fermentado (ácido), à manteiga e ao queijo.

A história da Grécia refere a utilidade da ovelha na produção de lã, carne e leite, à semelhança da cabra. Só mais tarde se faz referência à vaca como espécie produtora de leite. No entanto, mais

uma vez, os achados arqueológicos sustentam a afirmação de que há 6.000 anos atrás se ordenhavam as vacas para cântaros de grande capacidade; parece, contudo, que esta prática poderá ter ocorrido mais cedo (Davis, 1965).

No que diz respeito aos ovinos não se sabe exactamente quais as origens da exploração destes na produção de leite (Assenat, 1985). Contudo sabe-se que as ovelhas acompanharam sempre de perto o progressos de várias civilizações, tendo um importante papel na vida e cultura religiosa dos povos.

Existem dados bibliográficos referentes a leites de outras espécies de mamíferos com poderes medicinais, tais como os leites de égua e burra. O primeiro era usado pelos povos nómadas das estepes do sul da Rússia e do interior da Ásia, que a partir deste preparavam uma bebida fermentada - Kumys, a qual curava certas doenças. O segundo por possuir elevado valor energético, devido à sua riqueza em açúcar, era habitualmente ingerido em situações debilitantes.

Saliente-se ainda a importância que o leite de camela tinha para os povos Tártaros, na obtenção de uma espécie de aguardente ou leite espumoso (Soroa, 1980).

Desde há cerca de vinte e cinco anos que o interesse pela produção ovina tem vindo a aumentar no mercado mundial, essencialmente no que se refere ao leite e à carne (Martins, 1989). O leite de ovelha , ainda segundo este autor, "foi sempre considerado como tendo características específicas e, em muitos casos, tido como leite mais nobre que os outros".

O leite de ovelha raramente terá sido utilizado para consumo directo, quer num passado remoto quer mais recentemente em algumas zonas do mundo. Era e é sim, utilizado na laboração de queijo e de produtos fermentados (Godina, 1986). Embora industrialmente fosse possível prepará-lo e colocá-lo no mercado em condições semelhantes ao que acontece com o leite de vaca, no entanto, esta vertente nunca se desenvolveu (Balastre e Mittaine, 1971).

Nos países ao sul do Mediterrâneo e do Médio Oriente, produz-se leite de ovelha para consumo em natureza, onde é tido como importante fonte proteica de origem animal, de fácil aquisição, enquanto que nos países a norte do Mediterrâneo e Balcânicos a importância desta produção assume proporções crescentes dado que a mais valia é obtida a partir da produção de queijo (Ordoñez, 1971; Matallana e Ballester, 1978).

2 - PRODUÇÃO DE LEITE NO ALENTEJO

2.1 - CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO

O Alentejo é notável pela enorme extensão de planuras, que pontualmente aqui e ali se interrompem por outeiros, onde floresce a mais bela e pitoresca das paisagens.

Pedológicamente, caracteriza-se por uma grande variedade de solos, desde os esqueléticos e delgados de xistos até aos mais ricos e produtivos argilo-calcários (Bettencourt, J.,1968).

A estrutura fundiária assenta no latifúndio, parcelas designadas por herdades cujas áreas estão, de uma maneira geral, compreendidas entre 500-1000 ha. No entanto, nalguns casos, poderão atingir os 5000 ha.

Nos melhores terrenos pratica-se ainda uma agricultura tradicional, que contempla a intensa cultura cerealífera, embora nos últimos anos, na sequência de diferentes orientações da política agrícola da Comunidade, se tenha assistido à introdução de novas culturas como alternativa à pratica do antigo sistema de exploração da terra. Os terrenos marginais, por terem menor aptidão agrícola, são aproveitados na exploração ovina extensiva.

Em termos climáticos a região é predominantemente influenciada pelo clima mediterrâneo. Os registos de menores quedas pluviométricas coincidem com as altas temperaturas dos meses estivais (amplitude térmica 30° - 40° C); é durante os meses de inverno, de temperaturas relativamente baixas (6° - 8° C), com possibilidade de ocorrência de geadas, que se verificam as quedas pluviométricas em maior número e quantidade (Speedy, 1980; Gonçalves, 1982).

A conjuntura dos factores edáfo-climáticos e pedológicos que caracterizam esta região tornam-na limitante no desenvolvimento de uma regular e abundante produção herbácia. Daí que a espécie animal com maior representatividade no povoamento do Alentejo seja a ovina, com menor expressão a espécie bovina. Esta predominância do ovino justifica-se, em parte, pelas menores necessidades e melhor aptidão para o aproveitamento dos parcos recursos naturais. Esta circunstância condiciona a dimensão da propriedade e, por consequência, as disponibilidades em

massa forrageira, permitindo o encabeçamento de efectivos ovinos de dimensão e aptidão produtiva adequada (Speedy, 1980; Bettencourt, J., 1968).

2.2 - EVOLUÇÃO DO EFECTIVO OVINO

A ovinicultura tem sofrido evolução ao longo dos tempos. Após os anos 30 verificou-se uma substancial redução dos efectivos, motivada pelas transformações ocorridas nos sistemas de produção agro-pecuários e pela escassez de mão de obra especializada no manejo. Chegou até, ser posta em causa a continuidade desta actividade no Alentejo.Também a política desenvolvida de apoio preferencial à bovinicultura, com o objectivo de aumentar a baixíssima capitação portuguesa do consumo de leite, atraiu o agricultor em desfavor da ovinicultura e caprinicultura. A situação só estabilizou a partir de 1972 e, no início da década de 80, surgiram então sinais evidentes de que a população ovina estava em evolução crescente (Bettencourt, J., 1989; Borrego, 1990; Sobral, 1993).

Quadro 1.1 - Evolução do Efectivo Ovino.

		1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Alentejo	Total Ovinos	1707	1717	1710	1674	1758	1761	1737
	Ovelhas*	1106	1123	1120	1104	1152	1157	1139
País	Total Ovinos	3.360	3.380	3.348	3.305	3.416	3.414	3.380
	Ovelhas*	2.227	2.260	2.253	2.222	2.289	2.292	2.265

unidades: 1000 cabeças Fonte: INE

* incluem-se também as borregas cobertas

À excepção do decréscimo acentuado em 1993 e das ligeiras diminuições em 1992 e 1996, a evolução crescente do número de ovinos é uma realidade dos últimos anos (Q.do 1.1), tanto na região do Alentejo como a nível nacional. Os efectivos do Alentejo relativamente ao total dos efectivos do país, detêm uma representatividade de cerca de 50 %, o que justifica a vincada importância desta actividade na região. Dai que alterações no número de animais, como as ocorridas nos anos já mencionados se tenham também repercutido ao nível nacional.

A importância económica da produção de leite, em termos percentuais, tem vindo a aumentar desde 1972, como o atestam os trabalhos realizados por Ribeiro et al., (1982), e aproxima-se dos valores relativos à produção de carne, dado o inflaccionamento do preço do leite. Em contrapartida a produção de lã diminuiu percentualmente, em virtude do aparecimento de outras matérias primas alternativas para a indústria têxtil, o que levou a que a procura de mercado diminuísse e a produção fosse votada ao abandono.

É evidente o incremento da produção de leite (Q.do 1.2), nos últimos anos devido ao crescente número de animais à ordenha que, excepcionalmente para os anos 1993 e 1996, registou uma quebra (Q.do 1.1). O aumento do número de animais deve-se fundamentalmente à maior procura e consequente valorização do queijo, com repercussões no elevado preço a que o leite é comercializado. Por outro lado, a influência dos apoios comunitários e estatais, tornaram o ambiente económico mais favorável e os criadores sentiram-se motivados para aumentar a dimensão dos efectivos (Calheiros, 1992) ou, nalguns casos, iniciar-se nesta actividade.

A inexistência de elementos numéricos que caracterizem a actual produção de leite na região do Alentejo, suscitou o interesse em dar uma contribuição para o cálculo da estimativa respectiva recorrendo ao levantamento restrito do alavão 96/97, direccionado apenas à região de denominação de origem do Queijo Serpa (fig. 1.1). A informação que serviu de base aos valores estimados foi recolhida na Associação de Criadores de Ovinos do Sul (ACOS), nos Agrupamentos de Defesa Sanitária (ADS) e no Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola (INGA).

Quadro 1.2 - Evolução da Produção de Leite de ovelha no Continente.

Anos	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Prod. leite (1000 l)	87.906	89.210	93.138	94.380	97.197	97.592	96.228

Fonte: INE

A quantidade de leite produzido nesta zona geográfica, segundo a ACOS no alavão[1] 95/96, terá sido de 2.500.000 litros de leite, produzido num total de 2.810 explorações com 547.630 animais, dos quais só terão sido ordenhados cerca de 15%. No alavão transacto (96/97) estimou-se que a

[1] Período de produção sazonal do leite de ovelha.

Figura 1.1- Mapa da área de produção de Queijo Serpa.

(Dec.Reg. n.º 39/87)

Quadro 1.3 - Distinção e Distribuição do Efectivo Ovino em Produção na Região de Denominação de origem do Queijo Serpa, referente ao a 1996/97.

Concelhos	Ovelhas de Carne		Ovelhas de Leite	
	n.º de produtores	n.º animais	n.º de produtores	n.º animais
Aljustrel	142	23.000	1	600
Almodovar	341	37.667	9	2.873
Alvito	81	12.741		
Beja	241	40.155	8	3.431
Castro Verde	201	31.247	4	925
Cuba	79	7.727	1	340
Ferreira do Alentejo	213	33.128		
Mértola	348	77.208	25	9.477
Moura	256	21.213	5	2.752
Ourique	293	32.387		
Serpa	511	62.633	28	5.956
Vidigueira	124	16.616	1	183
Freguesias				
Colos	44	6.377		
Vale de Santiago	26	5.989		
Abela	49	7.142	1	400
Alvalade	43	8.389		
São Domingos	43	5.463		
Azinheira B.S.Mamede	32	6.616		
Torrão	76	14.154		
TOTAL	3.143	449.852	83	26.937

Fonte: INGA

produção de leite foi aproximadamente de 4.600.000 l, dos quais cerca de 4.238.000 l foram obtidos num total de 83 explorações (Q.do 1.3) com 26.937 fêmeas especializadas neste tipo de produção. Os restantes litros de leite foram obtidos a partir da ordenha de 3.5% dos efectivos de raça Merina, num total de 449.852 ovelhas de diversas raças destinadas à produção de carne.

Caracterizar a produção de leite, em termos numéricos reais, é tarefa árdua para não dizer impossível. Pois a problemática que envolve esta questão é complexa e difícil de contabilizar. Esta prende-se com as condições climáticas serem ou não propícias a um bom desenvolvimento das pastagens, condicionando a duração do alavão, especialmente nas raças autóctones; a não regularidade sistemática dos efectivos à ordenha; a precoce ou tardia ordenha dos efectivos locais conforme a procura de borregos canasta para o mercado espanhol; a diversidade de raças que actualmente contribuem para a produção de leite na região D.O.P. do Queijo Serpa e a exploração para leite de alguns efectivos de raça Merina, durante um período muito curto do pós-desmame e que tem apenas em vista o fabrico de queijo para consumo caseiro. Acrescem as dificuldades na obtenção de informação que permitam identificar com precisão de entre os criadores de ovinos, potencialmente vocacionados para a produção de carne, quais os produtores de raças locais, que exploram estes também na sua vertente leiteira, alcançando a mais valia através da venda directa do leite.

O queijo Serpa tradicional, que outrora era produzido a partir do leite proveniente das raças ovinas locais, designadamente a Merina Branca e Preta, e Campaniça, é actualmente e perante a enorme diversidade de etnias que assolam a região demarcada deste produto, obtido com leite de origens várias. Do total de leite produzido no alavão e região em estudo, referimos com algumas reservas que, 87 % é proveniente da raça Lacaune, 5.5 % da raça Serra da Estrela, 3.5 % da raça Merina, 3.39 % da raça Manchega e 1.9 % da raça Awassi. Confrontados com esta realidade, e com a consciência de que algumas das raças locais já estão em vias de extinção, como é o caso da Campaniça. Só 11 criadores têm os seus animais inscritos no livro Genealógico (Conduto, 1997) e, segundo julgamos saber, nenhum foi explorado na vertente leiteira, no alavão 96/97.

Assim sendo, resta nos apenas louvar os criadores que têm sabido manter os efectivos de raças autóctones, pese o maior ou menor esforço dispendido, ficando à margem da desregrada utilização de raças exóticas de que o Alentejo é hoje palco.

2.3 - CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO

Há algumas décadas atrás a exploração ovina no sul estava entregue a si própria, devido a um agrarismo que a confinava aos espaços não ocupados por outras culturas. A alimentação animal era feita à base de: pastoreio expontâneo das terras incultas (baldios e pousios), restolhos das arvenses, pastagens de sub-coberto dos montados de azinho e sobro, que nas épocas outonais se enriqueciam por fornecerem o suplemento da bolota e lande (Bettencourt J., 1968).

As raças ovinas locais que aqui predominavam eram a Merina Branca e a Preta bem como a Campaniça, em rebanhos que contavam com efectivos médios de 300 a 500 cabeças (Bettencourt, C., et al., s/data). Estas raças autóctones de aptidão tripla - carne/leite/lã - permitiam aos proprietários uma exploração predominantemente orientada para a produção de carne, mas também fazê-la na sua vertente leiteira (Bettencourt J., et al., s/data; Bettencourt J.,1989).

O esquema tradicional de produção de ovinos previa que, nas terras de melhores pastagens, os nascimentos ocorressem em Set/Out e nas pastagens temporãs das terras de xisto, em Nov./Dez. A venda dos borregos fazia-se no Natal e na Páscoa, conforme a ocorrência dos nascimentos e por se tratar de épocas mais favoráveis de venda (Bettencourt J., 1968), época em que se iniciava a ordenha manual dos efectivos e que se prolongava por um período de 90 a 120 dias.

A produção unitária das raças locais era de cerca de 30 l/Lactação. O rendimento bruto conseguido resultava do significativo número de animais à ordenha e do elevado preço por litro de leite e queijo produzido (Bettencourt J., 1989). Era prática corrente, que os criadores, com um número considerável de ovelhas, praticassem o alavão desde meados do mês de Novembro até ao fim do mês de Maio, produzindo eles próprios o queijo. Faziam uso de técnicas próprias de rouparia e que constituíam "verdadeiros segredos de tradição familiar, o que permitia que fossem distinguidos como imagem de marca" (Sobral, 1993).

De há muito que os alentejanos têm largos conhecimentos sobre a qualidade lactopoiética do leite das raças autóctones, como matéria prima para o fabrico do queijo designado por "Queijo Serpa", que tão afamadas características em si encerra e por isso goza de alto prestigio no comércio nacional.

Os pastores, antes do início do "alavão", dedicavam-se previamente: à preparação dos animais, executando a "rabeja" [2] como medida de higiene animal, e à construção improvisada de um lugar de confinamento dos mesmos, a céu aberto, de formato rectangular, designado por "aprisco", o qual poderia ser construído de rede, molhos de ramalhos, giesta ou outros materiais da região. A ordenha realizava-se neste local duas vezes ao dia, intervalada cerca de 10 horas, com a técnica, a calma e o saber que só o pastor detém, e jacto atrás de jacto de leite ia enchendo o "ferrado"[3] (Camões, A., 1901).

O leite obtido era coado, através de panos de algodão ou de lã, antes de ser vertido para as bilhas de transporte. Esta prática justifica-se porque é vulgar que, durante a ordenha, caiam substâncias estranhas que conspurcam o leite (palha, cabelos, insectos, etc.). Alguns animais chegam mesmo a dejectar na hora.

Presentemente, a exploração ovina assenta em moldes tradicionais, mas com a introdução do desmame precoce (30-45 dias) e por cruzamentos com raças melhoradoras da função creatopoiética, intensificou-se não só a criação de borrego como também se conseguem, por lactação, volumes de leite mais elevados.

A ordenha, na maior parte das explorações dedicadas à produção de leite da raça Merina, continua a ser feita manualmente, mas agora de forma menos penosa para o operador. Os apriscos são construídos ao abrigo da chuva e do frio, envolvendo mesmo, por vezes, a construção de telheiros em betão. Nas explorações cujos proprietários possuem conhecimentos técnicos e se encontram melhor informados, já se dispõe de pequenas unidades móveis de ordenha.

Alguns criadores, no intuito de obterem melhores rendimentos leiteiros, substituíram as raças locais por raças especializadas nesta produção, quer nacionais, como a bordaleira Serra da Estrela, quer estrangeiras, como a Lacaune, Manchega e, pontualmente, a Awassi, como é notório nos dados apresentados no sub capitulo anterior. Em certas regiões verifica-se mesmo um domínio completo das raças não locais sobre as locais. Perante esta escolha, substituíram a ordenha manual por um sistema mais eficiente e higiénico que é a ordenha mecânica. Ao mesmo tempo, tiveram que adoptar sistemas de alimentação animal que melhor respondessem às maiores exigências

[2] - tosquia da zona lanar circunscrita ao úbere e região pélvica.
[3] - vasilha de metal adequada à ordenha de pequenos ruminates.

nutritivas, tais como a melhoria das pastagens naturais, com práticas correctivas e de fertilização; sementeiras de pastagens de alto valor proteico e forragens irrigadas, bem como o recurso a alimentos compostos (Bettencourt J., et al, s/data; Calheiros, 1992).

3 - LEITE. DEFINIÇÃO E SUA IMPORTÂNCIA

O leite surge no mundo como parte integrante da alimentação. A sua função biológica é fornecer protecção nutricional e imunológica aos seres mais jovens. Nalgumas espécies, constitui o único alimento nos primeiros tempos de vida dado que as respectivas características nutritivas suplantam as necessidades de manutenção e crescimento (Jenness, 1985; Soroa, 1980).

As várias definições de leite são as seguintes:

Sob o ponto de vista zootécnico, atribui-se esta designação ao "liquido branco, de sabor adocicado segregado pelas glândulas mamarias das fêmeas dos mamíferos, depois do parto e do período de colostro [4] " (Martins, 1989).

A designação de leite cru é atribuida ao leite produzido pela secreção da glândula mamária de uma ou várias vacas, ovelhas, cabras ou búfalas, e não aquecido a uma temperatura superior a 40° C nem submetido a um tratamento de efeito equivalente (Portaria 533/93).

Atendendo especificamente aos interesses do consumidor e industriais, que de uma forma geral são abrangidos pela legislação em vigor, considera-se *leite alimentar* o leite cru destinado ao consumo humano, de forma directa ou indirecta, produzido por animais saudáveis, bem alimentados, não fatigados, mantidos em bom estado de higiene, e que satisfaça os seguintes requisitos:

- ser produto integral da ordenha completa e ininterrupta;
- não conter colostro (nos 5 dias seguintes ao parto não é considerado leite);
- isento de coloração, cheiro e sabor anormais;
- ser colhido, conservado e transportado de acordo com as observações prescritas no regulamentos;
- não conter microorganismos patogénicos, pus, sangue, nem substâncias estranhas à sua composição química original.

[4] - Primeiro líquido segregado pelas glândulas mamárias, logo após o parto e durante alguns dias (4 ou 5), possui propriedades nutritivas, imunológicas e laxativas especificas que conferem ao recém nascido maior resistência a enfermidades (Soroa. 1980).

A designação genérica deste fluido biológico, aqui mencionada, diz respeito única e exclusivamente ao leite de vaca. Os leites produzidos por outras fêmeas de animais domésticos serão sempre designados pela junção do nome da espécie correspondente.

O leite é considerado por muitos estudiosos na matéria um excelente meio nutritivo e potencial despoletador do crescimento microbiano (Amiot, 1991). Em virtude disto e no decurso dos avanços tecnológicos, tornou-se de uma importância crucial para a saúde a aplicação da máxima higiéne no momento da produção, bem como nas restantes etapas (conservação, transporte e distribuição). Por este facto o leite de vaca só foi introduzido na alimentação infantil no início deste século (Porter, 1975) (cit. Amiot, 1991).

Faz parte das prescrições médicas para indivíduos debilitados, dietas de desportistas, refeições de crianças e adultos (Soroa, 1980). Estando de tal modo enraizado nos hábitos gastronómicos do povo que constituem tema de provérbios.

Pode concluir-se que o leite encerra em si características próprias que permitem designá-lo como alimento quase completo. Como curiosidade, poder-se-à comparar o respectivo valor alimentar com o de outros alimentos correspondentes: assim, um litro de leite é equivalente a: 450 g de carne magra, 10 ovos, 140 g de bacalhau, 2,2 Kg de nabos e 900 g de linguado (Carreira, 1997).

O leite de vaca é, sem sobra de dúvidas, o mais estudado, devido à sua importância na alimentação humana e, consequentemente, ao maior interesse económico. No entanto, nos países com fracos recursos pedológicos e parcas pastagens, a ovelha é tida como vocacionada para essas zonas e o leite tem sido objecto de estudo tomando como referência o de vaca (Martins, 1989).

4- COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

De há muito que a composição do leite é área de intensa pesquisa por parte de investigadores. No entanto, só a partir de 1880, e graças à física, à química e à microbiologia, foi possível a descoberta progressiva dos componentes de tão complexo fluído (Rebelo, 1983).

É notória a escassez de bibliografia respeitante aos lacticínios e, em especial, aos estudos dedicados ao leite de ovelha, sendo os que existem geralmente elaborados por países vocacionados para a exploração deste pequeno ruminante que é a ovelha.

A percepção sensorial do leite de ovelha permite defini-lo como um líquido branco, opaco, duas a três vezes mais viscoso que a água, devido à riqueza em gordura e proteína, de sabor adocicado e odor acentuado (Luquet, 1985), caracterizado em Portugal por "bedum".

Trata-se de um fluido biológico extremamente complexo, constituído por um elevado número de componentes: água, compostos azotados (com destaque para a caseína), glícidos (lactose), gordura, sais minerais, vitaminas (Soroa, 1980), enzimas, pigmentos, oligoelementos e outros compostos vestigiais (Luquet, 1985).

Quimicamente o leite pode ser definido como uma emulsão de gordura em solução aquosa de lactose (5 %), de sais minerais (0.7 %) e de outros componentes em estado de dissolução, e com substâncias azotadas (3.2 %) em suspensão coloidal (Amiot 1991).

A composição média dos principais constituintes do leite de ovelha é nos apresentada por Martins (1989) num quadro resumo (Q.do 1.4) panorâmico do que se tem feito, sobre esta matéria. No quadro 1.5, observam-se as composições por comparação com diferentes espécies (Carreira, 1980).

Da análise dos dados dos quadros constata-se que a composição do leite de ovelha é bastante variável e comparativamente ao leite de referência (vaca) apresenta um conteúdo mais elevado em sólidos totais, designadamente em proteína, matéria gorda e sais minerais, sendo o teor em lactose

Quadro 1.4 - Valores médios dos diferentes componentes do leite de ovelha (%)

M. G.	Proteína	Caseína	Lactose	Cinza	Res. S. Total	Ca	P	Cl	Mg	Referências
7.5	6.0	4.6	4.5	-	19.1	0.2	0.15	0.1	0.016	Alais (1985) França
7.92	6.19	-	4.86	0.91	19.98	-	-	-	-	Anifantakis et al. (1980) Grécia
7.19	5.59	4.53	4.66	0.90	18.40	-	-	-	-	Assenat (1985) França
6.88	5.74	-	4.59	0.95	17.80	-	-	-	-	Baltadjieva et al. (1982) Gré. - Bul.
6.11	6.25	-	-	0.97	17.34	-	-	-	-	Dozet et al. 1974) Jugoslávia
7.60	5.87	5.12	4.43	0.976	19.51	0.137	-	0.089	0.019	Holtein (1983) Portugal
7.31	5.65	-	4.27	0.94	17.60	-	-	-	-	Juarez et al. (1982) Espanha
7.51	6.0	4.86	-	-	19.31	-	-	-	-	Mahieu et Jaouen (1976) França
8.04	6.80	-	-	-	19.31	-	-	-	-	Malosssini (1963) Itália
7.43	5.46	-	4.69	0.91	18.85	-	-	-	-	Martinez-Castro (1972) Espanha
6.8	5.70	4.36	4.61	0.93	18.20	0.197	-	0.15	0.019	Martins (1989) Portugal

Fonte: Extraido de Martins (1979) (Ganguli,1971; Ramos e Juarez, 1981; Holtein, 1983; Alais, 1985; Assenat, 1985; Aninfantakis, 1986).

praticamente idêntico. Tem ainda a particularidade de ser o que fornece maior quantidade de calorias, mas evidentemente é de todos o mais pobre em água.

Quadro 1.5 - Composição do leite de ovelha comparado com o de outras espécies

Espécie Animal	Composição Média (g/100)						
	Água	Proteínas	Gordura	Lactose	Sais minerais	Densidade[a] (15° C)	Calorias[b] (Cal/100gr)
Vaca	87.30	3.48	3.50	4.90	0.72	1.030	68
Ovelha	80.60	5.40	8.30	4.80	0.90	1.038	104
Cabra	87.70	3.50	3.80	4.00	0.80	1.030	75
búfala	82.50	4.70	7.40	4.60	0.80	-	100
Burra	89.90	2.10	4.50	6.70	0.45	-	45
Camela	87.10	3.70	4.20	4.10	-	-	66
Mulher	87.60	1.22	3.80	7.00	0.28	-	76

Fonte: Coligido por Carreira (1997): FAO (1972); Gonçalves Ferreira e Silva Graça (1961); elementos analíticos registados em estudos do Núcleo de Leite e Derivados - ENTPA. INIA Lisboa ; a - Vieira de Sá, et al. (1990); b - Carreira (1997).

Em termos de resíduo seco do leite, a gordura e a proteína em conjunto representam 69.8% e 54.5%, no leite de ovelha e no de vaca, respectivamente, enquanto que a relação gordura/proteína é de 1.42 para o leite de ovelha e 1.20 para o leite de vaca (Anifantakis, 1986).

A prNP 3547 de 1987, por forma a assegurar a genuinidade do leite de ovelha, fixa para o nosso país o teor mínimo 5.5 % de matéria gorda. Estes teores variam nos restantes países da UE de acordo com as raças predominantes e consequentemente com a legislação vigente em cada um deles.

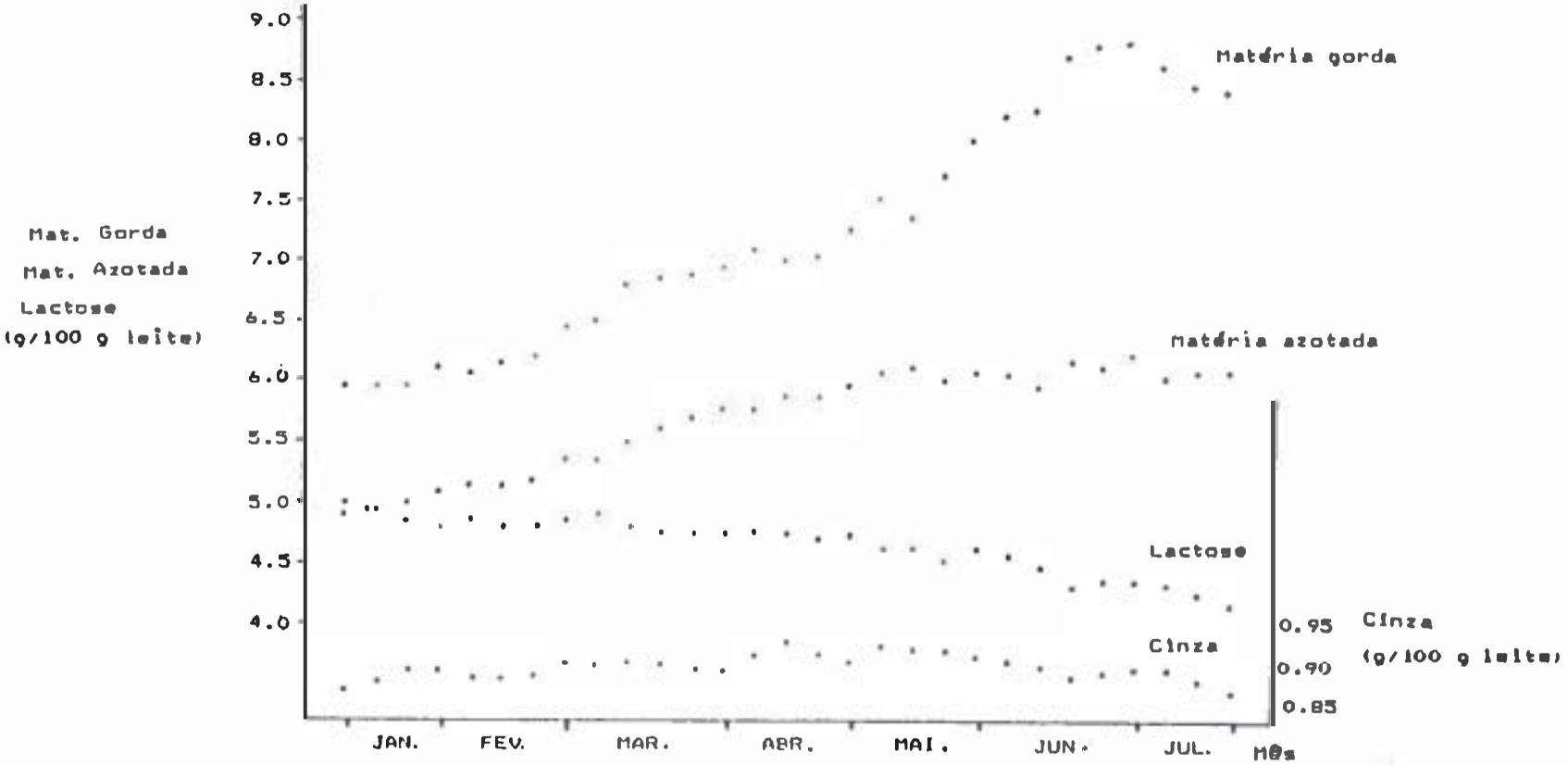
As variações na composição do leite de ovelha são devidas a factores de índole genética, fisiológica e ambiental que influenciam esta em maior ou menor extensão. Os principais factores são a raça, o estado de lactação, idade, alimentação, bem como as condições de exploração (Anifantakis, 1986). De entre estes, a raça é a mais importante fonte de variação na composição do leite (Addleman et al., 1964; Dilanian, 1969; Johnson, 1974; Anifantakis, et al.,1980; Ramos & Juarez, 1981) (cit. Martins, 1989). A composição do leite varia de raça para raça (Q.do 1.6)

Quadro 1.6 - Efeito da raça na composição do leite de ovelha

Raça	No Leite (%)					Referências
	M. G.	Proteína	Lactose	Cinza	Res. Seco	
Zlatusha	7.73	6.77	4.48	0.98	19.96	
East Friesian	7.07	6.23	4.45	0.96	18.71	Shalichev e Tanev (1967 Bulgária
Cruz. Zlatusha- Friesian	6.64	6.21	4.24	0.93	18.02	
Chios	7.85	5.47	4.80	0.92	19.08	Veinoglou et al. (1960) Grécia
Cruz. Merino-Nazech	6.61	5.39	4.13	0.94	17.20	Dilanian (1969) Arménia
Cruz. Merino-Balbass	6.01	5.26	4.53	0.97	16.84	
Cruz. Friesian-raças locais	6.04	4.71	5.09	0.87	17.59	Anifantakis et al. (1980) Grécia

Fonte: Extraído de Martins (1979)
(Ramos e Juaréz, 1981; Anifantakis, 1986)

Figura 1.2 - Comportamento dos príncipais constituintes do leite de ovelha durante a fase de lactação (raça Lacaune - região Roquefort).



Fonte: Extraido de Martins (1979)
(Rivemale, 1982)

A fase de lactação é outro dos factores responsáveis pela variabilidade de composição leiteira, tal como nos é dado observar na fig. 1.2, onde podemos seguir a evolução dos principais elementos constituintes do leite de ovelha da raça Lacaune, na região de Roquefort (Rivemale,1982). Durante o período de lactação, a evolução de cada um dos componentes de maior valorização para a indústria queijeira, designadamente a proteína e gordura, não se faz em paralelo. O teor butiroso que inicialmente é elevado no colostro, sofre um decréscimo, para logo a seguir aumentar progressivamente (Voutsinas et al., 1988). Enquanto que os níveis proteicos vão gradualmente crescendo no decurso desta fase produtiva (O'Pelligrini et al.,1994; Voutsinas et al., 1988), no final da lactação observa-se uma redução do teor em lactose e cinzas (Anifantakis, 1986).

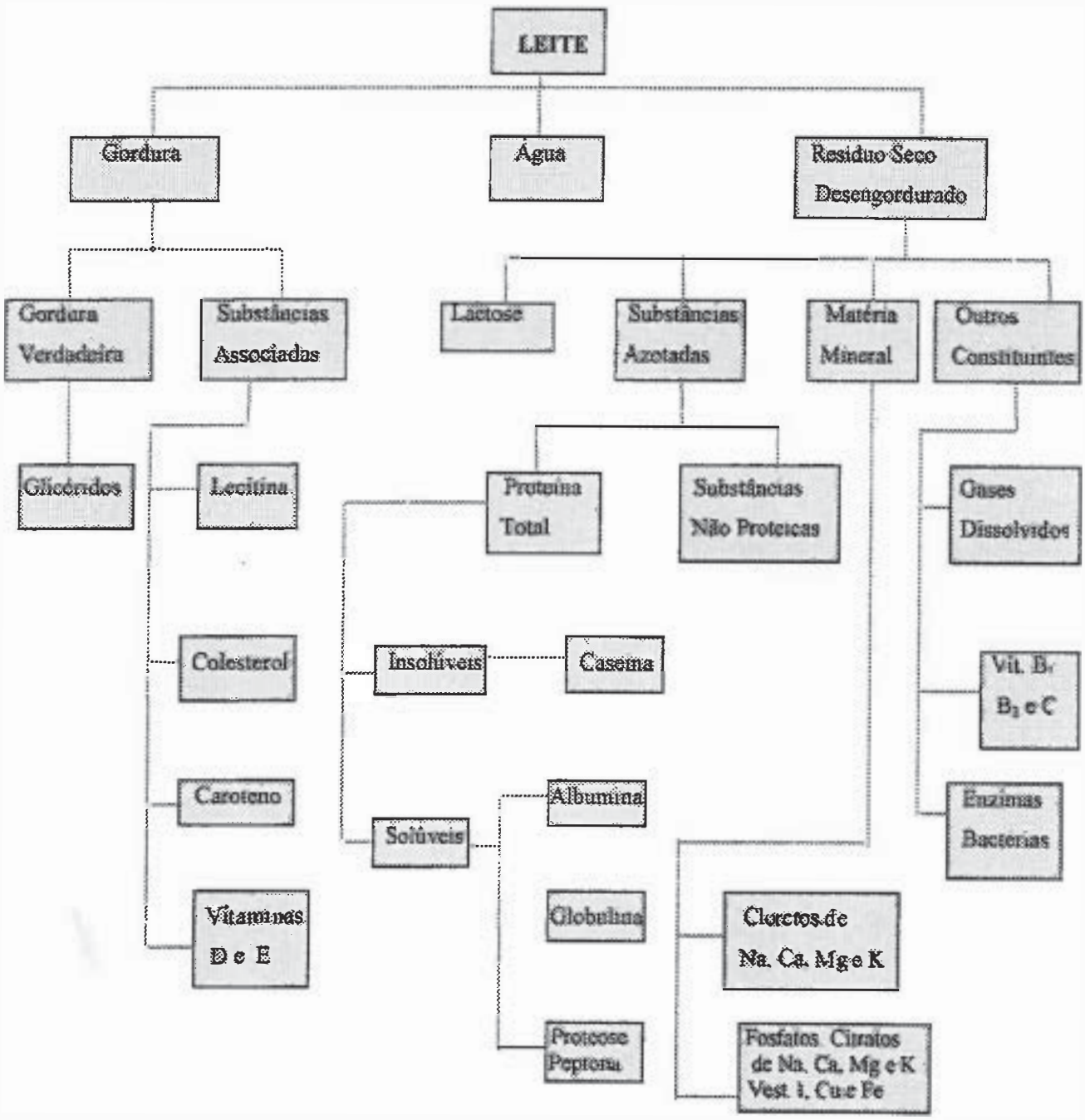
A alimentação tem influência relevante na composição do leite. Dependendo do estado produtivo em que o animal se encontra, da natureza da dieta que lhe é fornecida, e se é equilibrada ou não, maiores ou menores serão as repercussões ao nível da composição do leite.

Um regime de subalimentação energética, de curta duração, provoca um quebra na produção de leite e um aumento no teor butiroso. Além disso, a composição em ácidos gordos é profundamente modificada, verificando-se um aumento da proporção de ácidos gordos de cadeia longa (Luquet, 1985). Quando se trata de uma dieta sobre-enriquecida energicamente ocorre um ligeiro aumento do teor de matéria gorda. Isto acontece porque, os regimes alimentares desta natureza conduzem a alterações nas proporções dos AGV do rúmen (Luquet, 1985).

4.1 - COMPOSIÇÃO

Composição bruta do leite, esquematicamente resumida na figura 1.3.

Figura 1.3



4.1.1 - ÁGUA

Importa realçar o papel da água, o principal componente do leite, pois é nela que se encontram dissolvidos, no estado coloidal ou sob a forma de emulsão os restantes componentes, tais como os sais minerais ionizados, as substâncias azotadas e outros (Alais, 1985).

4.1.2 - PROTEÍNA

O extracto seco desengordurado no leite é constituído tal como se pode ver na fig. 1.3, por lactose, matéria mineral, substâncias azotadas e outros constituintes. Destas fracções, considera-se a azotada como uma fracção particularmente importante, na qual se distinguem 2 grupos: um de maior representatividade, as proteínas, que constitui a quase totalidade da fracção (97.6%); outro, as substâncias azotadas não proteicas, que representam apenas 2.4% do total da fracção (Luquet, 1985), isto no caso de se tratar de leite de ovelha, veja-se o quadro 1.7. Em analogia com o leite de vaca, o dos ovinos detém uma percentagem mais elevada de substâncias azotadas, 97.6% contra 95.0%.

O conjunto de substâncias que constituem a matéria azotada não proteica (ANP) não tem interesse tecnológico e não deve ser incluído na determinação do teor proteico (Vieira de Sá et al., 1990).

É do conhecimento geral que o conjunto das proteínas do leite resultam do polimorfismo genético e de modificações póstranslaccionais, em que as mais importantes são a glicosilação, a fosforilação e a clivagem proteolítica (Jenness, 1982; Alais,1985).

As proteínas da secreção galactopoiética são constituídas por cadeias de aminoácidos e possuem propriedades anfotéricas, podendo ser aniónicas ou catiónicas por alteração do valor de pH. Da sequência dos aminoácidos devidamente unidos resultam as cadeias polipéptidicas, com destaque para as caseínas e as proteínas do soro (Jenness, 1985).

No soro, as proteínas maioritárias são a α - Lactoalbumina (α-LA) e a β - Lactoglobulina (β-LG) consideradas como as proteínas solúveis (Eigel et al.,1984); possuem estrutura secundária bastante ordenada (Alais,1985) e comparativamente às caseínas são menos heterogéneas (López-Gálvez et al., 1994).

Quadro 1.7 - Distribuição das substâncias azotadas no leite de ovelha e vaca.

AZOTO TOTAL	Espécie Animal Valor Médio (%)	
	OVELHA	VACA
I- Proteínas:		
A- Caseína Isoeléctrica (Insolúvel)	80.0	78
A.1- Caseína $\alpha s1$	15.5	36
A.2- Caseína $\alpha s2$	14.7	10
A. 3- Caseína β	47.1	34
A. 4- Caseína K	7.3	13
A. 5- Caseína $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$	15.4	7
B- Proteínas do Soro (Solúvel)	17.6	17
B.1- Albúminas:		
a) β-lactoglobulina	51.4	50
b) α-lactoalbúmina + Seroalbúmina	25.1	27
B.2- Globulinas imunes	17.9	12
B.3- Proteose-peptona	5.6	10
II- Substâncias azotadas não proteicas	2.4	5

Fonte: Alais (1985) e Luquet (1985)

As caseínas e proteínas do soro distinguem-se, fundamentalmente, quando em presença do agente enzimático coagulante. As primeiras só precipitam por acção enzimática (coalho de origem animal, vegetal e biológico) (Holt, 1992), enquanto que nas segundas é o calor que provoca a coagulação parcial, quando em equilíbrio estável (Vieira de Sá et al., 1990).

Dada a importância tecnológica das caseínas, serão exclusiva e especificamente estudadas quanto à variabilidade genética que as caracteriza, em leite de ovelha.

4.1.2.1 - CASEÍNAS

As caseínas são o componente maioritário do total da fracção proteica do leite, representando cerca de 80%, o que corresponde a cerca de 25 - 32 g/L, variando com a raça (Lenoir, 1985). Definem-se como proteínas multifosforiladas, que precipitam não só pelo processo anteriormente referido como também por acidificação a pH 4.6 e a 20° C (Eigel et al., 1984) e por adição de sais neutros (Aschaffenburg e Drewry, 1957).

O baixo ponto isoélectrico atribui-se ao predomínio de restos de ácidos aminados sobre os básicos e à presença de restos seril-fosforilados.

As caseínas apresentam propriedades anfílicas devido à presença dos grupos fosfatos laterais se concentrarem na parte final - N-Terminal das moléculas, enquanto que o resto da cadeia de aminoácidos possui características hidrofóbicas (Banks et al., 1978).

Outros termos podem ser usados para designar as caseínas, tais como caseína isoeléctrica e "caseína de Harmmarsten". O primeiro termo aplica-se especificamente ao precipitado de caseína obtido por acidificação a pH 4.6, de uma porção de leite e após centrifugação (Lenoir, 1985), enquanto que o último é uma homenagem ao primeiro investigador que publicou um trabalho sobre este tema, ainda que anteriormente tenham sido outros autores a descrever a sua preparação (Alais, 1985).

As caseínas apresentam-se sob a forma micelar (forma nativa) (ver fig.1.4). As micelas são agregados coloídais esféricos (100 a 200 nm) constituídos por αs e β caseínas estáveis em solução, devido à contribuição da K caseína em associação com os iões inorgânicos (essencialmente Ca^{2+}) e fosfato de cálcio coloidal (Banks et al., 1978; Richardson et al., 1979; Lenoir, 1985). Os agrupamentos glucídicos hidrófilos são também estabilizantes das proteínas em solução (Luquet, 1985).

Cerca de uma dezena de moléculas, individualmente constituídas por uma proporção variável de caseína associada por ligações hidrófobas e electrostáticas, constituem a sub-micela. A construção da micela faz-se por união das submicelas através da fixação de iões de cálcio e fosfato mineral

sobre as pontes fosfoseril. A caseína K dispõe-se quase toda na superficie externa da micela, já que a presença no seu interior é praticamente insignificante (Amiot, 1991).

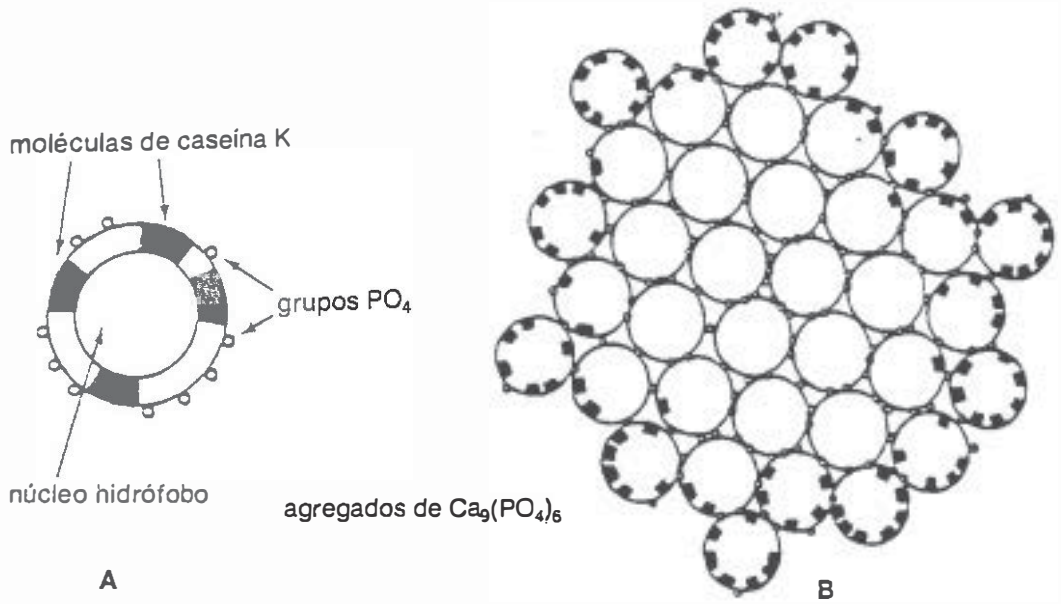


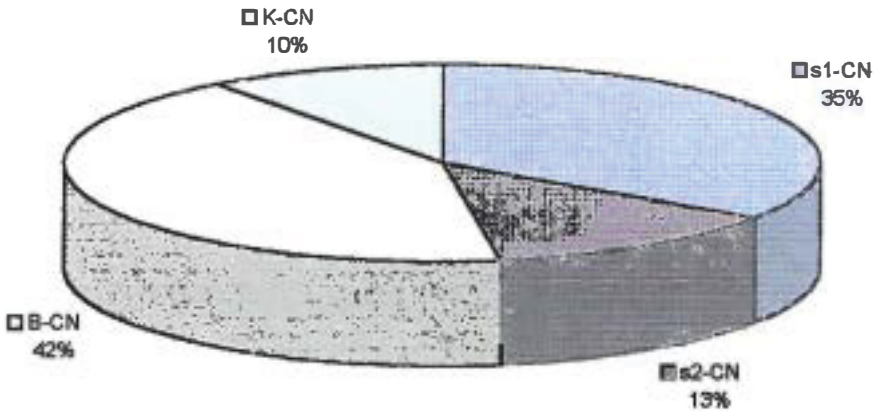
Figura 1.4 - Modelo de submicelas (A) e de micelas (B) de caseína (Schmidt, 1982) (cit. Alais, 1985).

Cerca de uma dezena de moléculas, individualmente constituídas por uma proporção variável de caseína associada por ligações hidrófobas e electrostáticas, constituem a submicela. A construção da micela faz-se por união das submicelas através da fixação de iões de cálcio e fosfato mineral sobre as pontes fosfoseril. A caseína K dispõe-se quase toda na superficie externa da micela, já que a presença no seu interior é praticamente insignificante (Amiot, 1991).

Segundo Amiot (1991), foi em 1939 que a heterogeneidade das caseínas em leite de vaca ficou conhecida. Recorrendo à técnica electroforética, foi possível separar 3 fracções de acordo com a homologia da estrutura primária: α - caseína (α-CN), β - caseína (β-CN) e k - caseína (k-CN). Na presença de sais de cálcio a α-CN divide-se em 2 fracções principais e que se designaram por α_{s1}- caseína (α_{s1} - CN) e α_{s2} - caseína (α_{s2} - CN), face à sua atitude comportamental.

A percentagem de fracções caseínicas/caseína total encontradas por Alais (1985) e Luquet (1985) em leites de diferentes espécies (ver Qd. 1.7), permite afirmar que a percentagem de α-CN e k-CN no leite de ovelha é substancialmente inferior à do leite de vaca (30.2% e 7.3% contra 46% e 13%, respectivamente), enquanto que para β-CN os valores encontrados no primeiro leite (47.1%) são maiores do que no segundo (34.0 %). Este aspecto é explicado, por Assenat (1985) com base nas diferentes dimensões das micelas observadas por Richardson et al. (1974) nos leites das várias espécies.

Figura 1.5 - Fracções Caseínicas em % da Caseína total de leite de ovelha.



No caso do leite de ovelha. Outros investigadores à semelhança de Luquet (1985) consideraram a fracção de caseína β maioritária relativamente à caseína α (Law et al., 1992 e Muir et al., 1993) (cit. O' Pellegrini et al., 1994).

Mais recentemente, O' Pellegrini et al. (1994) corroborando a opinião de outros autores, tais como Juarez et al. (1984); Anifantakis (1986); Ono et al. (1989) contrapõem esta afirmação. E referem que a α-CN e que é a fracção preponderante (fig. 1.5), enquanto que a β-Cn e a K-Cn representam 42% e 10.4%, respectivamente.

As caseínas têm um certo número de características comuns, mas o que as distingue é: o nome do agrupamento fosfórico; a presença ou não de cisteína; o grau hidrofóbico; a presença ou ausência de glícidos; o teor em certos aminoácidos (treonina, prolina, tirosina) (Lenoir, 1985).

As fracções α-CN e β-CN caracterizam-se pela particularidade de estabelecerem ligações serina-fosfato e, nalguns casos, concentram-se em determinadas zonas que conferem à proteína características especiais. Encontram-se ainda resíduos de prolina distribuídos em toda a extensão da cadeia, os quais protegem a formação de parte da estrutura secundária (Banks et al., 1978).

Richardson e Creamer (1976) conseguiram separar, por electroforese em gel de poliacrilamida, as diferentes fracções caseínicas do leite de ovelha. Os resultados obtidos no electroforegrama permitiram-lhes retirar as seguintes informações:

- identificação do conjunto das 3 primeiras bandas que apareciam no gel, por α-CN (α_{s1}, α_{s2} e α_{s3}), que se movimentavam com uma rapidez electroforética similar às das caseínas α_{s3} e α_{s4} do leite de vaca.

- as fracções da α_{s2} e α_{s3} são as únicas com valor tecnológico e possuem composição em ácidos aminados semelhantes à α_{s1}-CN bovina, mas acusam maior sensibilidade ao cálcio.

- α_{S1}-CASEÍNA

Desta fracção caseínica do leite de ovelha conheciam-se três variantes genéticas, A, C e D (Lenoir, 1985) mas, mais recentemente, Chianese et al. (1996) identificaram mais duas variantes genéticas, B e E, com base na diferente mobilidade electroforética.

As variantes genéticas têm a configuração da proteína mas derivam da forma original por mutação. Normalmente estas mutações traduzem-se em substituições que ocorrem num pequeno número de resíduos (1-2) e as propriedades alteram-se significativamente (Lenoir, 1985).

É também conhecida por "caseína Welsh" e tem merecido intensa investigação (King, 1967; Arave et al., 1973; Russo et al., 1986; Pieragostini et al., 1989; Di Luccia et al., 1989; Caroli et al., 1990; Chianese et al., 1990 e Mauriello et al., 1990) (cit. Chianese et al., 1992).

Num estudo detalhado sobre as caseínas ovinas, em gel de poliacrilamida a pH alcalino, verificou-se que no perfil electroforético obtido a variante "Welsh" se posicionava a meia distância entre as bandas de αs e β-CN (King, 1966).

A α_{s1}-CN é a fracção com maior rapidez de mobilidade electroforética, precipitando a 0.4 M $CaCl_2$, pH 7.0 e a 4° C (Whitney et al., 1976). É constituída por uma mistura de duas cadeias polipéptidicas que difere das suas homólogas bovina e caprina na delecção dos resíduos 141-148, e apresentam 199 e 191 resíduos, respectivamente (Ferranti et al., 1995).

Chianese et al. (1996) determinaram que a proporção em que entram as cadeias (forma longa - 199 resíduos e curta - 191 resíduos) na mistura é aproximadamente 80 : 20. A diferença entre as formas longas da α_{s1}-CN ovina e caprina e as α_{s1}-CN bovina, segundo os mesmos autores está apenas na substituição do resíduo de aminoácido: Gln^{148} na caseína de pequenos ruminantes contra Glu^{148} na caseína bovina.

Quer as três variantes genéticas (A, C e D) quer as duas formas distintas em que cada uma delas se apresenta, distingem-se pelo grau de fosforilação.

A origem das 2 formas da α_{s1}-CN ovina em todas os fenótipos A, C e D atribui-se, segundo Ferranti et al., (1995) a uma separação anormal semelhante ou, então (com maior probabilidade), aos diferentes graus de fosforilação da proteína.

A fig.1.6 representa a estrutura da proteína α_{s1}-CN e assinala as substituições que permitem distinguir as variantes C e D (Ferranti et al., 1995).

```
1                                       10    (Ser-Pro)(C,D)                    20
Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Ser-Ser-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu
                                                P
<----T1----><------T2------><----------------------T3-------------------------

                                        30                                      40
Leu-Arg-Phe-Val-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Arg-Lys-Glu-Asn-Ile-Asn-Glu-Leu

-------><---------------------T4-------------------><---------------T5'--------
        <---------------------T4'-------------------><---------------T5-----
        <-----------------------------------------T4'+T5----------------------
                                        50                                      60
Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Ile-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ala-Lys-Gln-Met
 P                  P        P
-------><-------------------------------T6----------------------------><---T7-
------->
------->
          (Ser      Ser      Asn)(D)  70                                      80
Lys-Ala-Gly-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser-Ala-Glu-Gln-Lys-Tyr
             P   P   P    P   P                                P
--><---------------------------------T8-----------------------------------><--

                                        90                                     100
Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg

--T9------><-----------T10-------------><---------------T11------------------>

                                       110                                     120
Leu-Lys-Lys-Tyr-Asn-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Lys-Ser-Ala-Glu-Glu-Gln-Leu
                                                                P
        <---------------------T13'-------------------><---------------T14---
            <------------------T13-------------------->
<-----------------------T12+T13'---------------------->
                                       130                                     140
His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Asn-Pro-Ala-His-Gln-Lys-Gln-Pro-Met-Ile-Ala-Val-Asn-Gln

--------------><--------------T15-------------><---------------------T16*-----
                                                                <------------------
                                                        <-------------T16-------------|
                                       150                                     160

Gln-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Gln-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro

-------------------------------------------><---------------------------------
------------C16*-------------------------><-----------------------C17''-----
      Deleted residues          |---------->

                                       170                                     180
Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Leu-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser

-----------------------------------T17-------------------------------------
------------------><---------------------C17'-------------------------------

                                       190                                 199
Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Gly-Lys-Ile-Thr-Met-Pro-Leu-Trp

-------------------------------------------------><----------T18-------->
-------------------------------------------------->
```

Figura 1.6 - Sequência de resíduos de aminoácidos da α_{S1}- CN. A variante A_1 corresponde à sequência dos resíduos 141 a 148 (adaptado de Ferranti et al., 1995).

A variante A e C (nas duas formas curta e longa) da α_{s1}-CN pode conter de 9 a 11 e de 8 a 10 grupos fosfato, respectivamente. Isto é devido à fosforilação parcial do resíduo Ser na posição 115.

A variante D difere das anteriores por se apresentar menos fosforilada (5 ou 6 grupos fosfato). Tal é devido, como se pode observar na fig. 1.6, à substituição do agrupamento Ser-P por Asn na posição 68 (Ferranti et al.,1995). Importa sublinhar que esta sequência se conserva em todas as fracções caseínicas sensíveis ao cálcio, tais como o α_{s1}-CN, α_{s2}-CN e β-CN, e está implicada nas agregações micelares estáveis com os iões de cálcio e na função nutritiva que as caseínas desempenham (Ferranti et al, 1995).

As dificuldades observadas na coagulação do leite de ovelha e firmeza da coalhada poderão ser explicadas, segundo Chianese et al. (1996), pelo menor grau de fosforilação e conteúdo da variante D da α_{s1}-CN, quando comparada com outras variantes.

A alteração estrutural na variante D tem ainda reflexos sobre a diferente mobilidade electroforética, desta em relação aos outros fenótipos (Ferranti et al., 1995).

Relativamente à tecnologia de fabrico de queijo de ovelha, o baixo teor em caseínas α no leite parece estar implicado no baixo limiar de detecção de gostos amargos nestes queijos (Assenat, 1985).

Kwai-Hang et al. (1984) descobriram que a variante α_{s1}-CN juntamente com factores de influência directa na produção de leite (idade ao 1° parto e mês de parição), se correlacionavam significativamente com a produção de leite, com a gordura e com a proteína.

α_{s2}- CASEÍNA

A sub-família das α_{s2}-Caseína tem sido a menos estudada; daí que a fonte de informação sobre o assunto seja escassa. A heterogeneidade deste grupo de proteínas é confirmada por Chianese et al. (1993), que em analogia com a homóloga bovina admite como provável que tal heterogeneidade se deva a diferentes graus de fosforilação.

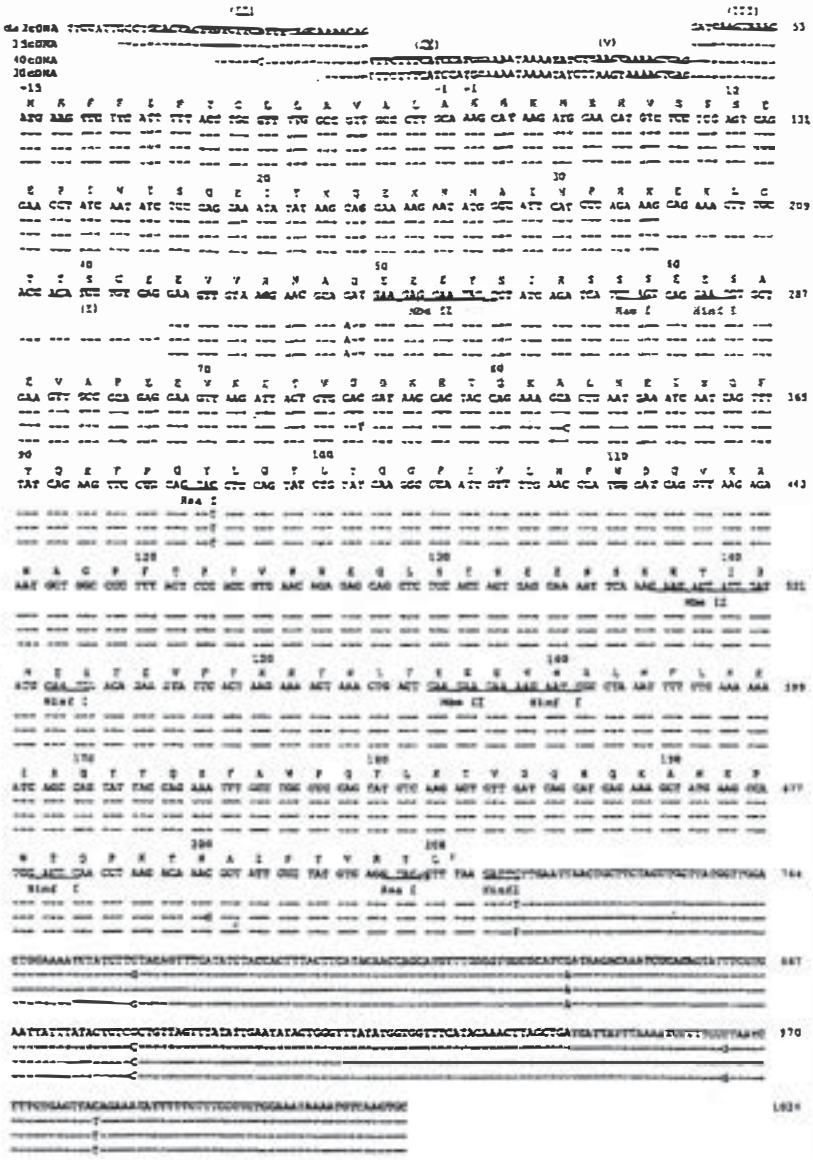


Figura 1. 7 - Sequência de aminoácidos da forma longa da α_{s2}-CN, segundo o código de uma letra. Os aminoácidos numerados negativamente são os correspondentes ao péptido de sinalização. As zonas sublinhadas indicam os locais de restrição das enzimas: Mbo II (GAAGANg), Mae I (C/TAG), Hinf I (G/ANTC) e Rsa I (GT/AC).

Segundo Chianese et al. (1993) na composição da α_{s2}-CN entram diferentes aminoácidos, reconhecendo-lhe 3 variantes, que apresentam pontos isoeléctricos (pI) semelhantes aos da K-Cn e aos componentes minoritários da β-Cn.

Boisnard et al. (1991) referem que das variantes genéticas da α_{s2}-CN existem duas que se diferenciam por uma delecção interna, já que ambas partilham as mesmas sequências amínica e carboxílica terminais

O esquema anteriormente apresentado retrata a sequência de ácidos aminados da caseína α_{s2}-CN, bem como as sequências nucleótidas dos diferentes c DNA que codificam as formas longa e curta desta fracção proteica.

• β-CASEÍNA

Esta proteína ovina é formada por uma cadeia polipéptidica com uma sequência de 207 resíduos de aminoácidos, que difere da sua homóloga bovina em mais ou menos 15 substituições (Assenat, 1985).

Em virtude do polimorfismo genético, esta fracção caseínica constitui o 2° grupo de bandas de um perfil electroforético, com menor mobilidade do que a α-CN; distingue-se em β_1 e β_2-CN, as quais diferem apenas no número de agrupamentos fosfóricos. A primeira é mais sensível ao cálcio do que a segunda (Richardson e Creamer, 1976; Richardson et al., 1979).

Ainda que a natureza da sequência polipéptidica seja semelhante entre a β-CN bovina e ambas as variantes da β-CN ovina é na sua estrutura primária que se diferenciam, por esta última apresentar, além de 2 delecções, duas substituições de aminoácidos (Anifantakis, 1986).
Origina péptidos com sabor amargo. A baixas temperaturas (2°-8° C) solta-se da micela. Quando se aquece, volta para a micela mas forma uma camada protectora que contraria a coagulação.

Adaptado de Richardson et al. (1979), a fig. 1.8 mostra esquematicamente a configuração primária da β-CN, evidenciando as mutações das variantes genéticas e os pontos de ataque das proteases endógenas do leite (Mati et al., 1991; Richardson et al., 1979).

A γ-caseína (γ-CN) não considerada um novo tipo de caseína: é somente um fragmento da β-CN, resultante da acção proteolítica da plasmina[5] sobre esta (Lenoir, 1985; Eigel et al., 1984; Kroeker et al.,1985). Da actividade desta enzima, segundo Mati (1991) surge ainda um outro componente, designado por proteose peptona.
A fracção proteose peptona subdivide-se em 2 grupos, atendendo à respectiva origem:

- 1° grupo- constituído por 3 fragmentos de hidrólizados de caseína, por acção das proteáses, diferenciando-se pelo número de fosfatos (β-CN- %P, β-CN- 4P, β-CN-1P);
- 2° grupo constituído por proteínas e polipéptídos presentes no soro, no estado nativo.

[5] Protease natural do leite

Estudos de associação de algumas variantes proteicas do leite com factores económicos importantes revelam que a β-CN afecta, tanto em percentagem como em produção, a componente butírica do leite (Kwai-Hang et al.,1984).

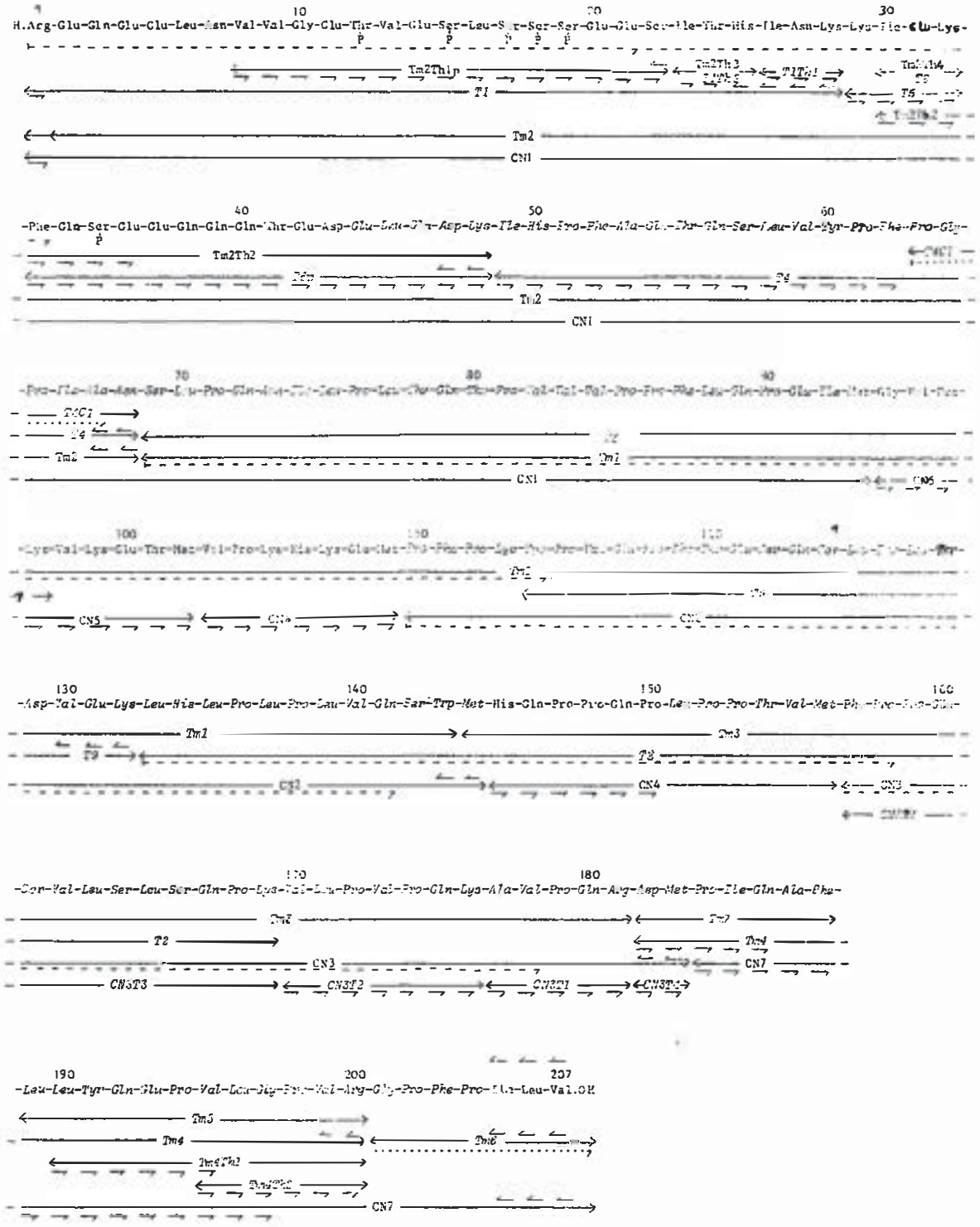


Figura 1. 8 - Sequência de resíduos de aminoácidos da β-CN. Os aminoácidos em itálico correspondem à variante β_1 (adaptado de Richardson et al., 1979).

• K-CASEÍNA

Os componentes bioquímicos das fracções K-caseínicas de leite de ovelha foram postos em evidência por Alais et al. (1967).

Decorridos alguns anos outros autores estabeleceram a sequência polipéptidica desta proteína e reconheceram a especificidade da sua estrutura (Assenat, 1985).

A heterogeneidade que este grupo apresenta é uma consequência da diversidade genética ao nível da fracção proteica bem como no teor em hidratos de carbono (Hajime, 1995).

Chianese et al. (1992), atribui às diferentes cargas dos componentes glicosilados da cadeia polipéptidica da K-CN a origem do seu polimorfismo.

Alais e Jollés (1967) (cit. Martins, 1989), utilizando técnicas electroforéticas, distinguiram 2 fracções de K-CN ovina que diferiam das observadas em leite de vaca pelo modo como se movimentam no gel. A mobilidade da caseína K apresenta-se equivalente à da β-CN bovina. Difere em 26 substituições relativamente à homóloga bovina, 10 das quais sobre o fragmento paraK-caseína (Ribadeau-Dumas, 1978) (cit. Martins, 1989).

A K-CN apresenta características muito peculiares que por isso a tornam única no complexo das caseínas. Considera-se uma glicofosfoproteína porque na sua estrutura química estão inseridos glícidos. É solúvel na presença do cálcio, afectando por isso a quantidade de proteína no leite, (Kwai-Hang et al., 1984) impedindo através do seu poder estabilizante a precipitação das caseínas (Luquet, 1985; Lenoir, 1985).

Este poder da K-CN fica comprometido quando a micela estável fica sujeita à acção proteólitica dos enzimas renina e/ou quimosina (coalho), que fraccionam a cadeia peptídica na ligação Phe → Met, posições 105 e 106 (ver fig. 1.9) (Luquet, 1985; Scott, 1986). Como resultado obtêm-se 2 fragmentos, como é o caso da variante A da K-CN, designadas por paraK_A-caseína (insolúvel) e K_A-caseínoglicopéptideo (solúvel). O primeiro fragmento constitui o terminal amínico (N) da

proteína enquanto que o segundo fragmento representa a porção terminal carboxílica (C) (Jollès et al., 1974).

A sequência da K-caseínoglicopéptideo, segundo Alais (1985) e Anifantakis (1986), é semelhante nos leites de ovelha e de vaca..

O processo físico que decorre durante a clivagem do colóide estabilizador, na presença de cálcio, traduz-se numa agregação micelar que por aprisionamento da fase aquosa, dá origem à coagulação do leite, factor de suma importância na indústria queijeira (Luquet, 1985).

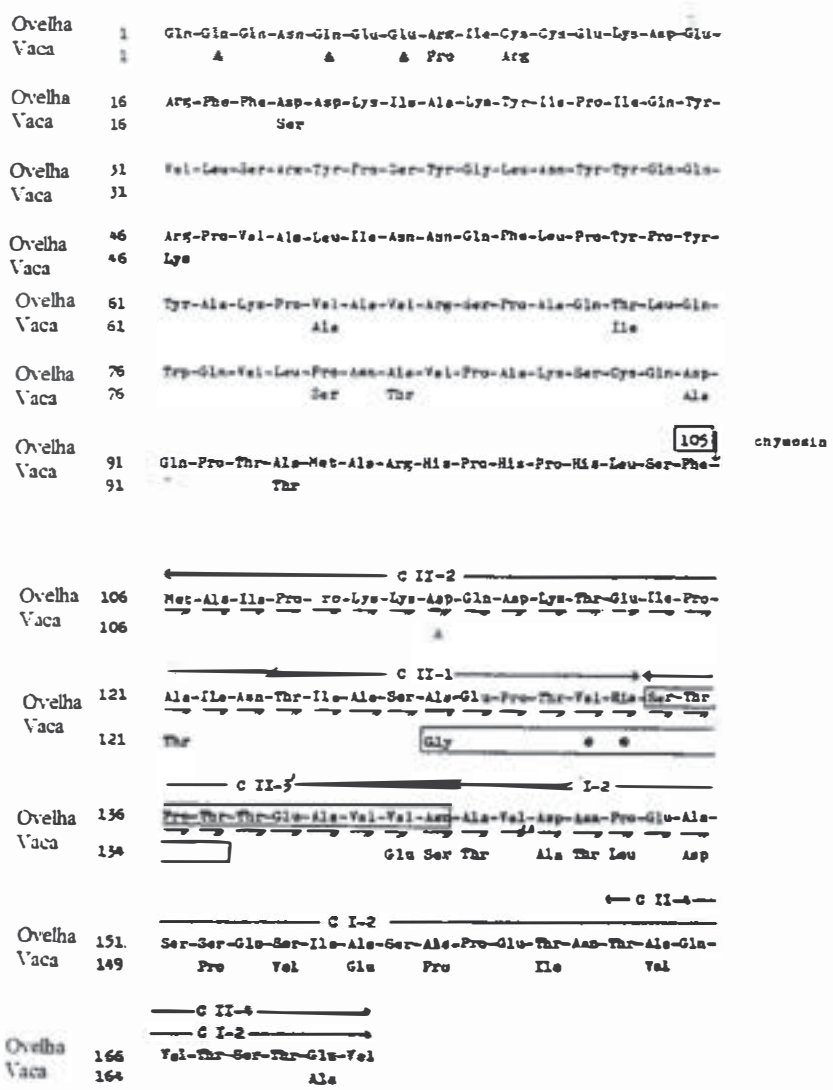


Figura 1. 9 - Comparação da sequência de resíduos de aminoácidos da K-CN ovina com a sua homóloga bovina. Os aminoácidos de 1-105 e 106-171 correspondem à fracção paraKA-caseina e KAcaseinoglicopéptido, respectivamente. As alterações encontram-se assinaladas por: ▲- diferença no conteúdo em N; ● - delecções ▭ - sequência de glícidos obtidos por proteólise enzimática.

4.1.3 - GLÍCIDOS

A este grupo pertence a lactose, componente maioritário e específico do leite, embora existam pequenas proporções de outros açúcares taís como os dissacáridos (glucose e galactose) (Amiot, 1991), oligossacáridos neutros e ácidos, e glícidos ligados a proteínas (Robinson, 1990).

A lactose é um dissacárido sintetizado na glândula mamária e formado por glucose (nas formas α e β) e galactose (Alais, 1985). No leite de ovelha representa cerca de 22 - 28% do total da M.S., percentagem ligeiramente inferior (33 - 40%) aos valores apontados para o leite de vaca (Assenat, 1985).

Scholz (1997) refere que este açúcar é o nutriente essencial à actividade das bactérias predominantemente acidificantes existentes no leite, com produção de ácido láctico. O produto da reacção é importante tanto na coagulação do leite e como nas características sápidas dos produtos fermentados e de outros derivados do leite. Em suma, estes microorganismos industrialmente úteis contribuem para a qualidade e para a conservação dos produtos, pois criam condições adversas à proliferação de microorganismos de putrefacção.

4.1.4 - LÍPIDOS

Os lípidos (gordura) são considerados, juntamente com as proteínas, os constituintes de alto valor económico do leite. A matéria gorda é o componente que sofre maiores variações: encontra-se no estado de emulsão, sob a forma de pequenos glóbulos de 3.3 μ de diâmetro no caso do leite de ovelha (Parkash et al., 1968) (cit. Assenat, 1985), enquanto que noutras espécies poderá ir de 1 até 20 μ de diâmetro (Soroa, 1980; Scholz, 1997).

Os factores de variação, tais como a espécie, a raça, o regime alimentar, a fase de lactação e a técnica de ordenha (Scholz, 1997), não influenciam só as dimensões mas também o teor em gordura (Soroa, 1980); no decurso da lactação, o teor butírico no leite de ovelha é inicialmente de cerca de 5% passando para 10% ou mais no final (Scholz, 1997).

A matéria gorda consiste numa mistura de compostos e possui a propriedade de se dissolver em solventes orgânicos não polares, tais como éter, benzeno ou clorofórmio, e é de quase completa insolubilidade nos líquidos aquosos (Jenness, 1985).

Nos principais constituintes do teor butiroso do leite, os triglicéridos e os fosfolípidos entram em 98.5% e 0.8%, respectivamente. Encontram-se ainda ácidos gordos livres, esteróides, carotenoides e as vitaminas liposolúveis que em quantidades vestigiais têm a sua importância (Anifantakis, 1986).

Assenat (1985) em estudos sobre a repartição dos triglicéridos, verificou que os de cadeia longa entravam em menor proporção no leite de ovelha do que no de vaca.

Em leites de diferentes espécies (vaca, ovelha, cabra e búfala), Freeman et al.(1985) (cit. Anifantakis, et al.,1980) estudou a diferente distribuição dos ácidos gordos nos triglicéridos. Os resultados que obteve foram: os ácidos gordos de cadeia curta C4 e C6 encontram-se esterificados quase só na posição 1 e 3; os ácidos gordos em C14 e C15 estão esterificados na posição 2; os C18:0 na posição 1 e 3 e C12 - C16 têm maior tendência para aparecerem em posição central.

É típico encontrar nos lípidos do leite de vaca e ovelha um quantitativo elevado de ácidos gordos com 4-12 átomos de carbono, especialmente os de número par (C14 a C12). No entanto, a percentagem em que cada um destes constituintes entra é cerca de duas vezes superior (20-25% contra 10-12%) na gordura do leite de ovelha comparativamente aos que entram na gordura do leite de vaca (Anifantakis, 1986).

Alto teor em ácido cáprico (C10:0) no leite de ovelha constitui a melhor distinção entre a gordura do leite de ovelha e a de vaca, já que esta última se caracteriza por um elevado conteúdo em ácidos gordos insaturados (Anifantakis, 1986). Este ácido, assim como o caprílico, ambos existentes em quantidades significativas, parece desempenhar um papel importante quer como substância directamente activa quer como precursor de outras substâncias (Assenat, 1985). É de mencionar que o ácido cáprico comunica ao leite de ovelha um ligeiro sabor picante.

O conteúdo em fosfolípidos é mais elevado no leite de ovelha do que no de vaca, embora esta opinião não seja unanime entre os vários autores. Steger (1960) por exemplo, encontrou valores inferiores para o leite de ovelha. Existem semelhanças em ambos os leites, quer na composição em ácidos gordos dos fosfolípidos quer na sua repartição. Os componentes maioritários dos fosfolípidos são a fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-colina e a esfingomielina (Morrisson, 1968; Anifantakis et al., 1980)

Os fosfolípidos são mais complexos, pois possuem a estrutura dos glicéridos acrescida de ácido fosfórico e uma base azotada. Esta configuração dá-lhes um duplo carácter hidrófilo e lipófilo, convertendo-os em óptimos emulsionantes da gordura no leite, vindo daí o seu grande interesse tecnológico (Amiot, 1991).

Os constituintes da matéria gorda do leite de ovelha, que dão a esta uma composição única, quando sofrem a acção lipolítica e fenómenos a ela associados, são os principais responsáveis pelas peculiares características dos produtos gordos obtidos a partir do leite, como por ex. o queijo (Scholz, 1997; Amiot, 1991).

4.1.5 - *MINERAIS*

Os elementos minerais do leite são importantes pela união que estabelecem entre os restantes componentes responsáveis pelo alto valor nutritivo deste alimento (Amiot, 1991; Scholz, 1997).

Vários tem sido os autores que têm investigado a composição mineral do leite de ovelha. Anifantakis (1986) apresenta uma compilação desses dados e evidência a maior riqueza mineral do leite de ovelha em detrimento da mesma em leite de vaca.

Os elementos minerais que se encontram em maior quantidade são o cálcio, o potássio, o sódio, o magnésio e o fósforo. Outros como o ferro, o cobre, o molibdénio, o zinco, o manganésio, o iodo, e o flúor são oligoelementos (Scholz, 1997). Nem todos estes componentes do leite se encontram em solução; o potássio e o sódio encontram-se na forma ionizada solúvel, enquanto que os restantes se apresentam na forma não ionizada (sais debilmente ionizados) (O' Connor e Fox, 1977; Robinson, 1990).

Os minerais básicos, o cálcio e o fósforo, podem-se encontrar dissolvidos ou formando compostos com a caseína. O cálcio apresenta maior expressão na fase coloidal (cerca de 70% versus 30% em solução), enquanto que o fósforo é na fase solúvel que melhor se exprime. Transpondo este conhecimento e analisando o conteúdo mineral dos leites de ovelha e vaca, O' Connor e Fox (1977) encontraram em ambos que os valores de cálcio e fósforo solúveis eram semelhantes, diferindo apenas no conteúdo da fase coloidal (Anifantakis, 1986).

Devido ao maior conteúdo em cálcio do que em fósforo, o leite é considerado um dos alimentos que assegura o equilíbrio salino (cálcio/fósforo) (Rebelo, 1983). Scholz (1997), referido-se a este mesmo componente no leite, que abunda sobre a forma de caseinato (Soroa, 1980), salienta a importância que um quantitativo elevado deste tem na obtenção de uma boa coalhada, isto porque promove a rotura do colóide, a partir da qual se elimina progressiva e parcialmente a água de composição, o que é de fundamental importância na definição do tipo de queijo a obter.

4.1.6 - BIOCATALIZADORES (Vitaminas e Minerais)

A composição do leite ovino em biocatalizadores não tem sido devidamente estudada.

As vitaminas, no total dos constituintes do leite, têm pouca representatividade. No entanto, são de grande importância nutritiva e algumas contribuem para a cor do leite e produtos lácteos (Amiot, 1991).

À semelhança do que acontece com os sais minerais, a composição vitaminica no leite de ovelha é mais rica do que no leite de vaca (Anifantakis, 1986). Segundo Hartman et al., (1965) o ácido ascórbico, o ácido nicotínico, o ácido pantoténico, a riboflavina e a vitamina A são, do conjunto das vitaminas ovinas, as que se encontram em maior quantidade.

As enzimas existentes no leite tem a sua origem no úbere do animal onde são produzidas ou aparecerem como resultado do metabolismo das bactérias que contaminam o leite, com especial incidência das produzidas pelas bactérias psicrotrófica, de natureza proteolítica e lipolitica.

As *Pseudomonas* e os *Micrococcus*, por exemplo, segregam lipases que dão origem a aromas e sabores desagradáveis no queijo. O sal (salga) inibe a actividade das lipases.

As enzimas psicrotróficas são na sua maioria termolábeis muito embora os microorganismos produtores sejam sensíveis aos tratamentos térmicos. Os queijos preparados com leite pasteurizado não apresentam características sápidas acentuadas.

Algumas enzimas possuem actividade bactericida, pelo que conferem certa protecção ao leite, como é o caso das lactoperoxidases e lisozima (Vieira da Sá et al., 1990).

Em termos enzimáticos, Chadan et al. (1968) e Modi et al. (1959) (cit. Martins, 1989) verificaram que a lipase, a lisozima, a ribonuclease e a xantina oxidase desenvolviam menor actividade no leite de ovino do que no de bovino.

Na secreção lactopoiética da ovelha é, sem sombra de dúvida, a fosfatase alcalina a enzima de maior importância, possuindo uma actividade três vezes superior à que desenvolve no leite de vaca (Anifantakis e Rosakis, 1983) (cit. Martins, 1989).

4.2 - PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

De acordo com a composição física e química, o leite possui características específicas inerentes às diferentes espécies, das quais destacamos a bovina e a ovina. Para melhor esclarecimento observe-se o quadro 1.8

Quadro 1.8 - Características dos leites de vaca e de ovelha

	Leite de vaca	Leite de ovelha
Densidade $_{20°c}$	1.023 - 1.040	1.035 - 1.038
Viscosidade (cp)	2.0	2.86 - 3.93
Tensão superficial (Din/cm)	42.3 - 52.1	44.94 - 48.70
Índice de refracção (n D_{20})	1.3344 - 1.3485	1.3492 - 1.3497
Condutividade (ohm^{-1} cm^{-1})	0.0040 - 0.0055	0.0038
Índice crioscópio (° C)	- 0.530 a - 0.570	-0.587 a - 0.590 *
Acidez (ml NaOH N/l)	15 - 18	22 - 25
pH	6.65 - 6.71	6. 51 - 6.85

Fonte: Anifantakis, 1986
* Mur, 1966

São notórios os valores mais elevados dos índices do leite de ovelha em relação aos do leite de vaca, com excepção para os valores de tensão superficial e condutividade. O pH é semelhante ao leite de vaca.

De todos os parâmetros físicos referidos somente a densidade, pH e acidez são determinados rotineiramente, para ajuizar da integridade da secreção láctea e se foi ou não objecto de fraude.

Martins (1989), em estudos sobre a caracterização da composição do leite cru de ovelha, com destino à produção de Queijo de Azeitão, encontrou valores próximos dos citados na pr NP-3547 (1987):

- Densidade 20° C > 1.031
- Acidez (ml NaOH N/l) < 30
- pH 6.6 - 6.8
- Proteína (%) > 4.5
- Matéria gorda (%) > 5.5

Posteriormente, Alvarenga (1995) em estudos da mesma natureza, aponta alguns índices físicos e químicos em leite destinado à produção de Queijo Serpa, proveniente das raças Merina e Lacaune, exploradas nesta região. Veja-se o quadro 1.9.

Quadro 1.9 - Características dos leites de ovelha das raças Merina e Lacaune

	Raça Merina	**Raça Lacaune**
Densidade 20° C	1.035 - 1.041	1.033 - 1.040
Acidez (ml NaOH N/l)	23 - 32	22 - 29
pH	6.5 - 6.8	6.5 - 6.7
Índice crioscópio (° C)	- 0.601 a - 0.549	-0.588 a - 0.539
Proteína bruta (g/100 g)	5.9 - 8.2	5.0 - 8.1
Matéria gorda (g/100 g)	5.5 - 11.8	5.2 -11.4

Fonte: Alvarenga (1995)

Rodrigues (1944) encontrou para as raças locais da região do queijo da Serra da Estrela, valores médios de densidade que coincidem com o valor de 1.036 apontado por Assenat (1985). As determinações densimétricas aumentam significativamente (1.0353 para 1.0372) ao longo do período de lactação e são influenciadas pelo teor em gordura.

Noutros estudos realizados em Portugal, nomeadamente por Holstein (1981), indica-se para a densidade um valor médio de 1.038 (1.035 - 1.040), enquanto que Baltadjieve et al. (1982) refere médias de 1.036 (1.032 - 1.039).

O conhecimento da acidez titulável é indispensável na prática para avaliação da frescura do leite (acidez natural + acidez devida à actividade microbiana).

No leite de ovelha a acidez e o poder tampão são mais elevados do que em leite de vaca, atribuindo-se esta diferença ao elevado conteúdo proteico da primeira espécie (Anifantakis, 1986).

Os valores da acidez são influenciados pelo regime alimentar (Rodrigues, 1944). Este autor faz ainda alusão a leites de ovelha que na época estival acusam valores de acidez de 35 a 37.5 ml NaOH N/litro. Atribui esta ocorrência à pouca higiene envolvida na lavagem das vasilhas e utensílios do leite, bem como às deficiências no transporte e conservação.

A amplitude de variação do carácter ligeiramente ácido do leite é pequena, tal como Assenat (1985) confirma dos dados recolhidos sobre a raça Lacaune na região de Roquefort, e que vão desde pH 6.60 a 6.68. Martins (1989) encontrou a mesma gama de variação, mas em raças da região do queijo de Azeitão, nomeadamente Saloia e Friserra. O valor médio indicado para leite da espécie ovina é de 6.65 (Assenat, 1985), embora outros valores, tais como 6.58 e 6.57 (Baltadjieva et al., 1982), também sejam válidos.

5 - FLORA MICROBIANA DO LEITE CRU

A microbiologia lactológica é semelhante nas diferentes espécies domésticas exploradas para a produção de leite. Para o leite de ovelha, por exemplo Capriotti (1969) (cit. Assenat, 1985) demonstrou que a flora residente não era especifica para esta espécie.

O leite é um óptimo meio de cultura para o desenvolvimento microbiano, encontrando-se aí disseminadas várias espécies microbianas, repartidas por flora patogénica, saprofita e inofensiva. O leite refrigerado proporciona condições de desenvolvimento da flora banal psicrófila e da flora ecológica psicrotrófica (Veisseyer, 1988).

A contaminação microbiológica provem de diversas origens: as de origem animal e humana, o meio ambiente, equipamento e utensílios intervenientes (Zall, 1980).

As contaminações provenientes dos animais suscitam maior interesse por razões de ordem sanitária e, portanto, quer pelos seus efeitos no homem quer no animal, destacam-se os microorganismos considerados índices sanitários: estafilococos, micrococos, brucella spp. (Nuñez et al., 1989).

Relativamente às outras possíveis vias de poluição microbiana, estão dependentes dos métodos de produção animal. No campo da higiene, incluem-se as instalações do gado, os utensílios e tratador, medidas de higiene na ordenha e a conservação do leite após a mesma, a qualidade do plano alimentar o ambiente e ainda a temperatura e estação do ano (Confederation de Roquefort, 1986) (cit. Martins, 1989).

Nas tradicionais práticas de obtenção de leite de ovelha, por ordenha manual, a via ambiental está aí grandemente implicada. As precárias condições em que se realiza esta operação, os longos períodos de exposição ao ar, devido às vasilhas de recolha não serem herméticas, permitem conspurcações da mais variada natureza (cabelos e pêlos, lama, insectos, etc), incluindo a de origem fecal. Daí que seja frequente detectar coliformes fecais, micrococos e microorganismos do solo. É vulgar, nas amostras de leite de ovelha recolhidas nas explorações,

quantificar as enterobacteriáceas e os coliformes em 10^2 e 10^4/ml (Gurica, 1971; Gaya et al., 1987). Por toda esta envolvente que rodeia a produção de leite desta espécie, não será de estranhar que se encontrem altos níveis de contaminação microbiana. Em condições de higiene deficiente há uma maior diversificação de flora e, consequentemente, maior será a probabilidade de haver uma maior contaminação de microorganismos que afectam gravemente a conservação e integridade do leite (Vieira de Sá et al., 1990).

Os coliformes são bactérias Gram – não esporuladas, que fermentam a lactose com produção de ácidos e libertação de gases ($C0_2$ + H_2) (Soroa, 1980). Estes microorganismos encontram-se normalmente associados às contaminações de origem fecal e atribui-se-lhes grande interesse pelo significado higiénico da sua presença (Thomas, 1971; Thomas et al., 1972) (Cit. Cousin, 1982).

Além da sujidade do úbere existem outros focos, tais como os utensílios e equipamento de ordenha húmido e mal lavado, quantas vezes só enxaguados, os quais são considerados como factores fundamentais da contaminação por coliformes (Zall, 1980). A acção microbiana, pelos motivos acima apresentados, é potencialmente maléfica; quando presentes em grande número os microbios originam defeitos ao nível gustativo e da própria estrutura do produto, como é o caso do flato (opado) do queijo (Vieira de Sá et al.,1990).

Para proceder à avaliação da intensidade de contaminação microbiana de um leite é rotina proceder a contagens da flora total a 30° C. A esta prática recorreram González et al. (1995) para determinar a qualidade do leite de ovelha empregue nas queijarias no fabrico de queijo Manchego. Sobre as amostras recolhidas mensalmente do tanque de refrigeração encontraram, para os mesófilos, valores superiores a 10^7 u.f.c/ml em 50.28% das amostras. Em 20.11% obtiveram valores de contagens entre 3 x 10^6 e 10^7 u.f.c/ml enquanto que para as restantes 29.6% das amostras as contagens foram inferiores a 3 x10^6 u.f.c/ml.

Nuñez et al. (1984) obtiveram contagens em aeróbios mesófilos inferiores a estas; em leite de ovelha da raça Merino Gonzaléz et al., (1995) registaram valores superiores, enquanto que Hassouna et al. (1996), em estudos sobre o queijo Camembert, contabilizaram um nível de mesófilos de 1.2 x 10^6 u.f.c /ml, que detêm uma representatividade de 20 % relativamente à flora total.

Ainda relativamente aos trabalhos de Gonzaléz et al. (1995), a pequena percentagem de amostras que satisfazia os requisitos da legislação comunitária em vigor (máximo 3 x 10^6 u.f.c/ml) era devida, segundo estes, a vários condicionalismos, tais como execução de ordenha manual, inexistência de infraestruturas de refrigeração nalgumas explorações e transporte do leite de forma inadequada. Isto é uma ocorrência comum na produção de leite de pequenos ruminantes. Esta afirmação é concordante com Nuñez et al. (1989), ao referir que é frequente os níveis de viáveis totais superarem contagens de 10^6 u.f.c/ml.

Os grupos de estafilococos e micrococos são frequentes em leite de ovelha, Bautista et al. (1986) dedicaram-se ao seu estudo e caracterização e encontraram valores de 10^3 e 10^4 u.f.c/ml.

Ao que parece, de alguns anos para cá, tem se vindo a assistir a uma maior tomada de consciência de que a produção e recolha do leite se deverá fazer com maiores cuidados de assepsia, pois é na obtenção de uma matéria prima de boa qualidade que está a origem do sucesso dos produtos transformados e, neste caso, dos queijos.

A melhoria das condições de ordenha, por introdução de equipamento mecânico ou, em alternativa, aquisição de pontos móveis de ordenha e a melhoria dos apriscos, permitirá obter uma qualidade higiénica muito próxima da do leite de vaca. Desde 1980 que, em França, se processa ao pagamento do leite de ovelha com base em critérios de higiene, tais como a contagem de viáveis totais, esporulados butíricos, presença de coliformes e células somáticas, bem como no que concerne à qualidade dos seus componentes físicos e químicos (Lagriffoul et al., 1997).

É certo que a ordenha mecânica gera beneficios na restrição do desenvolvimento dos microorganismos viáveis totais e também, agrupamentos microbianos específicos, tais como bactérias acidificantes, entre as quais os coliformes (Petrowa, 1981) (cit. Nuñez et al., 1989). A sua utilização implica cuidados higiénicos redobrados pois, na ausência destes, o leite que passa nos tubos deteriora-se, chegando por vezes a qualidades ainda mais deploráveis que as praticadas na ordenha manual.

BIBLIOTECA DO INSTITUTO POLITÉCNICO Beja

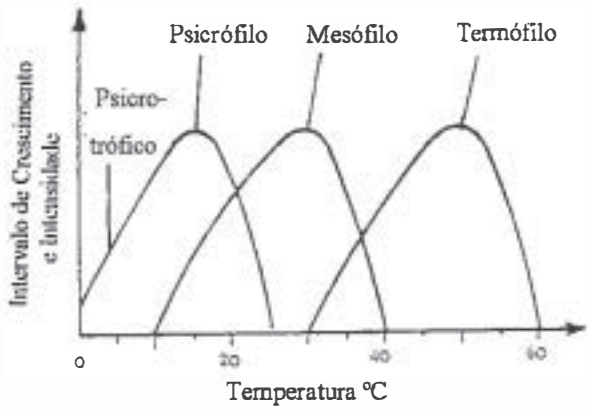
A aplicação de refrigeração em condições de eficácia garantirá a manutenção do nível de qualidade higiénica, pois prolonga o estado de latência dos microorganismos, limitando-lhes o desenvolvimento até ao processamento (Weatherup y Müllan, 1993). Contudo surgem, novos problemas higiénicos, quando a refrigeração se associa a tempos de armazenagem prolongados, sendo por isso seleccionada uma flora psicrotrófica que poderá passar a constituir a flora dominante (Miranda e Gripon, 1986).

Até aos 15° C de temperatura de conservação é a flora psicrotrófica que predomina relativamente à restante. Para além deste valor os psicrotróficos são dominados pelos vigorosos mesófilos. As temperaturas iguais ou inferiores a 7° C os psicrotróficos são os que se apresentam mais capacitados para a multiplicação (Veisseyer,1988). Estes microorganismos, devido ao seu desenvolvimento e actividade metabólica a baixas temperaturas de refrigeração, virão a ter fortes implicações na qualidade dos produtos lácteos (Gripon, 1983).

5.1 - BACTERIAS PSICROTRÓFICAS

A presença de psicrotróficos e os seus efeitos estão profusamente documentados em leite de vaca, não se verificando o mesmo para o leite de ovelha. Reportam-se ao leite de vaca as referências bibliográficas que sustentam este trabalho, salvo quando dispusermos de suporte bibliográfico.

Os microorganismos que compõem a flora indígena do leite podem classificam-se de acordo com os valores de temperatura a que se desenvolvem , tal como se pode ver na fig. 1.10.



Fonte: Kessler (1981)

Figura 1.10 - Classificação dos microorganismos de acordo com a temperatura óptima de desenvolvimento

Com base nos óptimos de temperatura, (fig 1.10) diferenciam-se 3 grupos na flora indígena do leite: termófilos cujo óptimo se situa entre 45° e 50° C, mesófilos entre 25° e 35° C e psicrófilos a temperaturas não superiores a 15° C (Witter,1961).

Vários foram os autores que realizaram estudos para averiguar da existência dos psicrófilos, designadamente Nielsen (1902), terá sido o primeiro a utilizar a terminologia psicrófilo, em láctologia. Na verdade, o que encontraram foi uma minoritária flora psicrófila e uma abundante flora que crescia a baixas temperaturas de refrigeração mas que, contrariamente à definição de psicrófilo, situava o seu óptimo de crescimento a temperaturas superiores a 20° C (Veisseyer,

1988). Houve então necessidade de apelidar este novo grupo de microorganismo, sendo psicrotróficos a designação proposta por Eddy (1960) (cit. Witter,1961).

Com a expansão da técnica de refrigeração aplicada às explorações de bovinos leiteiros, tornou-se necessário aprofundar os conhecimentos à cerca do comportamento da flora contaminante. Das conclusões do Seminário da Federação Internacional de Lacticínios (F.I.L, 1968) surge o termo psicrotrófico, o qual engloba todos os microorganismos cujo óptimo de temperatura ocorre a cerca de 8° C, podendo adaptar-se à gama dos mesófilos (até ± 28° C) (Witter, 1961; Law et al., 1979; Cousin, 1982; Veisseyer, 1988; Cromie, 1992).

A grande diversidade de estirpes psicrotróficas que apresentam capacidade multiplicativa num vasto leque de temperaturas, segundo bibliografia citada por Cousin (1982), poderá ir desde um valor máximo de temperatura de 45° C até um mínimo de 0° C, abaixo da qual cessa a proliferação. Relativamente ao óptimo de temperatura de desenvolvimento não há consenso na bibliografia: os valores apontados situam-se entre 20° - 25° C (Veisseyer, 1988), 20° - 30° C (Cromie, 1992) e 30° - 37° C (Guillard et al., 1993).

O desenvolvimento dos psicrotróficos às baixas temperaturas de refrigeração caracteriza-se por uma demorada fase lag e uma lenta fase log . O grupo das bactérias Gram + é, relativamente ao das Gram –, muito pouco representativo (Cousin, 1982).

A óptima sobrevivência no frio é uma reconhecida habilidade dos psicrotróficos, que tem sido motivo de interrogação e pesquisa no sentido de descortinar de que propriedades tão especiais são eles detentores. Vários autores terão chegado à conclusão que os psicrotróficos possuem uma maior eficiência na absorção de nutrientes, uma actividade mais intensa, que o aproveitamento energético que retira do processo fermentativo é maior, assim como a produção de determinados pigmentos só acontecer a baixas temperaturas de refrigeração (Witter, 1961). Isto traduz um acelerado metabolismo, denunciado por uma produção enzimática que pode ser altamente destabilizadora do leite. Ainda segundo Witter (1961), a taxa de crescimento e metabolismo oxidativo dos psicrotróficos é menos sujeita a alteração por variação da temperatura do que a flora não psicrotrófica. Tudo parece depender da integridade da organização celular.

Está comprovado que a flora psicrotrófica em leite de vaca refrigerado é maioritariamente Gram –, do género das *Pseudomonas* (Cousin, 1982; Miranda e Gripon, 1986; Veisseyer, 1988)

(Suhren, 1989; Sourhang and Stepaniak, 1991) (cit. Cromie, 1992). A representatividade deste agrupamento é de cerca de 73% do universo das amostras, sendo o mais frequente a *Pseudomonas fluorescens* (Bloquel et al., 1980; Richard, 1983). Esta composição é concordante com os resultados encontrados por Uceda et al. (1993) para leite de ovelha sem, no entanto, ter especificado qual a proporção em que se encontra o género predominante.

Os focos de contaminação do leite por psicrotróficos são variados, começando na ovelha, passando pelas instalações, equipamentos, utensílios, e acabando no produto final.

O maneio alimentar é um dos factores implicados na contaminação (Feuillat et al., 1976). A carência de cuidados higiénicos com o equipamento de ordenha, tanques de refrigeração e demais utensílios constituem uma das principais fontes de contaminação por psicrotróficos Gram – (Zall, 1980; Veisseyer, 1988; Pla et al., 1992).

A água das explorações é outro dos factores a controlar prioritariamente, atendendo à respectiva origem e tratamentos a que deve ser submetida, pois ao atravessar diferentes camadas de solo arrasta detritos em decomposição e corpos mortos de natureza animal e vegetal altamente contaminantes (Viesseyer, 1988).

Vários são os autores que consideram que em leite de vaca, os psicrotróficos representam somente 10% da flora original (Cousin, 1982; Griffiths y Phillips, 1988; Cousins y Bramley, 1990) (cit Pla et al., 1992) e 3.55% em leite de cabra (Mor-Mur et al., 1994).

Consoante o número de bactérias psicrotróficas que inicialmente poluem o leite assim se restringe ou alarga o período de conservação no frio, atendendo a que a temperatura tem uma forte influencia na duração da fase de latencia e tempo de geração microbiana (Pla et al. 1992). Níveis iniciais de 500-2.000 u.f.c/ml e 3.500-50.000 u.f.c/ml, o tempo de armazenagem não deverá ir além de 5 dias no primeiro caso e 3 dias no segundo. Se nesta última situação o prazo se alargar dá-se o recrudescimento da respectiva proliferação (+ 500.000/ml), passando a constituir um perigo eminente (Feuillat et al., 1976).

Este importante grupo de microorganismos apresenta a particularidade de produzir enzimas, na maioria dos casos termorresistentes e capazes de destabilizar e alterar a proteína e gordura do leite (Adams et al., 1975; Law et al., 1976; Cogan, 1977). Estas alterações evidentemente estão

na origem da quebra de rendimento em queijo (Onuorah et al.,1980; Banks et al., 1988; Pla, et al.,1992), e afectam gravemente as características sápidas (Quintanilla et al, 1991) e texturais do queijo.

Gonzalez et al. (1995) procederam à avaliação da qualidade microbiológica do leite de ovelha conservado nos tanques de refrigeração em queijarias da zona de produção do queijo Manchego. Os resultados em termos de flora psicrotrófica foram inferiores a 5 x 10^5 u.f.c/ml para a maioria das amostras (73.18%). Para as restantes 10.06%, 12.85% e 3.91% das amostras os valores rondaram os 5 x 10^5 - 10^6, 10^6 - 10^7 e > 10^7 u.f.c/ml, respectivamente.

Os riscos que advêm da actividade metabólica dos microorganismos psicrotróficos poderão ser controlados limitando a contaminação inicial, recorrendo a práticas adequadas de higiéne no ciclo de produção e manejo do leite, podendo-se conseguir níveis inferiores a 10^3 u.f.c/ml. A aplicação de frio nas duas horas subsequentes à ordenha, a temperaturas entre 3° a 4° C por períodos de conservação que não excedam as 48 h, também limitam a elevação dos níveis de contaminação. Estas práticas permitirão uma qualidade microbiológica de níveis inferiores a 5 x 10^4 u.f.c/ml (Lenoir, 1980).

Björck, (1977) sugere a activação do sistema de lactoperoxidase no controlo do crescimento dos psicrotróficos.

5.1.1- ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DOS PSICROTRÓFICOS

Relativamente à qualidade de um leite, Pla et al. (1992) sugerem que a avaliação selectiva se faça com base no conteúdo enzimático e não no conteúdo microbiologico.

Zalazar et al. (1987) encontraram na flora residente de leite refrigerado uma percentagem relativamente alta de Gram –, dos quais só 25% não possuía actividade enzimática, representando assim um potencial de risco sob o ponto de vista tecnológico. No entanto Thomas e Thomas (1973) já tinham verificado que a incidência de estirpes psicrotróficas proteolíticas em leite cru oscilava entre 51 e 97%. Milliere et al. (1979) encontrou que 96.7% da flora caseolítica psicrotrófica era constituída por bactérias Gram –. Uceda et al. (1993), em leite de ovelha,

fazem apenas referência a que a componente maioritária dos Gram –, *Pseudomonas fluorescens* e as variantes fenótipicas proteolíticas se encontravam em elevada proporção. Veisseyer (1988) alerta para o facto de uma carga psicrotrófica elevada, face à respectiva actividade proteásica, poder suscitar o crescimento de bactérias lácticas.

Autores como Cousin (1982), Veisseyer (1988), (Fairbairn et al.,1986; Mottar, 1989) (cit. Uceda et al., 1993) procederam a uma exaustiva revisão sobre a caracterização das enzimas proteolíticas de *Pseudomonas*. Devido à frequência com que ocorrem e os respectivos efeitos sobre a proteína, sugerem as formas de controlar a secreção de enzimas e, por consequência, evitar a depreciação da qualidade do leite.

A *Pseudomonas fluorescens* é susceptível às variações de temperatura, na síntese de proteáses. O frio não as destroi, retarda-lhes apenas a respectiva cinética. No entanto, pode alcançar o máximo de produção entre os 0° e 8° C e irá decrescendo com a elevação da mesma. Contrário é, no entanto, o efeito da temperatura na actividade da proteáse, favorecendo-a quando esta aumenta (óptimo 40° - 45° C) (Veisseyer, 1988).

A fase de crescimento microbiano a que corresponde a síntese de proteáses exocelulares é variável consoante a estirpe. A duração do período de armazenamento, consequentemente, poderá ser encurtada ou alargada, dependendo da secreção se efectuar na fase Lag ou Log, respectivamente (Rowe and Gilmour,1985).

Rowe and Gilmour (1985) demonstraram que a presença de proteases psicrotróficas em leite cru conduz a uma perda de rendimento em queijo de 5%, aproximadamente, quando os níveis deste grupo de microorganismos se situar entre 10^5 a 10^6 u.f.c./ml. As perdas elevam-se para 14% quando os períodos de armazenagem são excessivamente longos, entre 5 a 6 dias.

O crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em leite de ovelha refrigerado resulta num aumento das quebras em caseína e em alterações aquando da coagulação (Picon et al., 1994) (cit. Uceda et al., 1994). Aylward et al. (1979) (cit. Richter, 1980) verificaram que quanto maior é o período de exposição do leite a uma temperatura de 5° C menor é o tempo de coagulação.

Feuillat et al. (1976) encontraram que, em leite de vaca, com um elevado índice de contaminação psicrotrófica, havia uma maior incidência das proteáses sobre a β-CN, solubilizando-a parcialmente na forma de um polipéptido mais pequeno, designado por proteose-peptona. Afirmação concordante com Uceda et al. (1993), pois também lhes foi possível detectar maior susceptibilidade da β-CN ovina ao ataque das proteáses *Ps. fluorescens* inoculadas (quantidade de inóculo 1.5 x 10^7 u.f.c/ml). As quebras registadas durante 6 dias de conservação foram significativamente influenciadas por esta; para 4° C obtiveram uma solubilização de 24.12%, contra 29.7% à temperatura de 8° C. Estranhamente a fracção αs- CN foi mais rapidamente atacada a 4° C (17.47%) e a 8° C (23.33%) do que a β-CN em leite de ovelha sem inóculo. A explicação para este facto segundo Uceda et al. (1993) assenta em que diferentes estirpes de Pseudomonas produzem proteínases com especificidade por cada uma das fracções.

A opinião de um número significativo de autores, sobre às condições de refrigeração do leite, é de que a maioria das proteases psicrotróficas atacam preferencialmente a K-CN, devido à respectiva fracção se situar à superfície da micela. Esta fica destabilizada, e surgindo a coagulação que é em tudo similar ao processo por acção de um coalho comercial. A proteólise prossegue, e de forma mais acentuada sobre a β-CN do que sobre a α-CN (Fairbain and Law, 1986) (cit. Pla et al., 1992).

Kehagias (1982) demonstrou que será possível detectar proteólise com baixos níveis de contaminação psicrotrófica em leite de ovelha, não acontecendo o mesmo para leite de vaca. Um nível bacteriano de 10^7 u.f.c/ml será suficiente para originar a proteólise das fracções β-CN e K-CN em leite de vaca. A degradação desta ultima fracção é mais rápida do que na β-CN (Law et al., 1977,79; Driesseu, 1983) (cit Pla, et al.1992); Gripon, 1983; Valles et al., 1986). Outros autores, como Cousin e Marth (1977), não terão detectado destruição ao nível da caseína K. Na fracção β-CN, os valores da leitura densitométrica revelaram uma ligeira degradação, entre 5-10% (Gripon, 1983).

A metodologia eficaz na diminuição da proteólise causada pelas enzimas caseóliticas psicrotróficas reside na melhoria da qualidade bacteriológica do leite na ordenha, seguida de uma

armazenagem refrigerada (< 4° C) com duração máxima de 3 dias (Milliere, 1979; Driesseu, 1983) (cit. Miranda e Gripon, 1986). Amiot (1991) refere como regra básica que após a ordenha o leite deve ser rápidamente arrefecido até á temperatura de 4° C e depois mantido entre 1° e 4° C.

5.1.1.2 - MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE

A bibliografia consultada faz referencia à utilização de várias metodologias mais ou menos sensíveis para avaliar o grau de proteólise de origem microbiana nas fracções caseínicas quer do leite quer do queijo. A utilização de ácido tricloroacético para a quantificação de péptidos solúveis (Corradini, 1975) (Gripon, 1983) ou de técnicas como "Hide Power Azure" na detecção de proteases microbianas (Cliffe e Law, 1982; Aylward et al.,1979) (cit. Richter, 1980), são apenas alguns dos exemplos.

A lacuna de informação acerca das fracções caseínicas envolvidas, da intensidade da degradação proteica e dos produtos finais da degradação foi suplantada pelo recurso às técnicas electroforéticas. Estas permitem, portanto, uma avaliação qualitativa, por densitometria associada, da degradação proteica por acção enzimática (Gripon, 1983).

A electroforese baseia-se na migração de partículas carregadas por acção de um campo eléctrico. Aplica-se na separação de espécies moléculares ionizáveis em solução, como é o caso das proteínas e dos aminoácidos, os quais incluem na sua estrutura grupos ionizáveis que coexistem como aniões ou catiões.

Gripon (1983) caracterizou os efeitos decorrentes da actividade de psicrotróficos através de electroforese a pH alcalino. Antes dele, já Law et al. (1979) se tinha servido desta técnica para o mesmo fim, comparando resultados obtidos em géis de natureza diferente: acrilamida versus amido.

O diagrama electroforetico denuncia o desaparecimento quase total das bandas de K e β-CN e uma ligeira diminuição de intensidade de coloração da banda correspondente à α_{S1}-CN, isto em leite tratado térmicamente e após 14 dias de armazenagem, onde se desenvolveram diferentes

estirpes proteolíticas de Pseudomonas (Law,1979). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Adams et al. (1976) para as duas primeiras fracções caseínicas.

Populações psicrotróficas da ordem dos 10^6 - 10^7 u.f.c/ml são suficientes para que se verifique uma degradação menos intensa sobre as bandas de α_{S1}-CN e mais intensa sobre as K e β-CN (Guamis et al., 1987). Outros autores são da opinião que os efeitos da proteólise nestas duas últimas fracções só são notórios para contagens superiores a 10^7 u.f.c/ml (Law et al., 1979).

A técnica de isoelectrofocagem (IEF) ou focagem isoeléctrica foi outra das metodologias empregues por Trieu-Cuot e Gripon (1982) e Trieu-Cuot et al. (1982) para a detecção das anomalias derivadas da actividade metabólica microbiana, ao longo do processo de maturação em queijo Camembert.

A IEF diferencia-se das restantes técnicas electroforéticas pelo facto das proteínas se poderem caracterizar pelo pI (valor de pH, para o qual a carga é nula), por permitir a utilização de géis ultra finos encurtam o tempo de resposta e por apresentarem um excelente poder de resolução (Gripon, 1983). O isoelectroforegrama é mais completo porque evidencia bandas não detectáveis por electroforese (Trieu-Cuot e Gripon, 1983). Foi nesta base de trabalho que estes autores determinaram a heterogeneidade das fracções caseínicas do leite das diferentes espécies.

Recentemente esta técnica foi ultrapassada, em poder de resolução pela introdução da electroforese capilar que, segundo Recio et al. (1997), é um método que pode ser aplicado em análises de rotina de leites para estudos fenotípicos.

Acresce fazer-se alguns comentários acerca da IEF, metodologia adoptada neste estudo.

ISOELECTROFOCAGEM OU FOCAGEM ISOELÉCTRICA

A IEF é uma técnica electroforética, onde a separação é determinada não por diferença de mobilidade iónica mas por diferenças em pontos isoeléctricos. A sua inclusão neste grupo justifica-se pelo facto das espécies iónicas, antes de atingirem o estado estacionário, se deslocarem segundo migração electroforética.

Este método permite, em função do pH do meio, uma separação das moléculas anfotéricas. Para tal, é criado um gradiente de pH estável recorrendo à utilização de anfólitos portadores convenientes. As proteínas com carga positiva migram para o cátodo (zona de pH elevado) enquanto que as portadoras de carga negativa migram para o ânodo (zona de pH baixo). Quando atingem um ponto do gradiente onde o pH = pI, a sua carga torna-se nula, perdem mobilidade e são focalizadas (imobilizadas) numa banda estreita. As forças electroforéticas de um lado e do outro da focalização constituem os fenómenos de difusão e conferem-lhe maior poder de resolução do que na instrumentação clássica.

A realização prática da IEF requer a estabilização da solução, sendo conhecidos vários tipos tendo em tendo em conta o processo utilizado. O mais frequente é a IEF em poliacrilamida.

A técnica só começou a ser aplicada em 1960, para identificação das fracções caseínicas bovinas. As vantagens desta relativamente à electroforese são o seu maior poder de resolução e o facto de permitir o uso de um largo intervalo de pH (Trieu-Cuot e Gripon, 1981).

A preparação dos géis envolve a polimerização da acrilamida na presença de metileno-bis-acrilamida. E a porosidade que os caracteriza é definida pelos parâmetros T e C, que representam a concentração em que cada monómero participa na composição do gel. Importa ter géis com os poros elevados para não dificultar a migração proteica (Andrews, 1986).

A limitação experimental desta técnica é a obtenção de um gradiente contínuo a pH estável, o que normalmente é uma dificuldade ultrapassável pela adição de anfólitos (substâncias tampão que, misturadas, criam o gradiente de pH estável). A detecção das proteínas focadas faz-se por coloração. As medições densitométricas das bandas focadas faz-se por medição óptica da intensidade de cor das manchas, o que permite fazer uma análise semi-quantitativa (Andrews, 1986).

6 - REFRIGERAÇÃO DO LEITE

A implementação do processo de refrigeração no tratamento do leite ao nivel das explorações, conjuntamente com a melhoria das condições de produção, adquiriram maior expressão a partir de meados deste século. Este desenvolvimento atribui-se ao maior progresso e proliferação das indústrias leiteiras, que recolhiam leite a grandes distâncias, bem como à promulgação de legislação que obriga ao pagamento do leite aos produtores em função da qualidade (composição fisica e química e qualidade microbiológica) (Alais, 1985; Pla et al., 1992). Os agricultores viram-se obrigados a modificar a tecnologia de produção a par da modernização das instalações e equipamentos, tomando também em consideração as condições ambientais, necessárias à conservação e transporte do leite, em climas tropicais e sub-tropicais.

O recurso à refrigeração generalizou-se primeiramente nas explorações de bovinos leiteiros, em parte devido aos meios financeiros (incluindo subsídios a fundo perdido) colocados ao dispor dos produtores, para o efeito medida acompanhada de uma campanha de sensibilização quanto às boas práticas de higiéne em todo o ciclo do produto. Estas medidas conduziram à melhoria e estabilização da qualidade, aumenta com o poder de conservação.

Foi possível disciplinar a recolha, a qual passou a ser feita por períodos mais dilatados, permitindo à indústria transformadora uma melhor sistematização das respectivas tarefas (Alais, 1985; Amiot, 1991).

A experiência acumulada no campo da refrigeração do leite de bovino tem vindo a alastrar ao sector dos pequenos ruminantes (Manfredini et al., 1989; Pla et al., 1992).

As características e limitações muito próprias da ovinícultura contribuem para que a aplicação da tecnologia de refrigeração, não só por falta de viabilidade económica, devido à produtividade anormal, à dimensão dos efectivos e á dimensão da produção queijeira, mas principalmente pelo elevado custo dos equipamentos, tarde a generalizar-se. Martins (1989) dá ênfase à pequena

dimensão e aos baixos rendimentos, factores que constituem obstáculo à adopção de medidas que acautelem a qualidade do leite de ovelha.

A refrigeração de leite de ovelha, ainda que se trate de pequenos volumes quando comparados com os da produção bovina, e o facto de o leite se destinar à produção de queijo permite mantê-lo estável e alargar o período entre a ordenha e a laboração (Assenat, 1985; Cottier, 1985; Manfredini et al., 1989). Com esta prática melhora não só a qualidade do leite e do queijo como também se economizam custos operacionais. É também possível melhorar a gestão da mão-de-obra e dos tempos dos trabalhadores inerentes à obtenção do queijo (Manfredini et al., 1989). Consequentemente, procurou-se um melhor escalonamento das tarefas no tempo e dignificou-se a actividade dos queijeiros, incluindo os roupeiros.

No Alentejo, a utilização dos tanques de refrigeração está praticamente confinada às queijarias e explorações de pequenos ruminantes vocacionadas para a produção de leite, as quais ultimamente têm vindo a adquirir maior expressão nesta região, o que é tido como símbolo de louvável modernização neste particular sector. Existem no entanto, alguns casos pontuais de explorações de raças autóctones, que adquiriram recentemente pequenas unidades de refrigeração, por se situarem longe das queijarias onde entregam o leite. Vendo assim diminuídos os custos do transporte do produto e proporcionando condições de melhoria da qualidade do leite que produzem. Há no entanto que apoiar tecnicamente estes produtores, no sentido de serem devidamente esclarecidos sobre a técnica e controlo de funcionamento dos equipamentos, afim de evitar insucessos que contrariam os objectivos pretendidos, sobretudo no desejado equilíbrio estrutural do leite como matéria prima.

O método tradicional de arrefecimento do leite consiste em manter à temperatura ambiente as bilhas de transporte, em locais arejados e, é ainda hoje, muito utilizado.

Com frequência, o leite produzido nas explorações é vendido a roupeiros. O transporte realiza-se em bilhas com capacidade aproximada de 40 litros, em veículos de caixa aberta, sem toldo ou qualquer protecção adequada ao rigor do tempo, até ser entregue na queijaria. A situação torna-se efectivamente gravosa quando a temperatura ambiente se eleva, atingindo níveis propícios à proliferação microbiológica, principalmente durante o Verão, em que as médias registadas no Alentejo são consideradas abrasadoras. Neste caso, as consequências são adversas à estabilidade do leite, principalmente no que se refere à acidez.

6.1 - FINALIDADE E EFICÁCIA

O objectivo da refrigeração aplicada ao leite logo após a ordenha é a manutenção das propriedades originais até ao momento do tratamento ou da transformação. A eficácia do processo depende fundamentalmente do nível higiénico com que se desenrola todo o ciclo da produção, como já foi afirmado. A contaminação inicial, além de definir a qualidade do leite, orienta o destino que se lhe pretende dar (Alais, 1985; Bloquet et al., 1980; Manfredini et al., 1989; Amiot, 1991; Rebelo, 1994). A refrigeração não tem qualquer acção melhoradora em leites higienicamente deficientes. Ela exerce inibição da flora contaminante, que se deseja de baixo teor (Alais, 1985). Nestas situações, a aplicação de frio máscara os efeitos daí derivados (Robinson, 1978).

A Portaria nº 533/93 estabelece para leite de vaca após ter sido ordenhado e não recolhido nas duas horas seguintes deverá ser refrigerado a temperaturas ≤ 8° C, no caso de recolha diária, ou 6° C se a recolha não for diária. No transporte do leite para os locais de tratamento e transformação, a temperatura não deverá exceder os 10° C.

Em bibliografia do C.N.E.R.N.A. (1978), recomenda-se que a armazenagem do leite na exploração não ultrapasse o volume de 4 ordenhas e que seja arrefecido a temperaturas ≤ 4° C (Auclair et al., 1981).

Quanto mais elevado o índice microbiano inicial e tanto mais lento é o arrefecimento, até atingir a temperatura de refrigeração de 4° C, mais cedo e mais rapidamente se dá a multiplicação (Veisseyer, 1988).

Chapman et al. (1976) investigaram durante os meses estivais quais os efeitos da elevação da temperatura (5°, 7.5° e 10° C) em leite armazenado até aos 3 dias em tanques de refrigeração isotérmicos. As alterações encontradas foram essencialmente do foro bacteriológico, físico e químico. Depois de identificada a flora residente no leite, e combinando os efeitos de aumento de temperatura com prolongamento da armazenagem do leite nos tanques, verificaram que o número de microorganismos aumentava e que a flora era praticamente similar, com excepção de

que para alguns grupos, nomeadamente as bactérias Gram – psicrotróficas, a representatividade era mais marcante.

Soroa (1980), referindo-se ao arrefecimento, indica as temperaturas de 4° C como as mais indicadas para a paralisação da actividade e multiplicação dos microorganismos no leite. Os recipientes destinados à conservação devem estar em salas frescas, não devem ser sujeitos a trepidações externas e a temperatura deve ser mantida constante e baixa.

A tendência actual de refrigeração do leite de ovelha na própria exploração, por espaços de 48 horas, juntamente com o possível armazenamento do mesmo nas fábricas a 4° C, por períodos de outras 24 a 48 horas até à elaboração do queijo, induz profundas alterações no nível e composição da flora microbiana (Nuñez et al., 1980) (cit Nuñez et al., 1981).
Outra das finalidades da aplicação de frio é prolongar a fase bacteriostática microbiana (Alais, 1985). No caso da secreção láctea de ovelha este apresenta a particularidade de não necessitar de refrigeração imediatamente após a ordenha, pois a duração desta fase é superior à das outras espécies (cerca de 8 h, contra 2 h nos bovinos) o que lhe permite maior resistência à proliferação microbiana.

6.2 - EFEITOS DO PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO

Os problemas tecnológicos que a refrigeração pode originar têm sido abordados em diversos estudos envolvendo o leite de vaca, mas pouco se tem feito com leite de pequenos ruminantes. Estes conhecimentos permitem-nos, no entanto, retirar ilações e prevenir as condições da eventual utilização deste processo de conservação no leite de ovelha.

6.2.1 - AO NÍVEL DA COMPOSIÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

Na refrigeração são evidentes as alterações empreendidas sobre os componentes do leite (Remeuf, 1994) e que segundo Veisseyre (1988), se fazem sentir essencialmente a três níveis:

a) aumento da estabilidade da dissolução coloidal;

b) diminuição da estabilidade da emulsão em que se encontra a gordura;

c) desenvolvimento de lipólise.

a) Às temperaturas de 0-4° C, em que normalmente se processa a conservação, verifica-se que há um aumento da estabilidade da dissolução coloidal que se traduz numa redução do poder coagulante do coalho. Na indústria queijeira as repercussões incidem no aumento do tempo de formação da coalhada, que pode ir além dos 20 % do normal em leite refrigerado durante 24 horas, à temperatura ≈ 4° C. O gel que se obtêm é de menor firmeza, mais quebradiço e por conseguinte de sinéresis menos intensa, o que se traduz num menor rendimento queijeiro (Ichilczyk - Leone, et al., 1981; Amiot, 1991; Veisseyre, 1988). Manufacturando queijo a partir de leite de ovelha obtém-se também uma sineresis menos intensa do que a partir de leite de vaca, quando o mesmo foi sujeito a uma prolongada refrigeração (Kehagias, 1983) (cit Pla et al.,1992).

Este problema tecnológico atribui-se a modificações na estrutura do edifício micelar caseinico e no equilíbrio salino (Ichilczyk - Leone et al., 1981;Veisseyre, 1988; Amiot, 1991; Pla et al., 1992).

A associação das caseínas na formação micelar é prejudicada pelo frio, que actua de forma solubilizadora nalgumas delas, nomeadamente sobre a caseína β (Amiot, 1991); desprende-se da micela durante as primeiras 48 horas de armazenagem (Ali et al., 1980) e passa à forma solúvel. Em consequência deste facto, o teor de caseína solúvel num leite refrigerado a 4° C pode aumentar de 10 para 20 %. Se atendermos ao facto de que a fracção β representa $^1/_3$ do total das caseínas em leite de vaca, ½ em leite de ovelha e $^3/_4$ em leite de cabra, quer dizer que serão de esperar consideráveis perdas no rendimento quando se está a laborar leite refrigerado de pequenos ruminantes (Manfredini et al., 1989).

O equilíbrio salino é alterado pelo efeito solubilizador que o frio tem sobre o fosfato de cálcio coloidal. Este desempenha um importante papel na agregação das submicelas caseínicas, mas se provocarmos a sua solubilização, o que obteremos são micelas de reduzidas dimensões, finamente dispersas na solução. O fenómeno é acompanhado de um aumento da camada de hidratação das micelas, que reforça a estabilidade da dissolução coloidal.

Os teores em cálcio solúvel aumentaram em cerca de 10 a 20 %, e na ordem dos 10 % os teores em fósforo inorgânico solúvel (Davies e White, 1960; Ichilczyk - Leone et al., 1981;Veisseyre, 1988).

Os níveis de magnésio dissolvido ou em suspensão coloidal não sofreram alteração (Ichilczyk-Leone et al., 1981). Estes investigadores salientaram ainda que os problemas causados pela conservação são em parte reversíveis, mas de uma forma lenta. A maneira de minorar estes efeitos, proposta por Amiot (1991), é adicionar cloreto de cálcio ou aquecer o leite até ≈ 30° C, antes de juntar o coalho.

A composição química do leite encontrada para o fabrico de queijo em todas as amostras foi de 3.20 - 3.70 % gordura, 8.31 - 8.65 % MSD, relação caseína/gordura 0.66 - 0.76 e relação gordura/MSD 0.38 - 0.44. A leve diminuição dos MSD, acompanhada da ligeira diminuição da caseína, foi evidente nos leites armazenados durante 3 dias; as variações na gordura realçam a necessidade de uma adequada agitação do leite durante uma armazenagem prolongada. No pH

também encontraram alterações no sentido do decréscimo durante os 3 dias de armazenagem como resposta ao aumento lento da temperatura (Chapman et al., 1976).

Reimerdes e Herlitz (1979) observaram que no leite conservado a 48 h/4° C o teor de caseína γ era mais elevado do que a 26° C, revelando maior sensibilidade às baixas temperaturas, tendo sido atribuído à plasmina a acção proteásica verificada.

b) e c) A perturbação do estado de emulsão em que se encontra a gordura é explicada pela cristalização fraccionada. Ocorre primeiramente sobre os glicéridos de membrana, e em simultâneo com a diminuição da temperatura no leite. Os triglicéridos insaturados e de baixo peso molécular encontram-se líquidos no interior do glóbulo de gordura ascendem, através das fissuras, ao nível da membrana e vão-se depositar na superficie destes, perdendo afinidade para a água. A tendência para a lipófilia conduz à aglomeração de glóbulos de gordura, que precipitam pela gravidade. Assim se justifica o aparecimento de uma camada de gordura no leite refrigerado a 5 - 10° C. Normalmente, esta ocorrência conduz ao aparecimento de lipólise (Veisseyre, 1988; Amiot, 1991).

Manfredini et al. (1989) considera que o aparecimento de lipólise é uma consequência extremamente importante da aplicação do sistema de frio ao leite por períodos alargados, e reconhece 3 tipos: a lipólise induzida, que resulta da acção da lípase natural do leite sobre os glóbulos de gordura; a expontânea que tem origem nas diferentes alterações em termos de composição e características do leite; finalmente a mais importante no estudo em curso, que resulta da actividade metabólica dos microorganismos psicrotróficos que ubiquamente proliferam em leite refrigerado.

Uma intensa lipólise confere o sabor a ranço ou a sabão que aparece no leite ou seus derivados. Em leite de ovelha e cabra, com o mesmo grau de lipólise, produzem-se flavores devidos ao elevado conteúdo em ácidos gordos de cadeia curta (Manfredini et al., 1989).

6.2.2.- AO NÍVEL DA COMPONENTE MICROBIANA

Com o advento dos sistemas de refrigeração nas explorações incrementou-se a qualidade, aumentou o tempo de vida útil do leite, por redução da taxa de multiplicação microbiana, e evidenciou-se a falsa protecção que representa a refrigeração, quando aplicada a leites de má qualidade higiénica.

Mas novos problemas surgiram com a descoberta de que as vulgares temperaturas de refrigeração do leite promovem o desenvolvimento de psicrotróficos, que rapidamente dominam a microflora à custa de outra menos adaptada, como é o caso da flora acidificante (Witter, 1961; Zall, 1978; Gripon, 1983; Rowe and Gilmour, 1985; Pla et al., 1992). Sobre esta problemática incidiram os estudos realizados por Bloquel e Veillet-Poncet (1980). O seu delineamento experimental teve como objectivo avaliar se a refrigeração estava ou não na origem de uma selecção microbiana e se, paralelamente, se alterava a natureza e o equilíbrio da microflora do leite cru. Num leite refrigerado à temperatura de 4° C, a contagem de flora psicrotrófica Gram – sobrepunha-se à mesófila Gram+. Bloquel e Veillet-Poncet (1980) nas mesmas condições de refrigeração do leite. Verificaram também que o número de mesófilos pouco evoluiu, passando de 1×10^4 para 1.5×10^4 u.f.c/ml, enquanto que os psicrotróficos tiveram um aumento significativo de 5×10^2 para 4×10^3 u.f.c/ml, à medida que se alargou o período de armazenamento de 20 para 96 horas.

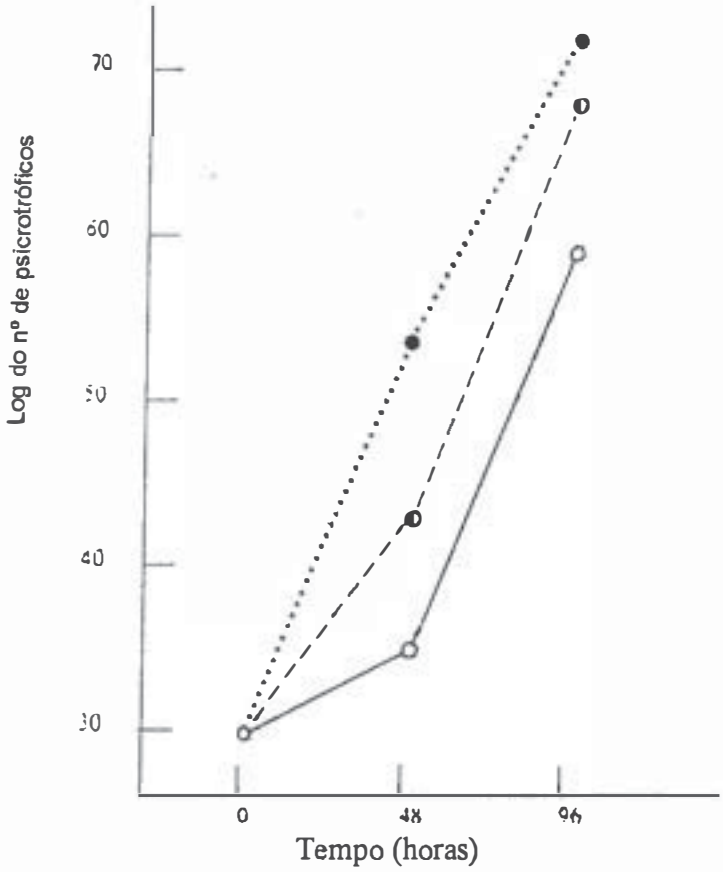
Existem vários factores a condicionar a proporção de psicrotróficos no leite refrigerado: o grau e composição da flora contaminante inicial, a temperatura, a duração da refrigeração (Feuillat et al.,1976; Bloquel et al., 1980) e, com menor influencia, os sistemas de inibição natural do leite (Zall, 1980).A relação psicrotróficos/flora total de um leite antes da refrigeração pode variar entre limites tão amplos como de 3 a 90% (Feuillat et al.,1976), 1 a 87% (Pla et al., 1992) ou, em certos casos, ultrapassar mesmo o valor da flora total (Nuñez et al., 1984; Pla et al., 1992). A variação destes níveis está dependente do grau de higiéne conseguido no momento da ordenha.

Confrontando baixos (< 500 u.f.c/ml) e altos níveis de poluição microbiana na ordenha, Leonoir et al. (1974) verificaram que, enquanto para a 1ª situação os valores eram inferiores aos 1.500 u.f.c, na 2ª poderiam mesmo ultrapassar o 1.000.000 u.f.c/ml, após 3 dias de conservação e a

temperaturas entre 3° - 5° C. Uma população microbiana superior a 1 x 10^7 u.f.c/ml torna-se prejudicial porque provoca efeitos prejudiciais bastante pronunciados, devido à actividade degradativa sobre os componentes butirosos e proteicos do leite (Milliére et al.,1976; Zall, 1978).

A temperatura é, sem duvida, o factor mais importante pois, tem um efeito directo sobre a duração da fase de latência e o tempo de geração para cada microorganismo (Pla et al., 1992). No caso dos microorganismos psicrotróficos, Dousset et al. (1988) observaram que estes se desenvolviam mais rapidamente em leite conservado durante 48 horas (4.5 x 10^4 para 10^6 u.f.c/ml) à temperatura de 8° C do que no mesmo período à temperatura de 3° C (4.5 x10^4 para 8 x10^4 u.f.c/ml).

A esta mesma conclusão chegaram Muir et al. (1978) quando observaram o efeito de diferentes temperaturas (8°, 6° e 4° C) no desenvolvimento de psicrotróficos (fig. 1.11).



Fonte: Muir et al. (1978)

Figura 1.11 - Efeito da temperatura no crescimento dos microorganismos psicrotróficos em leite cru (● - 8° C; ○ - 6° C e ○ - 4° C).

Se o período de refrigeração se alargar para 96 h, a situação agrava-se, em consequência do ritmo de desenvolvimento mais acelerado dos microorganismos psicrotróficos, sendo mais evidente como documenta a fig. 1.11, para a temperatura de 4° C. Contudo à temperatura de 8° C continua a verificar-se níveis de psicrotróficos mais elevados do que a 4° C (Log ≈60). O valor das contagens 6° C contrariamente ao verificado no final das 48 h, aproxima-se mais dos valores obtidos a 8° C, embora continue a ter um posição intermédia.

Tompkin (1973) (cit. Rowe e Gilmour,1985) referem que o ritmo da multiplicação de psicrotróficos aumentou de 3h, 7h e 8.6 h, em leite submetido a um leque de temperaturas de 10° C, de 4° - 5° C e de 2° - 2.5° C.

A conservação entre 2 e 4° C durante 72 h, ou a 6 e 8° C durante 48 h, é recomendado para leite de ovelha somente para contagens iniciais inferiores a 10^3 u.f.c/ml (Nikolov, 1985).

Relativamente à influência do período de armazenamento no comportamento dos microorganismos, Feuillat et al. (1976) verificaram que, leite de vaca conservado a 4° C durante 24 e 96 h, proporcionava aumentos de 1.5 vezes na contagem da flora total (FT) e 5.8 vezes na contagem de psicrotróficos (FP). Os bacilos Gram – aumentaram 62 e os coliformes 51 vezes. Em leite de ovelha, às mesmas condições registaram-se aumentos de 81 e 41 vezes para FT e FP ,respectivamente (Nuñez et al., 1981). Para Pla et al. (1992), os valores elevaram-se 16.6 vezes para FT, enquanto que para FP foi de 20.3 vezes.

Ainda em leite de vaca, foi observado que no decurso de 72 h de refrigeração se alcançavam valores de flora psicrotrófica de 10^7 u.f.c/ml (Law et al., 1979) ou de 6.8 x 10^7 u.f.c/ml, e no caso deste período aumentar para 120 h, os valores incrementam-se para 9.3 x 10^8 u.f.c/ml (Cousin e Marth, 1977). No leite submetido a curtos períodos de conservação a proporção de psicrotróficos é inferior a 10% (Sogaard e Lund, 1981) (cit. Mor-Mur et al., 1994).

Em leite de ovelha, proveniente de 6 ordenhas e sujeito à refrigeração de 4° C, Pla et al. (1992) determinaram um nível médio de FT de 8.54 x 10^5 e 6.08 x 10^6 u.f.c/ml e um nível de FP de 5.81 x 10^5 e 6.02 x 10^6 u.f.c/ml para a 1ª e 2ª lactações, respectivamente, quando submetido a 72 h de conservação.

Quando se alargou este período para 120 h, e somente para a 1ª lactação, os níveis médios da FT aumentaram para 1.42 x 10^7 e a FP para 1.18 x 10^7 u.f.c/ml. Anteriormente a estas investigações, já Nuñez et al. (1984) tinham feito referência a que, para as mesmas condições de refrigeração - 4° C/72h, era possível encontrar valores médios de 7.9 x 10^5 u.f.c/ml para a FT e de 2.2 x 10^5 u.f.c/ml para FP.

Níveis de contaminação inicial com 4 x 10^6 u.f.c /ml de psicrotróficos, em leite submetido à temperatura de conservação de 5° C/72 h, aumentam para 8 x 10^7 u.f.c /ml (Botazzi, 1970) (cit. Zalazar et al., 1987). Estes níveis são preocupantes pois pressupõem produção de enzimas (proteáses e de lípases) destabilisantes do equilíbrio físico do leite (Lenoir, 1980).

O tempo de geração determinado para as bactérias *Pseudomonas fluorescens* foi de 2 ou 8 h, conforme a temperatura de armazenagem se situa entre 11° - 14° C e 1° - 4° C, respectivamente (Lenoir et al., 1974). Para temperatura de 2° C, Durr (1974) admite mesmo que a actividade microbiana está parada durante 4 dias.

A contaminação inicial e a duração do período de armazenagem a baixa temperatura condiciona o desenvolvimento das bactérias psicrotróficas ao longo da refrigeração (Feuillat et al., 1976). A repercussão no crescimento destes parece ser mais evidente quando se procede ao abaixamento da temperatura para valores < 4° C (Veisseyer, 1988). Em virtude deste facto, as temperaturas mais baixas de refrigeração parecem ser os níveis indicados para o prolongamento do tempo de vida útil do leite (Banks et al., 1988).

CAPÍTULO 2
MATERIAL E MÉTODOS

A matéria prima que serviu de base a este estudo foi obtida de 2 rebanhos de 2 raças diferentes: a Lacaune, em produção na Herdade dos Coteis, no concelho de Moura, e a Merina Branca em produção no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóboda, no concelho de Serpa.

Os regimes de exploração são diferentes, face às respectivas índoles: uma estatal cujo objectivo principal é a investigação aplicada; a outra de carácter privado (Herdade dos Coteis), inteiramente virada à viabilidade económica.

1- REGIME DE EXPLORAÇÃO DOS REBANHOS

EXPLORAÇÃO A - LACAUNE

A Herdade dos Coteis conta com um efectivo de 1400 ovelhas de raça Lacaune, explorado em regime intensivo, na dupla aptidão carne - leite. Os borregos são desmamados precocemente, pelo que as fêmeas entram à ordenha um mês a um mês e meio após o parto. Esta medida visa incrementar a produção de leite por lactação, pois aproveita-se a fase inicial da curva de lactação, que é a mais produtiva. Pratica-se a ordenha mecânica e o leite é refrigerado. A produtividade conseguida é elevada, permitindo a laboração contínua da queijaria, assegurando portanto, o abastecimento durante todo o ano do mercado com Queijo Serpa.

Dado tratar-se de uma raça exótica, oriunda da região dos Pirinéus, onde as características edáfo-climáticas são diferentes das do Baixo Alentejo, o poder de adaptação é menor, requerendo maiores cuidados no trato. Por outro lado, como se caracteriza por um elevado potencial de produção quer em carne quer em leite (140 a 150 l/lactação[6]), as exigências alimentares assumem carácter prioritário no tratamento do rebanho. A alimentação deste efectivo faz-se à base de pastagens naturais adubadas, forragem semeada, palha e feno. A dieta é ainda

[6] Período de 150 - 180 dias.

enriquecida com suplementos proteicos (luzerna desidratada) e alimentos compostos adequados aos ovinos, sendo normalmente fornecidos na sala de ordenha.

EXPLORAÇÃO B - MERINA

As 60 ovelhas do rebanho da raça Merina Branca são pertença do Estado e servem de apoio à investigação aplicada na área animal. Os animais desta raça, outrora explorados na sua aptidão tripla, são actualmente usados somente para produção de carne e leite. A lã em virtude do baixo valor comercial atribuído deixou de ser uma actividade rentável.

Esta raça é essencialmente vocacionada para a função creatopoiética, já que o quantitativo em leite produzido por lactação[7] é muito pequeno (≈ 30 l) (Bettencourt, J., 1986). No entanto, dada a dimensão dos rebanhos, o sistema de exploração inclui também o aproveitamento do leite. Esta prática faz-se em virtude do seu alto valor comercial, representando uma mais valia importante no rendimento das explorações, bem como pela riqueza desta matéria prima (gordura, proteína e consequentemente em estrato seco) que, desde tempos remotos, tem servido de base ao fabrico de um tipo de queijo muito afamado na região - o Queijo Serpa.

O efectivo em causa tem sido explorado para leite e a ordenha efectua-se mecânicamente. O leite não é refrigerado; é transportado de imediato para a queijaria, onde é produzido sob a forma de Queijo Serpa.

Os ovinos desta raça têm o solar de origem nesta região, encontrando-se bem adaptados às respectivas condições edafo-climáticas. São pouco exigentes em termos alimentares e de maneio. As ovelhas entram à ordenha dois meses após o parto. O regime de exploração é semi-intensivo e a alimentação é feita à base de pastagens naturais e semeadas (aveia/vicia e aveia/tremocilha). Um mês antes do parto inicia-se a suplementação da dieta com concentrado comercial e bagaço de girassol. Esta suplementação continua até à altura do desmame dos borregos, e também para as ovelhas que entram no "alavão", até ao final do mesmo.

[7] Período de 77 a 120 dias (Borrego, 1985).

Em resumo, e como é dado verificar pelo acima exposto, o leite que serviu de base a este estudo proveio de rebanhos de 2 raças diferentes, sujeitos a técnicas que se distingem pelos regimes de maneio e de alimentação, pelo que o comportamento das amostras será posteriormente analisado em separado.

2 - RECOLHA DE AMOSTRAS

A recolha das amostras decorreu durante os meses de Dezembro a Abril de 1997, correspondente ao alavão de 96/97. As determinações analíticas efectuaram-se no laboratório da UNESUL, pertencente à Escola Superior Agrária de Beja.

Nas duas explorações foi praticada a ordenha mecânica.

No caso da herdade dos Coteis, o leite é bombado directamente para o tanque de refrigeração (*Bulk tanque*), onde atinge a temperatura de ± 4° C, após o que é enviado para a queijaria onde se processa diariamente a transformação, com excepção do fim de semana. Nesta altura, o leite fica ali armazenado (≈ 48 horas); nos restantes dias da semana, a conservação àquela temperatura é de apenas 10 - 12 horas.

Na herdade da Abóboda, todo o leite é laborado no próprio dia, com excepção do fim de semana, quando o tanque de refrigeração é cheio com água, que irá servir de líquido refrigerador das bilhas lá imersas.

A recolha das amostras (amostra de rebanho) efectuou-se quinzenalmente, em número de três, e segundo os procedimentos estabelecidos na legislação Portuguesa NP - 402 (1966) - "Leite. Colheita de amostras: que fixa as regras a observar nas colheitas de amostras de leite".

As amostras, na herdade dos Coteis, foram recolhidas nos seguintes locais:

- tanque, após 48 horas de refrigeração (L_{48})
- tanque, após 12 horas de refrigeração (L_{12}).
- à saída do tubo condutor do leite da máquina de ordenha para o tanque de refrigeração (L_0 ou seja, leite não refrigerado).

Na herdade da Abóboda a colheita efectuou-se toda no mesmo dia. O leite foi recolhido do equipamento de ordenha, através do tubo de purga, para uma bilha metálica onde, depois de homogeneizado, se subdividiu em três fracções:

- a 1ª fracção (M_0), não refrigerada, foi analisada imediatamente após a chegada ao laboratório;

- as outras fracções foram colocadas em frigorifico à temperatura de 4° C ± 1° C; sendo a 1ª retirada após 12 horas (M_{12}) e a 2ª no final das 48 h (M_{48}).

Estas condições reproduziram os níveis térmicos praticados na herdade dos Coteis.

3 - ÍNDICES FÍSICOS E QUÍMICOS

Executaram-se as determinações físicas e químicas de rotina, comprovativas da genuinidade e frescura do leite analisado, e que se enumeram:

- pH, por potenciómetro
- acidez titulada NP 470, 1983.
- densidade relativa, por processo corrente NP 474, 1983 .
- teor em matéria gorda - técnica de Gerber NP 469, 1983.
- proteína bruta - técnica de Kjeldahl NP 1986, 1991.

4 - ÍNDICES MICROBIOLÓGICOS

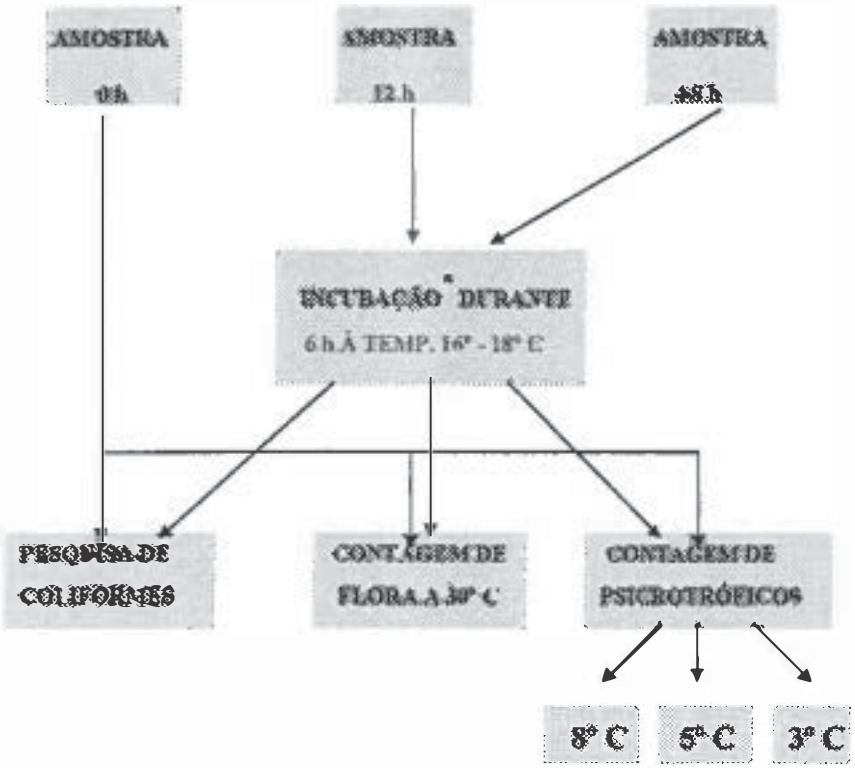
O esquema analítico praticado consta no quadro 2.1 e fig. 2.1 e 2.2, e realizaram-se os seguintes testes:

- pesquisa de bactérias coliformes NP - 1935, 1986.
- contagem de microorganismos a 30° C NP - 459, 1985.
- contagem de microorganismos psicrotróficos NP - 2307, 1987.

Quadro 2. 1- Determinações analíticas efectuadas, com menção das temperaturas e tempos de incubação.

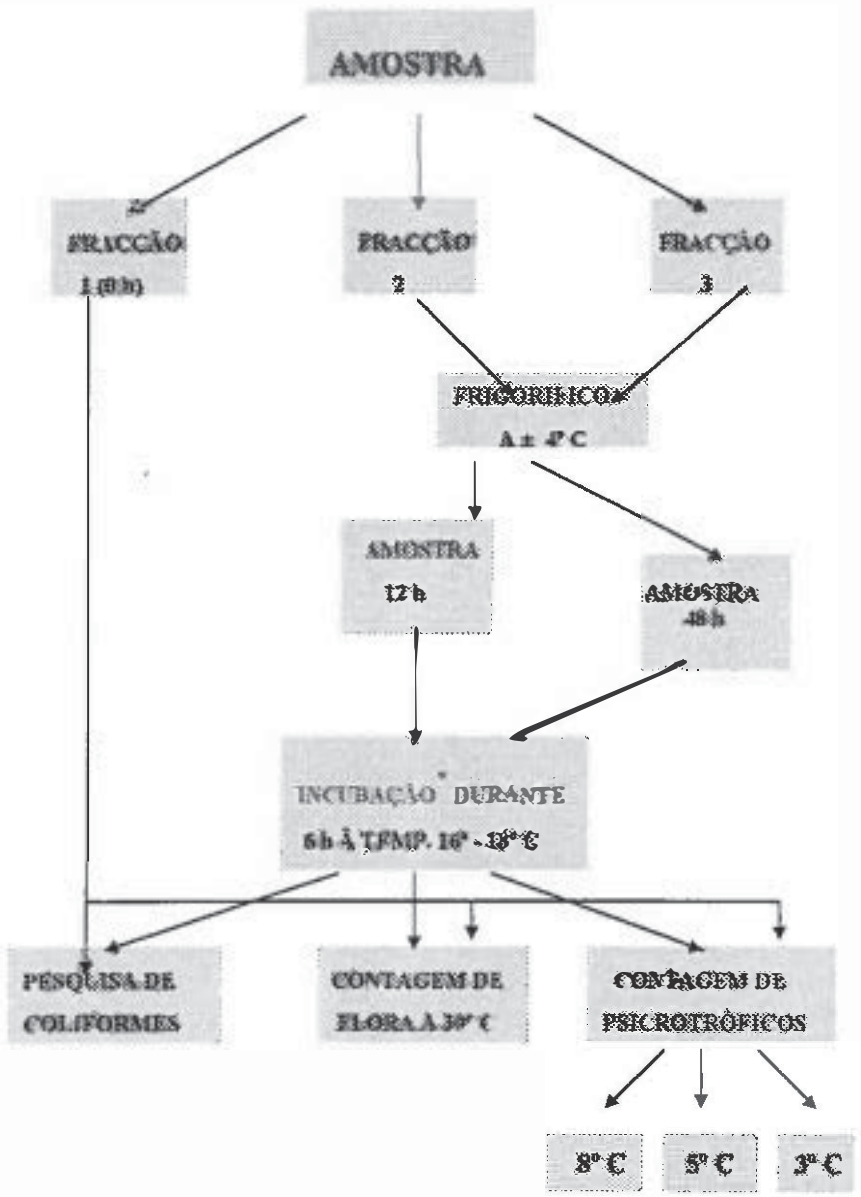
Análises	Temperatura de Incubação	Tempo de Incubação
Coliformes	37° C	36 horas
Mesófilos	30° C	72 horas
Psicrotróficos	8° C	10 dias
	5° C	12 dias
	3° C	17 dias

Figura 2.1 - Esquema analitico das amostras de leite Lacaune



* - Incubação para revigoramento da flora contaminante

Figura 2.2 - Esquema analítico das amostras de leite Merino.



* - Incubação para revigoramento da flora contaminante

5 - ISOELECTROFOCAGEM OU FOCAGEM ISOELECTRICA

A aplicação desta técnica instrumental visou avaliar o grau de proteólise de origem bacteriana no leite.

5.1. - COLHEITA DE LEITE

Uma pequena porção de cada amostra de leite destinada às análises microbiológicas, após incubação, destinava-se à separação das caseínas. Como este procedimento não se realizou de imediato, conservaram-se estas a -20° C e o leite foi previamente desnatado por centrifuga a 3000 x g, à temperatura de 4° C e durante 30 minutos.

5.2. - AMOSTRAS

5.2.1. - SEPARAÇÃO DAS DIFERENTES FRACÇÕES CASEÍNICAS

A execução deste procedimento baseou-se no trabalho de Wei and Whitney (1985) que descreve o fraccionamento das caseínas bovinas, embora alguns ajustamentos tenham sido efectuados, para aplicação a leite de ovelha.
Descrevem-se de seguida alguns dos procedimentos levados a cabo para a obtenção isolada das diferentes fracções caseínicas, designadamente no leite da raça Merina. Optou-se por realizar esta separação apenas na raça autóctone por ser a ovelha tradicional da região.

- Da amostra $5M_0$ (amostra de leite Merino não refrigerado correspondente ao 5° período de amostragem) retirou-se uma porção que se levou à centrifuga para desengordurar.
- Cerca de 30 ml de leite desengordurado foi precipitado a pH 4.6 com uma solução de ácido acético a 25%. Esta solução centrifugou-se a 4000 r.p.m. durante 5 minutos, para a obtenção do precipitado.

- O líquido sobrenadante decantou-se e adicionou-se ao precipitado 30 ml de água bidestilada. Homogeneizou-se, controlou-se o pH inicial e foi de novo a centrifugar. O processo repetiu-se mais duas vezes.
- O precipitado obtido foi de novo disperso em água, com pH ajustado para 7.5. Voltou-se a reprecipitar a pH 4.6 e a procedeu-se às lavagens tal como foi efectuado anteriormente.
- Preparou-se uma solução de 3.3 M de ureia, 0.02% azida de sódio e 2 mM DTT (pH 7.4). Num volume de solução igual ao volume inicial de leite dispersou-se o precipitado caseínico. Esta dispersão foi colocada numa membrana de diálise, a qual foi a equilibrar com uma solução de 3.3 M ureia, 0.02% de azida de sódio e 77 mg de DTT (pH 7.4), durante 24 horas, a 5° C. Verteu-se o conteúdo da diálise para um copo de centrifuga e adicionadou-se DEAE-celulose à razão de 1L/50 g (peso seco).
- A purificação de cada fracção foi conseguida mediante soluções de ureia contendo NaCl em concentrações crescentes e por centrifugação a 3000 r.p.m durante 5 minutos. Seguidamente procedeu-se à concentração e à liofilização.
- A preparação de cada fracção para a IEF foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em 5.2.3.

5.2.2. - OBTENÇÃO DA CASEÍNA DO LEITE

Para a separação das caseínas adicionou-se ao leite desengordurado e aquecido a 40° C, 20% de sulfato de sódio anidro. Após a dissolução do sal e arrefecimento da mistura a 20° C, as caseínas precipitadas foram separadas por filtração, através de um papel de filtro da Whatman n° 541. Este precipitado das caseínas foi dissolvido em água bidestilada, reprecipitado com ácido acético 1 M e levou-se à centrifuga a 3000 x g, à temperatura de 10°-12° C, durante 5 minutos.

Decantou-se o soro de leite e homogeneizou-se o resíduo com uma pequena quantidade de água bidestilada, tendo-se levado de novo à centrifuga. Este procedimento repetiu-se mais 1 vez com água bidestilada e outra vez com uma mistura de água bidestilada/diclorometano, na proporção de 2:1.

No final dispersou-se o precipitado em 50 ml de acetona isenta de água e filtrou-se com papel de filtro de pregas da Whatman n° 2. O resíduo do filtro lavou-se 2 vezes com 25 ml de acetona, e deixou-se secar ao ar. Finalmente, pulverizou-se finamente o resíduo num almofariz (Aschaffenburg e Drewry, 1957).

5.2.3.- SOLUÇÃO TAMPÃO PARA DISSOLUÇÃO DA CASEINA

As amostras das caseínas dissolveram-se numa solução tampão de ureia contendo 10 % (p/v) de glicerol, 8 M de ureia e 32 mM de ditiotreitol (DTT). Esta solução obteve-se conforme a seguinte mistura:

115 g de glicerol;

4.81 g de ureia;

50 mg de DTT;

10 ml de água bi-destilada.

Para 0.5 ml de tampão de ureia dissolveram-se 5 mg de caseína isolada e 15 mg do liofilizado de cada fracção pura. Esta suspensão foi desgaseificar num banho de ultra sons durante cerca de 20 minutos. De seguida, procedeu-se à respectiva aplicação no gel.

5.3. - ISOELECTROFOCAGEM EM GEL DE POLIACRILAMIDA - UREIA

5.3.1 - GEÍS DE POLIACRILAMIDA - UREIA

Na execução técnica utilizaram-se géis de poliacrilamida com 6% T/2.6% C (260 x 125 x 0.2 mm) contendo 6 % (v/v) de anfólitos portadores, 10 % (p/v) de glicerol e 8 M de ureia. A obtenção do gel inicia-se com a preparação de uma solução stock de gel [8] (ver nota) através da dissolução dos seguintes reagentes:

1.6 ml de solução comercial de acrilamida/bisacrilamida a 40 %;

4.805 g de ureia;

1.63 g de glicerol;

10 ml de água bidestilada

[8] A condutividade da solução stock de gel não deverá ultrapassar o valor de condutividade de 5 µS. Sempre que isto acontecer deve proceder-se a uma desionização por agitação com 0.2 ou 1 g de resina de troca catiónica TMD - 8, durante 30 minutos, seguida de filtração através de uma membrana de 0.45 µm.

Esta solução conservou-se em recipiente de cor âmbar, no frigorífico (máximo 10 dias). Imediatamente antes da confecção da placa do gel pipetaram-se 9.4 ml da solução stock de gel, aos quais se adicionaram:

110 µl de Pharmalyte 4.2 - 4.9

280 µl de Pharmalyte 4.5 - 5.4

Procedeu-se à mistura dos componentes na solução, a qual foi a desgaseificar, durante cerca de 2 - 3 minutos, num banho de ultra sons. A esta solução de polimerização juntaram-se ainda 10 µl de TEMED e 12 µl de solução de PER a 40 % (p/v) (400 mg em 1 ml).

A placa de gel foi executada no Ultramould-Gel Casting Kit (mesa de moldagem), onde polimerizou durante 1.5 h à temperatura ambiente, após o que se procedeu à sua remoção e armazenagem em caixa hermética a 4° C, onde aguardou posterior utilização dentro de um prazo máximo de 10 dias.

5.3.2. - FOCAGEM ISOELÉCTRICA

5.3.2.1 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES ELECTROLÍTICAS

Anódica - Para 100 ml de solução utilizou-se 5.77 g de ácido fosfórico (85 % p/p), que se diluiu em água destilada até perfazer o volume.

Catódica - dissolveram-se 2 g de hidróxido de sódio em água destilada, para um volume de 100 ml

5.3.2.2 -CONDIÇÕES DE ISOELECTROFOCAGEM

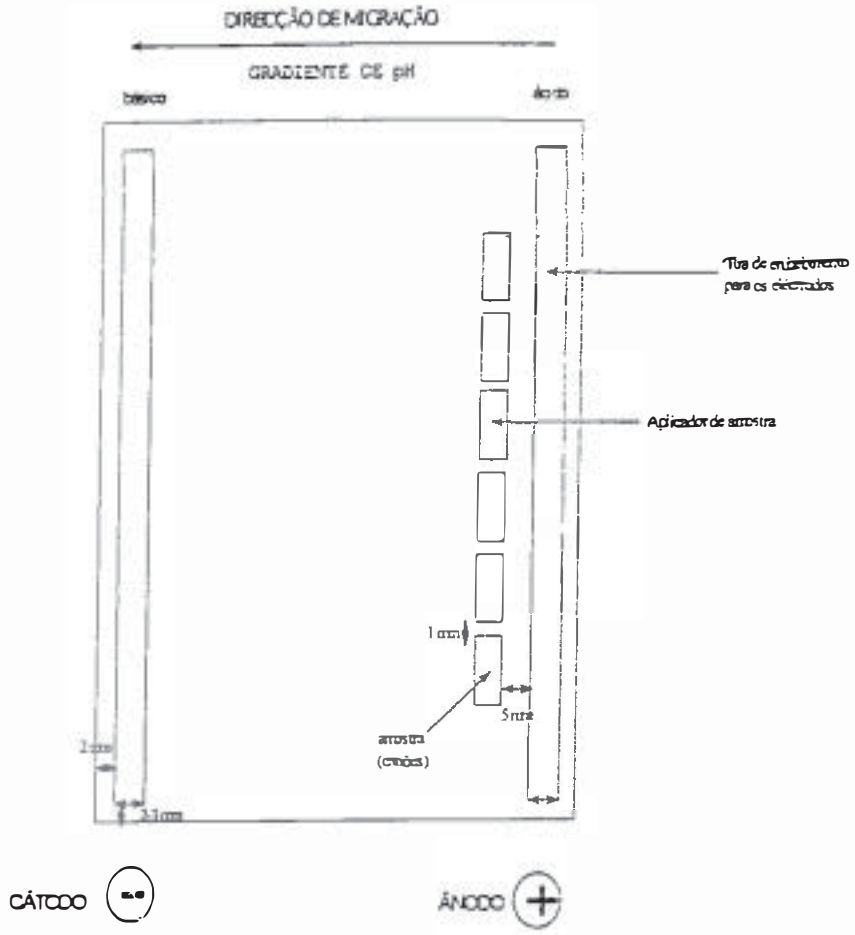
Os aparelhos utilizados nesta técnica são constituidos por um termostato de circulação que garante as condições ideais de refrigeração para o gel, de forma a garantir uma corrida electroforética com sucesso, uma câmara electroforética que se encontra conectada a este e onde

se realiza a IEF, câmara essa que, por sua vez se encontra ligada a uma fonte de alimentação constante, própria para electroforese.

A IEF é uma técnica electroforética demorada e que requer o cumprimento de vários procedimentos, que a seguir passaremos a enumerar:

- Em primeiro lugar, deve-se ligar o termostato de circulação MultiTemp II 15 minutos antes de dar início à IEF e regular a temperatura para 12° C.
- Na câmara electroforética procedeu-se à colocação do gel sobre a placa de arrefecimento mediante algumas gotas de água. É importante que a aderência do gel à placa seja total e não existam bolhas de ar.
- Impregnaram-se as tiras de papel de filtro, às quais se irão sobrepor os eléctrodos, com as soluções anódica e catódica e colocaram-se sobre o gel, conforme indica a fig. 2.3.
- De seguida colocaram-se os eléctrodos e procedeu-se à colocação da tampa na câmara electroforética.
- Na fonte de potência constante que permite regular as condições electroforéticas (voltagem, corrente e potência) seleccionou-se a posição on do interruptor de controlo para dar início à préfocagem (Q.do 2.2). Esta primeira etapa destina-se a uniformizar o gradiente de pH a todo o gel.
- Terminada esta primeira operação desligou-se a fonte eléctrica e retirou-se a tampa e o suporte de eléctrodos. Com uma pinça colocaram-se os aplicadores de amostra sobre o gel, na proximidade da tira embebida pela solução anódica, e com intervalos entre si de 1 mm (fig. 2.3).
- A quantidade de cada amostra colocada em cada aplicador foi de 15 µl.
- Recolocou-se o suporte dos eléctrodos e a tampa, e prossegui-se com a focagem da amostra (Q.do 2.2).
- Finalizada esta etapa do processo retiraram-se, com a ajuda da pinça, os aplicadores da amostra e deu-se continuidade à IEF (Q.do 2.2). Uma vez esta terminada procedeu-se à coloração das proteínas, tal como a seguir se descreve.

Figura 2.3 - Aplicação das amostras para Isoelectrofocagem



Quadro 2.2 - Condições de Isoelectrofocagem

	TEMPO (min)	VOLTAGEM (V)	CORRENTE (mA)	POTÊNCIA (W)
Préfocagem	30	2000	15	4
Focagem da amostra	40	2000	15	4
focagem I	20	2500	15	4
focagem II	90	2500	4	20

5.4 - COLORAÇÃO DAS PROTEÍNAS

5.4.1 - SOLUÇÕES DE COLORAÇÃO

A preparação das soluções de coloração , resumem-se no quadro 2.3.

Quadro 2.3 - Soluções de coloração

SOLUÇÕES	PREPARAÇÃO
Fixação	Dissolução de 115 g de ácido tricloroacético e 34.6 g de ácido sulfosalicílico em água destilada, até perfazer 100 ml.
Sol. de descoloracão	Mistura de volumes iguais de solução de metanol 50 % (v/v) e de ácido acético a 20 % (v/v). Esta solução deve ser preparada todos os dias e pouco tempo antes da sua utilização.
Sol. mãe I	Em 1000 ml de metanol a 50 % (v/v) adicionaram-se 3.0 g de azul brilhante de Comassie G 250. Para facilitar a dissolução deste utilizou-se um agitador magnético (cerca de 45 minutos).
Sol. mãe II	Numa solução de 1000 ml de ácido acético a 20 % (v/v) dissolveram-se 5 g de sulfato de cobre pentahidratado.

5.4.2 - COLORAÇÃO

- Terminada a focagem isoeléctrica colocou-se o gel num tabuleiro apropriado para coloração/descoloração e colocou-se no agitador mecânico, com 200 ml de fixador, durante aproximadamente 3 horas em agitação suave.
- Lavou-se a placa de gel 2 vezes com 100 ml de sol. de descoloração.
- Verteram-se 250 ml de solução de coloração, que resultou da mistura de volumes iguais das sol. mãe I e mãe II, no tabuleiro; deixando a placa corar durante 45 minutos.

Decantou-se esta solução e lavou-se o gel 2 vezes, com 125 ml de sol. de descoloração de cada vez. Em seguida, juntaram-se 200 ml de sol. de descoloração de cada vez e agitou-se durante 2 x 15 minutos. A placa de gel permaneceu nesta sol. até estar completamente descorada; para tal substitui-se a solução sempre que foi necessário. Finalmente, lavou-se o gel com água destilada e deixou-se secar ao ar.

5.5 - DENSITOMETRIA

Nos geís de IEF procedeu-se à quantificação de cada banda existente em cada coluna, por leitura no densitómetro UltroScan XL (Pharmacia - LMB).

Os resultados das leituras densitométricas foram processados e integrados pelo GelScan XL™ Software Package, versão 2.1.

Nos densitogramas obtidos seleccionou-se apenas os picos correspondentes às fracções caseínicas: α-CN, β-CN e K-CN e efectuou-se a correcção da área relativa a cada um dos picos seleccionados.

6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatisticamente, procedeu-se à avaliação das distribuições das observações relativas às análises fisicas e químicas, e microbiológicas para as diferentes variáveis utilizadas neste trabalho.
Verificou-se que em todas elas à escala original, resultavam distribuições não normais, de acordo com a estatística W de Shapiro-Wilk (1965). Para ultrapassar esta dificuldade procedeu-se, de seguida, à transformação logarítmica das variáveis, com o intuito de obter distribuições normais. Deste modo, cumpriu-se os pressupostos necessários à implementação da análise de variância, nomeadamente a aditívidade dos factores incluídos no modelo e a normalidade dos resíduos (Snedecor e Lochran, 1991).

O modelo de análise de variância utilizado nas duas raças, e para todas as variáveis, incluía os efeitos da periodicidade de colheita de amostras, que designamos por *periodo* (6 níveis) e duração do armazenamento do leite em refrigeração, que designamos por *refrigeração* (3 níveis).
As análises de variância foram efectuadas recorrendo ao Proc. GLM (General Linear Model) do SAS (1985).
No capítulo que se segue trataremos sempre as duas raças em separado pelos motivos já anteriormente apresentados.

CAPÍTULO 3.
APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

I- ANÁLISE CRÍTICA GENÉRICA

Como já foi referido, este estudo considera-se uma prospecção em matéria pouco explorada e, por isso, do maior interesse no particular sector da tecnologia do queijo de produção artesanal.

As premissas que serviram de base a este estudo foram as seguintes:

- A sazonalidade da produção de leite ("alavão" de curta duração na raça Merina), o curto período de execução, e a disponibilidade de amostras em quantidades mais representativas das situações em estudo. Estes factores aliados a algumas dificuldades de caracter laboratorial prejudicaram a sequência dos trabalhos previamente delineados, restringindo o plano inicialmente estabelecido.

- As análises fisicas e químicas foram efectuadas para determinar o valor tecnológico do leite e sua genuinidade. Alguns dos parâmetros, designadamente a acidez e o pH, foram considerados indicadores de possível actividade de bactérias psicrotróficas.

- A avaliação da actividade proteolítica foi feita pelo método instrumental IEF, e procedendo-se à quantificação densitométrica apenas nas amostras correspondentes às de carga microbiana psicrotrófica mais elevada, coincidentes com o grupo de psicrotróficos a 8° C, no leite de ambos os rebanhos.

2- ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

2.1 - VARIÁVEIS DESCRITIVAS

Nos quadros 3.1 e 3.2 apresentam-se os resultados obtidos relativamente às características fisicas e químicas dos leites submetidos a refrigeração (4° C) durante três períodos, para os rebanhos Lacaune e Merino, respectivamente.

Quadro 3.1 - *Rebanho Lacaune*. Estatísticas descritivas para a Acidez, pH, Densidade, Proteina e Gordura em função do tempo de refrigeração (0, 12 e 48 h).

	0				12				48			
	n	X	MAX.	MIN	n	X	MAX.	MIN	n	X	MAX.	MIN
ACIDEZ (NaOH N/ml)	6	23.3	34.0	25.0	5	27.80	35.0	23.0	6	28.17	35.0	24.0
pH	6	6.74	6.89	6.66	5	6.64	6.78	6.40	6	6.73	6.80	6.69
DENSIDADE	6	1.04	1.04	1.03	5	1.037	1.039	1.036	6	1.037	1.040	1.034
PROTEINA (%)	6	6.05	6.94	5.00	5	5.57	6.04	5.17	6	6.01	6.41	5.74
GORDURA (%)	6	6.45	9.54	5.33	5	5.95	7.30	3.86	6	6.09	6.39	5.44

n- nº de observações; X - media; Max. - máximo; Min.- mínimo.

Quadro 3.2 - *Rebanho Merino*. Estatísticas descritivas para a Acidez, pH, Densidade, Proteina e Gordura em função do tempo de refrigeração (0, 12 e 48 h).

	0				12				48			
	n	X	MAX.	MIN	n	X	MAX.	MIN	n	X	MAX	MIN
ACIDEZ (NaOH N/ml)	6	28.17	32.0	23.0	5	28.0	33.0	23.0	6	29.0	34.0	25.0
pH	6	6.62	6.71	6.46	5	6.65	6.69	6.60	6	6.64	6.70	6.59
DENSIDADE	6	1.035	1.036	1.033	5	1.035	1.037	1.032	6	1.035	1.037	1.032
PROTEINA (%)	6	6.89	7.60	6.05	5	7.02	8.56	6.01	6	6.94	7.73	6.02
GORDURA (%)	6	10.04	12.35	8.00	5	9.34	10.[illegible]	8.1	6	9.11	11.22	7.48

n- nº de observações; X - media; Max. - máximo; Min.- mínimo.

Da observação destes quadros e tomando com referência os valores médios das análises fisicas e químicas obtidas às zero horas de refrigeração, pode concluir-se o seguinte:

- Independentemente do período de refrigeração obtiveram-se valores de acidez, que em termos médios se situaram dentro dos resultados previstos (27 e 29 ml NaOH N/l). Estas variações assemelham-se às referidas por Alvarenga (1995), em rebanhos das mesmas raças.

- Todos os valores de acidez se encontram dentro dos padrões estabelecidos na pr NP-3547 (1987), exceptuam-se os valores de máximo que estão compreendidos entre 30 e 35 ml NaOH N/l, respeitantes a único período de colheita de amostras em cada um dos rebanhos. Entende-se que estes resultados não constituem no entanto motivo de segregação do leite para fabrico de queijo, pois o afastamento dos valores padrão não faz perigar o necessário equilíbrio físico e químico.

- Os valores médios de pH variaram entre 6.64 - 6.74 para o rebanho Lacaune e 6.62 - 6.65 para o rebanho Merino, independentemente do tempo de refrigeração.

- Considera-se de interesse referir que os valores de pH obtidos para leite não refrigerado do rebanho Merino se encontram numa gama de valores em tudo semelhante à referida por Alvarenga (1995), para a mesma raça e também por Assenat (1985) e por Martins (1989), em raças diferentes. No rebanho Lacaune, os valores de pH foram ligeiramente superiores aos indicados por Alvarenga (1995) e Assenat (1985).

- No rebanho Merino, os valores médios de densidade mantiveram-se constantes (1,035) para as medições de 0, 12 ou 48 horas de refrigeração e no rebanho Lacaune esta característica variou entre 1.037 - 1.040.

- O teor médio proteíco e o teor médio butiroso encontrado para os leites de ambos os rebanhos, por medição nas amostras não refrigeradas, está de acordo com os resultados obtidos por Alvarenga (1995), nas mesmas raças. Estes valores confrontados com os obtidos para as restantes determinações a 12 e 48 h de refrigeração, permitem-nos afirmar que as variações ocorridas durante este processo de conservação foram de pequena amplitude.

- Pode-se concluir que à excepção de alguns valores obtidos para a acidez titulada, todos os restantes índices se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos na pr NP-3547 (1987). Revelando assim plena aptidão para o aproveitamento tecnológico sob a forma de queijo, designadamente Queijo Serpa.

2.2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

EXPLORAÇÃO A - Lacaune

O quadro 3.3 resume a análise de variância considerando o período de colheita das amostras (6 níveis) e tempo de refrigeração (3 níveis) como fontes de variação.

O período em que se efectuou a recolha de amostras só não teve influência significativa, nos valores de pH e da gordura, mas influenciou, de forma altamente significativa ($p<0.001$), a acidez e a densidade. Por seu turno, a refrigeração não influenciou significativamente nenhuma das características do leite em análise.

Quadro 3.3 – *Rebanho Lacaune.* Fontes de variação, graus de liberdade (G.L.), valor de F, coeficiente de variação (C.V.) e coeficiente de determinação (R^2) para as características físicas e químicas do leite.

	ACIDEZ		pH		DENSIDADE		PROTEÍNA		GORDURA	
Fontes de Variação	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F
PERÍODO	5	80.73***	5	0.25	5	12.21***	5	7.12**	5	2.18
REFRIGERAÇÃO	2	0.35	2	1.07	2	0.97	2	2.69	2	0.17
RESÍDUO	9		9		9		9		9	
C.V. (%)	2.71		1.67		0.09		4.50		16.89	
R^2	0.98		0.32		0.87		0.84		0.56	

[a] p< 0.10 †; p< 0.05 *; p< 0.01 **; p< 0.001 ***

De referir que, à excepção da gordura os coeficientes de variação foram extremamente reduzidos, indicando pouca variabilidade dos dados.

Atendendo ao baixo valor de R^2, para o pH, pode-se concluir que esta foi a única característica, em estudo, em que o modelo estatístico adoptado foi o menos adequado. Na análise dos restantes parâmetros do leite considera-se razoável a adequação do respectivo modelo.

No quadro 3.4 apresentam-se as médias dos mínimos quadrados dos parâmetros físicos e químicos do rebanho Lacaune.

Quadro 3.4 - *Rebanho Lacaune*. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão dos parâmetros físicos e químicos para as variáveis período de amostragem e tempo de refrigeração (0, 12 e 48 horas).

		ACIDEZ	pH	DENSIDADE	PROTEÍNA	GORDURA
Fontes de variação		X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP
Período	1	26.10 ± 0.5^{c}	6.77 ± 0.1^{a}	1.034 ± 0.0^{d}	6.56 ± 0.2^{c}	7.97 ± 0.8^{a}
	2	34.67 ± 0.4^{a}	6.69 ± 0.1^{a}	1.039 ± 0.0^{a}	5.35 ± 0.2^{a}	4.80 ± 0.6^{bc}
	3	24.00 ± 0.4^{d}	6.73 ± 0.1^{a}	1.036 ± 0.0^{c}	6.32 ± 0.2^{c}	6.40 ± 0.6^{cb}
	4	25.00 ± 0.4^{cd}	6.80 ± 0.1^{a}	1.037 ± 0.0^{c}	5.76 ± 0.2^{ab}	6.09 ± 0.6^{bc}
	5	28.33 ± 0.4^{b}	6.69 ± 0.1^{a}	1.038 ± 0.0^{b}	5.88 ± 0.2^{a}	6.13 ± 0.6^{bc}
	6	26.00 ± 0.4^{c}	6.67 ± 0.1^{a}	1.037 ± 0.0^{bc}	5.64 ± 0.2^{ab}	6.27 ± 0.6^{abc}
Refrigeração:	0 h.	27.33 ± 0.3^{a}	6.74 ± 0.0^{a}	1.038 ± 0.0^{a}	6.05 ± 0.1^{a}	6.45 ± 0.4^{a}
	12 h.	27.55 ± 0.3^{a}	6.65 ± 0.1^{a}	1.037 ± 0.0^{a}	5.60 ± 0.1^{b}	6.29 ± 0.5^{a}
	48 h.	27.17 ± 0.3^{a}	6.73 ± 0.0^{a}	1.037 ± 0.0^{a}	6.03 ± 0.1^{a}	6.10 ± 0.4^{a}

Para cada parâmetro físico e químico e fonte de variação, médias com letras distintas são significativamente diferentes (P<0.10).

As médias dos mínimos quadrados para a acidez confirmam a influência altamente significativa do período, dada a diversidade de valores encontrados. Estes resultados eram de prever, uma vez que se trata de um índice que não é constante, por sofrer influência do meio ambiente através da temperatura. Além disso está dependente de uma actividade biológica, como é a microbiana.
Com excepção das amostras recolhidas no período 2, todas as outras se situam dentro dos limites referidos na bibliografia e legislação (Alvarenga, 1995; pr NP354). Situações desta natureza poderão ser devidas a desequilíbrios entre os constituintes básicos e ácidos do leite. Não se atribui à actividade microbiana, embora os valores de pH que lhe correspondem sejam ligeiramente ácidos.

A densidade normalmente é usada na detecção de fraudes por aguamento, embora não seja uma determinação muito fiável (Alais, 1985). Para este parâmetro, registaram-se variações ao longo do período, resultado que seria de esperar, dado tratar-se de um índice que não é constante, por que é dependente de outros índices: varia proporcionalmente com a concentração de resíduos não gordos e inversamente com o teor em gordura do leite. Atente-se nos resultados de acidez e gordura (ver quadro 3.5.).

O teor proteico e o teor butiroso variaram durante o período de recolha de amostras, facto previsível dado tratar-se de índices que não são constantes. Além do mais, trabalhou-se com

amostras de rebanho, que não retratam a evolução do ciclo de lactação, em virtude da constante renovação dos animais à ordenha.

Tal como se referiu na interpretação dos resultados das análises de variância a determinação dos índices fisicos e químicos não foi afectada significativamente pela refrigeração. Optou-se por apresentar estas médias apenas por uma questão de caracterização global do estudo efectuado.

EXPLORAÇÃO B - Merino

A análise de variância efectuada para o leite do rebanho Merino, apresenta-se no Q.do 3.5. A partir deste pode-se concluir que o período influenciou de forma significativa os resultados dos índices físicos e químicos, excepto para os valores de acidez iónica. Salienta-se a influência altamente significativa ($p< 0.001$) sobre a acidez e a proteína. À semelhança do que ocorreu para a raça Lacaune, não se verificou que o tempo de refrigeração das amostras tivesse tido influência significativa ($p< 0.10$) na avaliação da composição do leite Merino.

Quadro 3.5 - *Rebanho Merino*. Fontes de variação, graus de liberdade (G.L.), valor de F, coeficiente de variação (C.V.) e coeficiente de determinação (R^2) para as características físicas e químicas do leite.

	ACIDEZ		pH		DENSIDADE		PROTEÍNA		GORDURA	
Fontes de Variação	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F
PERÍODO	5	24.96***	5	1.61	5	5.77*	5	22.62***	5	7.62**
REFRIGERAÇÃO	2	0.90	2	0.28	2	0.11	2	0.19	2	2.46
RESÍDUO	9		9		9		9		9	
C.V (%)	3.81		1.06		0.09		3.96		7.67	
R^2	0.93		0.49		0.76		0.93		0.83	

[a] $p< 0.10$ †; $p< 0.05$ *; $p< 0.01$ **; $p< 0.001$ ***

Em geral, os resultados apresentam uma baixa variabilidade, como se pode verificar pelos dados dos coeficientes de variação. Os valores de R^2 apresentaram-se elevados para a maioria das variáveis, pelo que se considera razoável a adaptabilidade do modelo estatístico.

Os resultados referentes às médias dos mínimos quadrados para os diversos parâmetros estudados encontram-se no Q.do 3.6 para o rebanho Merino.

Relativamente à acidez, verifica-se uma maior amplitude de valores médios no rebanho Merino. Atendendo a que, a legislação estabelece para acidez um valor máximo de 30 ml NaOH N/ml, verificou-se que alguns dos resultados obtidos ultrapassaram este limite, nomeadamente no 1° e 4° períodos de recolha de amostras. No entanto a grandeza deste desvio não foi considerada

restritiva para o aproveitamento tecnológico do leite. A explicação para este facto poderá serão feita de forma semelhante à descrita para a exploração A.

Quadro 3.6 - Rebanho Merino. Média dos mínimos quadrados ± erro padrão dos parâmetros físicos e químicos para as variáveis período de amostragem e tempo de refrigeração (0, 12 e 48 horas).

		ACIDEZ	pH	DENSIDADE	PROTEÍNA	GORDURA
Fonte Variação		X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP
Período	1	30.97 ± 0.8^{a}	6.66 ± 0.0^{a,b}	1.034 ± 0.0^{b}	6.82 ± 0.2^{c}	10.89 ± 0.4^{a}
	2	27.66 ± 0.6^{b}	6.66 ± 0.0^{a,b}	1.036 ± 0.0^{a}	7.94 ± 0.2^{a}	10.83 ± 0.4^{a}
	3	23.33 ± 0.6^{c}	6.6 ± 0.0^{a,b}	1.032 ± 0.0^{c}	6.03 ± 0.2^{d}	10.11 ± 0.4^{a,b}
	4	32.66 ± 0.6^{a}	6.56 ± 0.0^{b}	1.036 ± 0.0^{a,b}	7.46 ± 0.2^{b}	7.93 ± 0.4^{c}
	5	28.66 ± 0.6^{b}	6.69 ± 0.0^{a}	1.035 ± 0.0^{a,b}	6.15 ± 0.2^{d}	8.60 ± 0.4^{b,c}
	6	28.00 ± 0.6^{b}	6.58 ± 0.0^{b}	1.035 ± 0.0^{a,b}	7.25 ± 0.2^{c}	9.13 ± 0.4^{b}
Refrigeração:	0 h	28.47 ± 0.4^{a}	6.62 ± 0.0^{a}	1.034 ± 0.0^{a}	6.89 ± 0.1^{a}	10.04 ± 0.3^{a}
	12 h	28.48 ± 0.5^{a}	6.65 ± 0.0^{a}	1.034 ± 0.0^{a}	6.99 ± 0.1^{a}	9.60 ± 0.3^{a,b}
	48 h	29.00 ± 0.4^{a}	6.64 ± 0.0^{a}	1.035 ± 0.0^{a}	6.94 ± 0.1^{a}	9.11 ± 0.3^{b}

Para cada parâmetro físico e químico e fonte de variação, médias com letras distintas são significativamente diferentes (P<0.10).

Dados relativos à densidade apresentam-se significativamente diferentes. Por se tratar de um índice que não é constante, este resultado era de esperar.

Os valores das médias dos mínimos quadrados para o teor proteico e para o teor butiroso registaram amplitudes de variação considerável. No caso dos valores de gordura verifica-se que este componente do leite se manteve constante até ao 3° periodo de amostragem, ao que se seguiu uma diminuição e acréscimo posterior, até finais da recolha de amostras. A explicação para este facto assenta na renovação de alguns animais à ordenha no período de amostragem em causa. Dado se tratar de uma raça que produz diariamente pequenas quantidades de leite, a entrada de alguns animais numa fase da lactação diferente dos que estavam à ordenha, influenciou os resultados em termos de componentes maioritários do leite, como sejam a proteína e a gordura.

Em termos globais da análise dos parâmetros físicos e químicos do leite julgamos que se pode concluir o seguinte:

- Nos dois rebanhos, o período de amostragem só não influenciou significativamente o pH, e no caso do leite Lacaune, o teor butiroso.
- O facto de se dispor de amostras não refrigeradas e refrigeradas durante 12 h ou 48 h, não teve qualquer influência significativa nas determinações de acidez, pH, densidade, proteína e gordura, no leite de ambos os rebanhos.
- Em geral e para ambos os casos, os coeficientes de variação apresentaram-se baixos; variaram entre 0.09 e 4.50%.
- Os valores obtidos para os índices físicos e químicos situaram-se dentro dos padrões estabelecidos na pr NP-3547 (1987). E consideraram-se de acordo com a bibliografia índices característicos de cada uma das raças em análise, a Merina e a Lacaune.
- Em súmula, ambas as explorações produzem leite de genuinidade comprovada e de valor tecnológico bastante para a transformação em queijo

3- ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.1- VARIÁVEIS DESCRITIVAS

Algumas estatísticas descritivas para as características microbiológicas do leite dos rebanhos da raça Lacaune e Merina, encontram-se resumidas no Q.do 3.7 e Q.do 3.8, respectivamente.

Quadro 3.7 – *Rebanho Lacaune*. Estatísticas Descritivas referentes à contagem de microorganismos Coliformes (Coli), Mesófilos (Meso), Psicrotróficos (P), a três temperaturas de incubação (8º, 5º e 3º C) e a diferentes tempos de refrigeração (0, 12 e 48 h).

	0				12				48			
	n	X	MÁX.	MIN	n	X	MÁX.	MIN	n	X	MÁX.	MIN
Coli (N.M.P./ml)	6	21,4	110	0,4	5	23,7	110	0,4	6	28,5	110	2,50
MESO (u.f.c./ml)	6	152000,0	$5,2x10^5$	$4,9x10^4$	5	241400,0	$3,6x10^5$	$1,8x10^5$	6	400000,0	$1,3x10^6$	$3x10^4$
P8ºC (u.f.c./ml)	6	18483,3	$3,8x10^4$	$2,9x10^3$	5	44400,0	$9,9x10^5$	$2,4x10^4$	6	87000,0	$2,3x10^5$	$1,1x10^4$
P5ºC (u.f.c./ml)	6	7916,7	$2,0x10^4$	$1,8x10^3$	5	13020,0	$2,7x10^4$	$1,8x10^3$	6	60283,3	$2,1x10^5$	$7,7x10^3$
P3ºC (u.f.c./ml)	6	3916,7	$7,3x10^3$	$1,5x10^3$	4	9150,0	$1,4x10^4$	$4,1x10^3$	6	7318,3	$1,3x10^4$	$1,1x10^3$
P8/Meso (%)	6	0.20	0.76	0.03	5	0.24	0.47	0.07	6	0.34	0.74	0.06
P5/Meso (%)	6	0.10	0.32	0.02	5	0.06	0.15	0.01	6	0.33	0.72	0.01
P3/Meso (%)	6	0.04	0.05	0.01	4	0.04	0.06	0.01	6	0.03	0.07	0.01

Quadro 3.8 – *Rebanho Merino*. Estatísticas Descritivas referentes à contagem de microorganismos Coliformes (Coli), Mesófilos (Meso), Psicrotróficos (P), a três temperaturas de incubação (8º, 5º e 3º C) e a diferentes tempos de refrigeração (0, 12, 48 h).

	0				12				48			
	n	X	MÁX.	MIN	n	X	MÁX.	MIN	n	X	MÁX.	MIN
Coli (N.M.P./ml)	6	30,45	110	0,30	5	39,2	140	0,4	6	36,6	110	4,5
MESO (u.f.c./ml)	6	142500,0	$3,4x10^5$	$5,4x10^4$	5	425000,0	$1,6x10^6$	$7,5x10^4$	6	1337166,7	$6,6x10^6$	$1,2x10^5$
P8ºC (u.f.c./ml)	6	14133,3	$4,0x10^4$	$1,6x10^3$	5	71200,0	$2,7x10^5$	$1,1x10^3$	6	272833,3	$6,4x10^5$	$1,6x10^4$
P5ºC (u.f.c/ml)	6	4483,3	$1,7x10^4$	$1,5x10^3$	5	16780,0	$3,4x10^4$	$1,9x10^3$	6	111166,7	$4,5x10^5$	$1,3x10^4$
P3ºC (u.f.c./ml)	5	3808,0	$9,5x10^3$	$1,1x10^3$	4	10425,0	$2,3x10^4$	$2,3x10^3$	5	18700,0	$4,0x10^4$	$4,0x10^3$
P8/Meso (%)	6	0.18	0.74	0.01	5	0.18	0.39	0.11	6	0.58	1.62	0.04
P5/Meso (%)	6	0.04	0.14	0.01	5	0.12	0.45	0.02	6	0.24	0.75	0.01
P3/Meso (%)	5	0.04	0.08	0.01	4	0.04	0.11	0.01	5	0.05	0.11	0.01

No geral, o nível de contaminação dos leites de ambas as explorações em coliformes fecais é baixo, salvo nalgumas amostras que apresentaram valores extremos elevados, tal como se pode ver nas fig. 3.1 e 3.2. Esta ocorrência pode ser atribuída à falta de limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha e/ou do tanque de refrigeração, como refere Zall (1980).

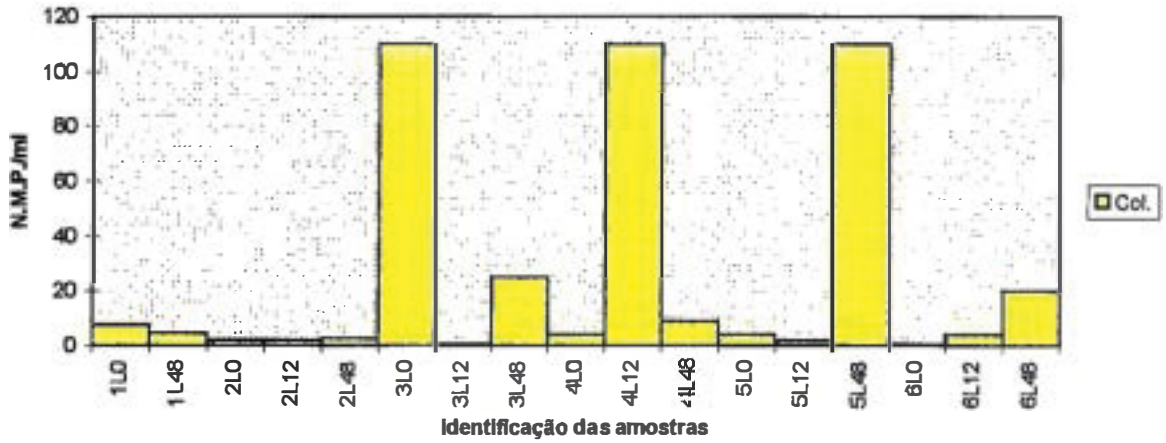


Figura 3.1 - Rebanho Lacaune. Pesquisa de coliformes nas amostras (xLy) ao longo do período de amostragem (x = 1 a 6) e para tempos de refrigeração diferentes (y toma valores de 0, 12 e 48 h).

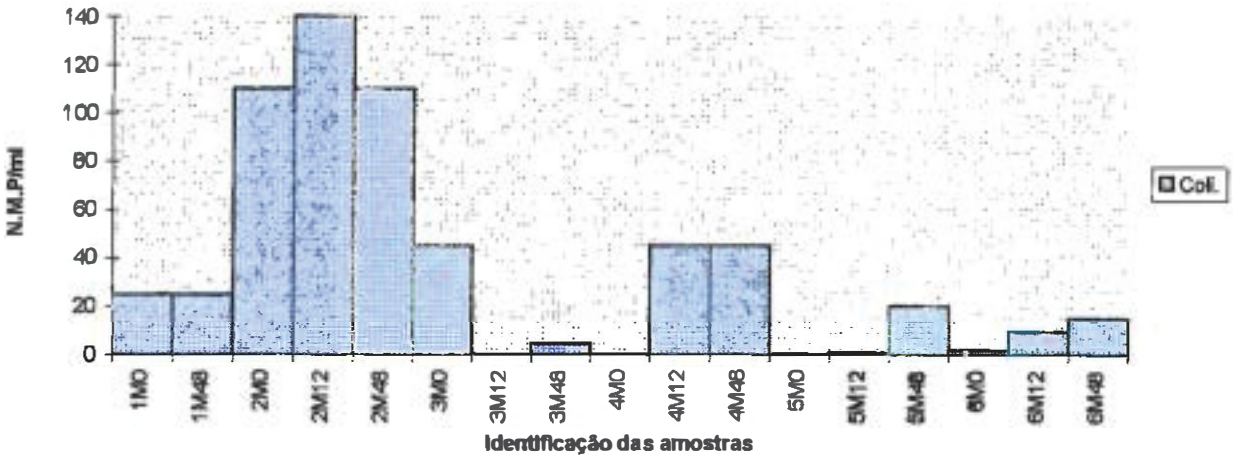


Figura 3.2 - Rebanho Merino. Pesquisa de coliformes nas amostras (xLy) ao longo do período de amostragem (x = 1 a 6) e para tempos de refrigeração diferentes (y toma valores de 0, 12 e 48 h).

O período de refrigeração de 48 horas proporcionou à flora total a 30° C aumentos de 2.7 vezes para o leite da exploração A e 9.4 vezes para o da exploração B. Estes valores são inferiores aos

encontrados por Nuñez et al. (1981) e Pla et al. (1992), que referiram aumentos de 81 vezes e 16.6 vezes, respectivamente, para leite de ovelha durante o intervalo de refrigeração de 24 a 96 h. Os dados revelaram ainda superioridade em relação aos aumentos de 1.5 vezes, referidos por Feuillat et al. (1976), em condições idênticas às citadas pelos mesmos autores (24-96 h).

O número de mesófilos encontrados em 12 h de refrigeração (1 ordenha) a 4° C variou entre 1.8 x10^5 - 3.6 x 10^5 u.f.c/ml e 7.5 x 10^4 - 1.6 x 10^6 u.f.c/ml, em leite do rebanho Lacaune e Merino, respectivamente. À excepção de algumas contagens de mesófilos efectuadas no leite Merino, todas as outras apresentaram valores inferiores aos 8.9 x 10^5 u.f.c/ml obtidos por Ojeda (1973) em leite de ovelha, mas proveniente de 2 ordenhas e à mesma temperatura.

O número de amostras, que desrespeitou os valores admissíveis por lei, foi de 17.6% no rebanho Merino e de 5% no Lacaune. O mesmo não aconteceu nos trabalhos realizados por Gonzalez et al. (1995) que ao, averiguarem sobre a qualidade do leite utilizado no fabrico de queijo Manchego, encontraram somente 29.6% de amostras respeitadoras da legislação.

Os valores das contagens nos dois rebanhos, e após 48 h de conservação do leite, para as temperaturas de 8° e 5° situaram-se entre 10^4 - 10^5 e para 3° C entre 10^3 - 10^4 u.f.c/ml, partindo de níveis iniciais de contaminação de 10^3 - 10^4 u.f.c/ml. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Dousset et al. (1988) em leite de vaca, embora de valor inferior.
No que diz respeito às contagens P5° C, Zall (1980) encontrou valores superiores (10^5 - 10^6 bact./ml), embora tenha partido de uma contagem superior a 10^4 u.f.c./ml, mas também em leite de vaca.

Observou-se que em ambos os rebanhos, as contagens P8 e P5 aumentaram durante o intervalo de 0-48 h; para o grupo P3 verificou-se um aumento até ás 12 h, seguindo-se uma estabilização. Acresce referir-se que a actividade dos psicrotróficos à temperatura de 8° C foi maior do que à temperatura de 3° C. Observou-se ainda que se regista uma maior aproximação da actividade a 5° e a 8° C, revelada pelas contagens respectivas.
Em termos médios, o número de psicrotróficos na exploração B para 8°, 5° e 3° C foi de 272.833, 111.167 e 18.700 u.f.c./ml, respectivamente. Na exploração A para as mesmas temperaturas e pela mesma sequência, os valores obtidos foram de 87.000, 60.283 e 7.318 u.f.c./ml, respectivamente.

A bibliografia refere que a proporção flora psicrotrófica/flora total em leite de vaca é muito variável, podendo ir de 1 a 90% (Feuillat et al., 1976; Pla et al., 1992).

No rebanho Lacaune a avaliação percentual da flora psicrotrófica /flora total, durante 48 h de conservação, para as temperaturas de 8°, 5° e 3° C, foi de 34%, 33% e 4%; no rebanho Merino foi de 58%, 24% e 5%, respectivamente. Qualquer destes valores em ambos os rebanhos são inferiores aos 69.6%, encontrados por encontrados por Pla et al. (1992) em leite acumulado (6 ordenhas) de 3 dias/4° C. Num leite de qualidade satisfatória, o índice Psicrotróficos/mesófilos situa-se normalmente abaixo dos 25%; uma valor igual ou superior a 75% corresponde a leite de qualidade bastante deficiente (Thomas e Thomas, 1975)

A proporção da flora psicrotrófica na flora mesófila tem portanto interesse, porque traduz o nível higiénico de todo o ciclo de produção do leite (Harley et al., 1969).

Em leite recentemente ordenhado (zero horas de refrigeração), os níveis iniciais de contaminação em psicrotróficos são no geral inferiores a 1 x 10^5 u.f.c./ml; níveis considerávelmente baixos se atendermos a que a contaminação microbiana em leite de ovelha é normalmente superior à do leite de vaca. Assím, verifica-se que os resultados obtidos estão de acordo com as referências dos vários authors, para leite de vaca (Luck, 1972; Mikawa, 1973; Thomas e Thomas, 1973 e 1975; Cousin, 1982; Cousins e Bramley, 1990).

.Concluíram estes autores que os baixos níveis (≤ 10%) correspondem à utilização de boas práticas higiénicas na ordenha.

De certo modo, pode-se tirar a mesma ilação para o leite de ovelha, produzido segundo técnicas não tão apuradas como para o leite de vaca. As duas explorações com que se trabalhou podem-se portanto, considerar tecnicamente mais evoluídas no que se refere às práticas higiénicas que utilizam.

3.2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

EXPLORAÇÃO A - Rebanho Lacaune

Os resultados da análise de variância para as características microbianas resume-se no Q.do 3.9 para o rebanho Lacaune.

Quadro 3.9 – Rebanho Lacaune. Fontes de variação [graus de liberdade (G.L.), valores de F, níveis de significância[a], coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de variação (C.V.)] para microorganismos Coliformes (Coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8 , log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação Psicotróficos/Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)].

	COLI.		Log (MESO)		Log (P8)		Log (P5)		Log (P3)		Log (P8/MESO)		Log (P5/MESO)		Log (P3/MESO)	
Fontes Variação	GL.	F.	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F
Período	5	0,48	5	1,65	5	2,33	5	1,04	5	2,03	5	1,59	5	2,67*	5	4,57*
Refrigeração	2	0,05	2	1,76	2	4,52*	2	3,85+	2	1,03	2	0,68	2	1,91	2	0,12
Resíduo	9		9		9		9		8		9		9		8	
C.V. (%)	198,4		6,87		7,55		11,56		8,08		8,48		10,84		5,53	
R^2	0.22		0.58		0.70		0.59		0.64		0.51		0.67		0.75	

* p<0,10 +; p<0,05*; p<0,01 **; p<0,001 ***

Nesta exploração o período em que se efectuou a recolha de amostras não teve influência no resultado das contagens microbianas em cada grupo, à excepção dos log (P5/Meso) ($p< 0.10$) e log (P3/Meso) ($p<0.05$).

A influência do tempo de refrigeração foi pouco significativa para os grupos log P5 ($p<0.10$) e log P8 ($p<0.05$), embora neste último grupo o efeito deste parâmetro seja de maior intensidade. Nas restantes determinações não se verificou qualquer efeito da refrigeração.

Os coeficientes de variação foram em geral reduzidos, à excepção do valor encontrado para os coliformes, que se revelou bastante elevado.

O modelo estatístico utilizado para a maioria das variáveis pode considerar-se razoável, tendo em vista os valores dos coeficientes de determinação. O baixo valor de R^2, no caso dos coliformes, indica que este não foi o mais adequado, porque houve outras fontes de variação que não foram consideradas no modelo nem controladas na investigação.

Os valores das médias dos mínimos quadrados ± o erro padrão, para as fontes de variação consideradas neste estudo, constam do Q.do 3.11.

Em geral, verificou-se que os valores das médias dos mínimos quadrados, ao longo do período de colheita apresentam oscilações de pequena amplitude, à excepção dos coliformes.
Nos coliformes, embora o período não tenha tido sobre estes influência significativa, verifica-se que, nos períodos de colheita das amostras 3, 4 e 5, os níveis foram mais elevados. Tal como já se referiu anteriormente, esta ocorrência poderá ser justificada pela falta de cuidados higiénicos, já mencionados.

Quanto aos Log P8 e Log P3, verifica-se que, os valores das médias dos mínimos quadrados indicam aumento do número de microorganismos, ao longo do período. O mesmo não se poderá concluir para o Log P5, o qual acusou variações pouco significativas e sem sentido marcadamente definido .
Relativamente à refrigeração, os resultados da análise de variância, denotam uma influência pouco significativa no desenvolvimento dos P8 e P5. Assim os respectivos valores das médias dos mínimos quadrados apresentam-se ligeiramente diferentes e aumentam com o tempo de refrigeração de 0 - 48 h. Nos Log P3 verifica-se estabilidade dos resultados, o que está em concordância com as influencias não significativas da refrigeração.
À excepção dos coliformes, em ambas as fontes de variação (período e refrigeração) registou-se um baixo valor de erro padrão na obtenção das médias, para cada índice microbiano; oscilando entre 0.02 - 0.8. Para os Coli o erro variou de 19.90 - 35.6.

Quadro 3.10 – *Rebanho Lacaune.* Média dos mínimos quadrados ± o erro padrão (x ± E.P.) em função do periodo de colheita e tempo de refrigeração para os microorganismos coliformes (coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8 , log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação Psicotróficos / Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)] .

Fonte variação	COLI	Log (MESO)	Log (P8)	Log (P5)	Log (P3)	Log (P8/MESO)	Log (P5/MESO)	Log (P3/MESO)
	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP
Período	4,31 ± 35,6^{a}	10,72 ± 0,6^{b}	9,31 ± 0,6^{d}	9,83 ± 0,8^{a,b}	7,59 ± 0,51^{c}	0,87 ± 0,05^{a,b}	0,92 ± 0,1^{a}	0,70 ± 0,0^{a,b}
	2,33 ± 28,1^{a}	11,90 ± 0,5^{a,b}	9,69 ± 0,4^{c,d}	9,58 ± 0,6^{a,b}	8,21 ± 0,40^{b,c}	0,81 ± 0,04^{a,b}	0,80 ± 0,0^{a,b}	0,69 ± 0,0^{b}
	45,13 ± 28,1^{a}	12,68 ± 0,5^{a}	9,85 ± 0,4^{b,c,d}	8,59 ± 0,6^{b}	8,02 ± 0,51^{b,c}	0,78 ± 0,04^{b}	0,68 ± 0,0^{b}	0,61 ± 0,0^{c}
	41,00 ± 28,1^{a}	11,84 ± 0,5^{a,b}	10,90 ± 0,4^{a,b}	9,36 ± 0,6^{a,b}	9,01 ± 0,40^{a,b}	0,92 ± 0,04^{a}	0,79 ± 0,0^{a,b}	0,76 ± 0,0^{a}
	38,67 ± 28,1^{a}	12,33 ± 0,5^{a}	11,08 ± 0,4^{a}	10,30 ± 0,6^{a}	9,31 ± 0,40^{a}	0,90 ± 0,04^{a}	0,83 ± 0,0^{a}	0,75 ± 0,0^{a}
	8,13 ± 28,1^{a}	12,56 ± 0,5^{a}	10,75 ± 0,4^{a,b,c}	8,78 ± 0,6^{a,b}	8,51 ± 0,40^{a,b,c}	0,86 ± 0,04^{a,b}	0,71 ± 0,0^{b}	0,68 ± 0,0^{b,c}
Refrigeração: 0 h	21,40 ± 19,90^{a}	11,51 ± 0,34^{b}	9,54 ± 0,32^{b}	8,68 ± 0,44^{b}	8,09 ± 0,28^{a}	0,83 ± 0,03^{a}	0,76 ± 0,03^{a}	0,70 ± 0,02^{a}
12 h	19,90 ± 22,70^{a}	12,10 ± 0,40^{a,b}	10,36 ± 0,36^{a,b}	9,18 ± 0,50^{a,b}	8,66 ± 0,37^{a}	0,86 ± 0,04^{a}	0,76 ± 0,04^{a}	0,70 ± 0,02^{a}
48 h	28,50 ± 19,90^{a}	12,40 ± 0,34^{a}	10,88 ± 0,32^{a}	10,35 ± 0,44^{a}	8,56 ± 0,28^{a}	0,88 ± 0,03^{a}	0,84 ± 0,03^{a}	0,69 ± 0,02^{a}

EXPLORAÇÃO B - Rebanho Merino

Os dados da análise de variância referentes a este rebanho encontram-se sumariamente descritos no Q.do 3.11.

Quadro 3.11 – *Rebanho Merino*. Fontes de variação [graus de liberdade (G.L.), valores de F, níveis de significância[a], coeficiente de determinação (R^0), coeficiente de variação (C.V.)] para microorganismos Coliformes (Coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8 , log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação Psicotróficos/Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)].

	COLI N.M.P./ml		Log (MESO)		Log (P8)		Log (P5)		Log (P3)		Log (P8/MESO)		Log (P5/MESO)		Log (P3/MESO)	
Fontes Variação	GL.	F.	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F	GL.	F
Período	5	14,33***	5	1,85	5	3,29*	5	3,48*	5	6,45*	5	2,92*	5	1,59	5	0,60+
Refrigeração	2	0,22	2	0,27	2	11,02**	2	15,63**	2	10,94**	2	4,77*	2	4,15*	2	0,57+
Resíduo	9		9		9		9		6		9		9		6	
C.V. (%)	54,54		8,32		9,32		9,37		5,53		8,47		12,22		11,29	
R^2	0,89		0,60		0,81		0,84		0,91		0,73		0,64		0,42	

[a] p<0,10 +; p<0,05*; p<0,01 **; p<0,001 ***

O período influenciou de forma altamente significativa ($p<0.001$) o resultado da pesquisa de coliformes. Para as restantes determinações, com excepção de Log (Meso) e Log (P5/Meso), o período teve um efeito pouco significativo ($p<0.10$ e $p<0.05$).

Ao analisar o tempo de refrigeração verifica-se que só não influenciou significativamente os coliformes e o Log Meso ($p<0.10$). A importância relativa desta fonte de variação é maior para Log P8, Log P5 e Log P3, com um nível de significância de $p<0.01$. Há ainda a salientar que a refrigeração teve um efeito mais pronunciado, à temperatura de incubação de 5° C, como se pode observar pelo valor de F.

Tal como se observou no rebanho Lacaune, em geral e excluindo os coliformes, os coeficientes de variação apresentaram-se baixos.

Finalmente, reportando-nos aos valores do coeficiente de determinação poderemos dizer que, a escolha do modelo estatístico para análise das diferentes variáveis se ajusta razoavelmente.

No Q.do 3.12, encontram-se as médias dos mínimos quadrados ± erro padrão, respectivamente para cada um dos índices microbiológicos em função do período de colheita e tempo de refrigeração.

Nos Coli, observa-se ao longo do período em que se efectuou a recolha de amostras, uma ampla dispersão das médias dos mínimos quadrados. Para os restantes índices, os valores obtidos apresentam ligeiras diferenças. O valor extremo observado nos Coli, no período 2, deverá ser excluído desta apreciação, porquanto não registou repetibilidade.

Salienta-se que o valor de Log P8 é praticamente idêntico ao respectivo valor de Log Meso. (11.41 versus 11.81), no período 3. Este facto resultou da contagem obtida para a amostra $3L_{48}$ do grupo P8, ter sido, superior em 107%, relativamente à do grupo Meso. Indica claramente, que os mesófilos existentes possuíam, na sua totalidade, carácter psicrotrófico. Pla et al. (1992) também encontraram uma percentagem de psicrotróficos superior a 105% da flora total, em leite de ovelha.

Ao analisar a fonte de variação refrigeração verificou-se que os valores obtidos para os Log P8, Log P5 e Log P3 se apresentaram todos diferentes e simultaneamente registou-se um aumento dos valores médios no decurso das 48 h de refrigeração. Os valores alcançados foram mais elevados nos P8 do que nos P3, e intermédios no P5.

O logaritmo da relação P/Meso foi influenciado ainda que ligeiramente pela refrigeração. Os valores médios denunciam um aumento ao longo da refrigeração e quanto mais baixa é a temperatura de incubação (3° C) menor são os valores encontrados, isto é, menor vai sendo a proporção dos psicrotróficos em relação aos mesófilos.

À semelhança do que aconteceu na exploração A, também para a exploração em causa se registou, e para ambas as fontes de variação, um baixo valor de erro padrão na obtenção das médias, para cada um dos índices em análise, à excepção dos coliformes; oscilando entre 0,03 - 0,75. Para os coliformes o erro foi mais elevado, variou de 7,83 - 14,01.

Quadro 3.12 - *Rebanho Merino*. Média dos mínimos quadrados ± o erro padrão (x ± E.P.) em função do periodo de colheita e tempo de refrigeração para os microorganismos coliformes (coli), logaritmo de Mesófilos [log (Meso)], logaritmo de Psicrotróficos a três temperaturas de incubação (log P8 , log P5 e log P3) e logaritmos dos coeficientes de relação Psicotróficos/ Mesófilos [log (P8/Meso), log (P5/Meso) e log (P3/Meso)] .

Fonte Variação	COLI	Log (MESO)	Log (P8)	Log (P5)	Log (P3)	Log (P8/MESO)	Log (P5/MESO)	Log (P3/MESO)
	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP	X ± EP
Período	26,31 ± 14,01^{a}	11,91 ± 0,75^{b}	10,92 ± 0,71^{a,b}	9,85 ± 0,64^{a,b,c}	9,28 ± 0,36^{a,b}	0,91 ± 0,05^{a,b}	0,82 ± 0,07^{a,b}	0,77 ± 0,06^{a}
	120,00 ± 11,08^{b}	12,04 ± 0,59^{b}	10,22 ± 0,56^{a,b,c}	8,52 ± 0,50^{c}	7,87 ± 0,28^{d}	0,85 ± 0,04^{b,c}	0,71 ± 0,05^{b}	0,69 ± 0,05^{a}
	16,63 ± 11,08^{b}	11,81 ± 0,59^{b}	11,41 ± 0,56^{a}	10,35 ± 0,50^{a}	8,19 ± 0,36^{c,d}	0,96 ± 0,04^{a}	0,87 ± 0,05^{a}	0,72 ± 0,06^{a}
	30,13 ± 11,08^{b}	13,89 ± 0,59^{a}	11,62 ± 0,56^{a}	10,29 ± 0,50^{a}	9,93 ± 0,28^{a}	0,84 ± 0,04^{b,c}	0,75 ± 0,05^{a,b}	0,72 ± 0,05^{a}
	7,07 ± 11,08^{b}	11,86 ± 0,59^{b}	9,14 ± 0,56^{c}	8,13 ± 0,50^{a,b}	8,57 ± 0,53^{b,c,d}	0,77 ± 0,04^{c}	0,68 ± 0,05^{b}	0,75 ± 0,09^{a}
	8,83 ± 11,08^{b}	12,01 ± 0,59^{b}	9,46 ± 0,56^{b,c}	8,89 ± 0,50^{c}	8,81 ± 0,28^{b,c}	0,79 ± 0,04^{b,c}	0,74 ± 0,05^{a,b}	0,74 ± 0,05^{a}
Refrigeração: 0 h	30,45 ± 7,83^{b}	11,68 ± 0,42^{b}	9,12 ± 0,40^{c}	7,95 ± 0,36^{c}	7,94 ± 0,24^{b}	0,78 ± 0,03^{b}	0,68 ± 0,04^{b}	0,69 ± 0,04^{a}
12 h	37,46 ± 8,93^{a}	12,15 ± 0,48^{a,b}	10,51 ± 0,45^{b}	9,30 ± 0,41^{b}	8,95 ± 0,27^{a}	0,86 ± 0,03^{a,b}	0,77 ± 0,04^{a,b}	0,74 ± 0,05^{a}
48 h	36,58 ± 7,83^{a}	12,93 ± 0,42^{a}	11,75 ± 0,40^{a}	10,76 ± 0,36^{a}	9,44 ± 0,23^{a}	0,91 ± 0,03^{a}	0,84 ± 0,04^{a}	0,75 ± 0,04^{a}

RESUMO

• Em ambas as explorações o nível de contaminação dos leites, em coliformes fecais apresentou-se baixo, salvo nalguns casos em que se registaram valores elevados.

• Através dos resultados da pesquisa de coliformes conclui-se que, na exploração B não se registou regularidade nas práticas de carácter higiénico no ciclo de produção do leite. Esta conclusão é baseada especialmente na influência altamente significativa ($p< 0.001$) do período no N.M.P. de coliformes, bem como na pouca influência sobre a generalidade dos restantes índices microbiológicos.

• No caso da exploração A (rebanho Lacaune) como os resultados dos coliformes não sofreram influência do período, bem como para a quase totalidade das determinações microbiológicas, admite-se que existiu regularidade no nível higiénico praticado ao longo do ciclo de produção.

• Verificou-se que nos dois rebanhos, tanto o período como a refrigeração, não tiveram influência significativa nos resultados das contagens de mesófilos; estes níveis, de uma maneira geral, situaram-se dentro dos limites estabelecidos por lei (5×10^5 u.f.c/ml), o que revela eficiência nos métodos usados em cada exploração.

• O período de refrigeração verifica-se que teve uma influência significativa ($p<0.01$) e pouco significativa ($p<0.10$), nas contagens de psicrotróficos a 8° e 5° C, nos rebanhos Merino e Lacaune, respectivamente. Nas contagens de psicrotróficos a 3° C, só se verificou influencia significativa ($p<0.01$), no rebanho Merino.

• A dilatação do tempo de refrigeração (12 para 48 h), em ambos os casos, conduziu a contagens de psicrotróficos mais elevadas às temperaturas de 8° e 5° C. A 3° C praticamente não se registou alteração, isto é, pode dizer-se que se verificou uma tendência à estabilização. Admite-se que as 48 h não foram suficientes para evidenciar a actividade da flora psicrotrófica a 3° C.

• Os valores obtidos, após 48 h de armazenagem no frio, para a flora psicrotrófica às temperaturas de incubação de 8° e 5° C situaram-se entre 10^4 - 10^5 u.f.c/ml e para 3° C entre 10^3

- 10^4 u.f.c/ml, em ambos os casos. Em resumo esta flora, tanto em leite de vaca como no de ovelha, regista baixos níveis, sempre que se utilizarem baixas temperaturas de conservação, excepto se o nível de contaminação inicial for elevado.

• Em ambos os casos, nos leites refrigerados durante 2 dias, observou-se que o desenvolvimento da flora psicrotrófica foi mais elevado à temperatura de 8° C e menor à de 3° C; considera-se que à temperatura de 5° C o desenvolvimento foi intermédio, mas em valor, mais próximo ao de 8° C. Dependendo do nível inicial de contaminação, que nestes casos, se considera ter sido baixo (10^3-10^4 u.f.c./ml), a temperatura tem um efeito inibidor no desenvolvimento dos psicrotróficos: quanto mais próxima de 3° C (menor o ritmo de multiplicação).

• Em relação à flora original do leite, o nível de psicrotróficos foi ≤ 10%, com excepção das contagens obtidas a 8° C que foram ≤ 20%. Estes resultados de uma de uma maneira geral estão em conformidade com os níveis citados em referências bibliográficas; conseguem-se obter baixas contaminações em psicrotróficos desde que se pratique um nível higiénico de qualidade na produção de leite, tanto de vaca como de ovelha.

• A duração da refrigeração não teve influência significativa na relação psicrotróficos/mesófilos, na exploração A. Mas teve alguma influência na exploração B. Verificou-se ainda, que às temperaturas mais baixas (5° e 3° C) a percentagem de psicrotróficos em relação aos mesófilos, foi inferior às percentagens obtidas à temperatura de 8° C..

4 - ANÁLISE INSTRUMENTAL - IEF

Em ambas as explorações, durante os 6 períodos de amostragem e de cada uma das 3 amostras analisadas em cada um dos respectivos períodos, retirou-se uma porção de leite que se preparou para análise IEF, de acordo com as descrições referidas no cap. 5.1.

4.1 - APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

Os densitogramas dos isolados dos diferentes tipos de caseínas (ver 5.2.1.) e da fracção caseínica da amostra $5M_0$ [9] encontram-se representados na figura 3.3.

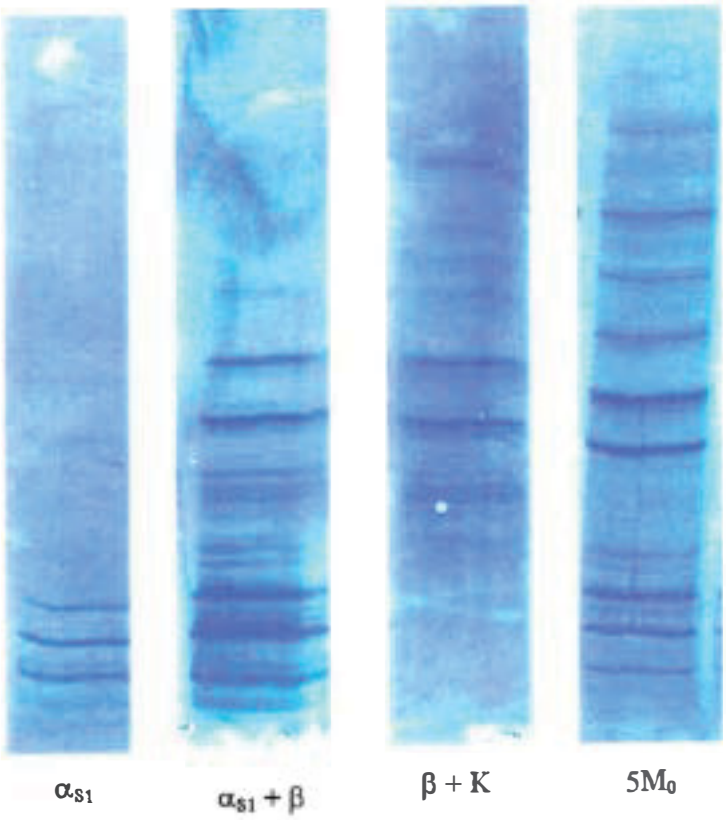
Conforme já foi referido os procedimentos analíticos adoptados na separação dos diferentes tipos de caseína basearam-se nos trabalhos de Wei and Whitney (1985). Por limitações inerentes à metodologia empregue, só se conseguiu obter um fraccionamento puro, o da α_{S1}-CN, como se pode verificar na fig. 3.3 A). A esta ocorrência não lhe foi dado carácter de suma importância, já que o objectivo da separação tinha apenas em vista identificar as bandas correspondentes aos diferentes tipos de caseína nas várias amostras analisadas (ver fig. 3.3 A)).
Para maior precisão na identificação das bandas α_{S1}-CN, α_{S2}-Cn, β-CN e K-CN estableceu-se ainda uma comparação com os padrões de separação em gradientes de pH (Chianese et al., 1993; Addeo et al., 1992).

Analisou-se comparativamente as posições relativas dos picos em cada um dos isolados (fig. 3.3 B) a, b e c) e as respectivas posições na banda $5M_0$ (fig. 3.3 A) e B) d), extrapolando-se depois para as restantes amostras. No quadro 3.13 está patente a correspondência entre o nº de picos e a respectiva área com a designação de cada tipo de caseína.

Quadro 3.13 - Quantificação dos picos do densitograma da fig. 3.1.d e atribuição do tipo de caseína correspondente.

Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8
Área (%)	3.8	7.7	8.3	11.4	14.1	10.2	9.8	8.1
Tipos de Caseína	α_{s1} - CN			β_1 - CN	β_2 - CN	α_{s2} - CN		K - CN

[9] Amostra de leite Merino não refrigerado. correspondente ao 5º período de amostragem.



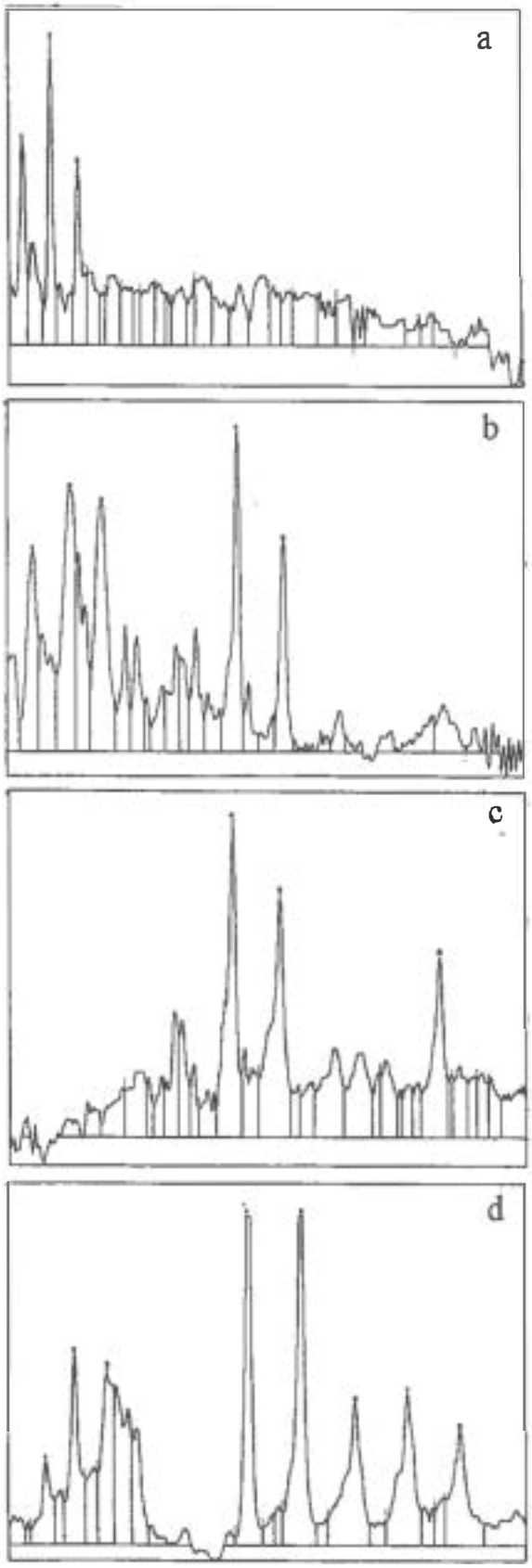


Figura 3.3 - A) IEF de cada um dos tipos de caseína, assinalados pelas letras α_{S1} (α_{S1}-CN), $\alpha_{S1} + \beta$ (α_{S1}-CN + β-CN) e β + K (β-CN + K-CN) e da amostra de leite Merino a partir da qual se realizou fraccionamento ($5M_0$). **B)** Perfil densitométrico de cada uma das diferentes fracções caseínicas [α_{S1}-CN (a), α_{S1}-CN + β-CN (b) e β-CN+ K-CN(c)] e da amostra $5M_0$ (d).

Nas figuras 3.4 e 3.5 apresentam-se os resultados das corridas isoelectroforéticas para a totalidade das amostras do rebanho Lacaune e Merino, respectivamente.

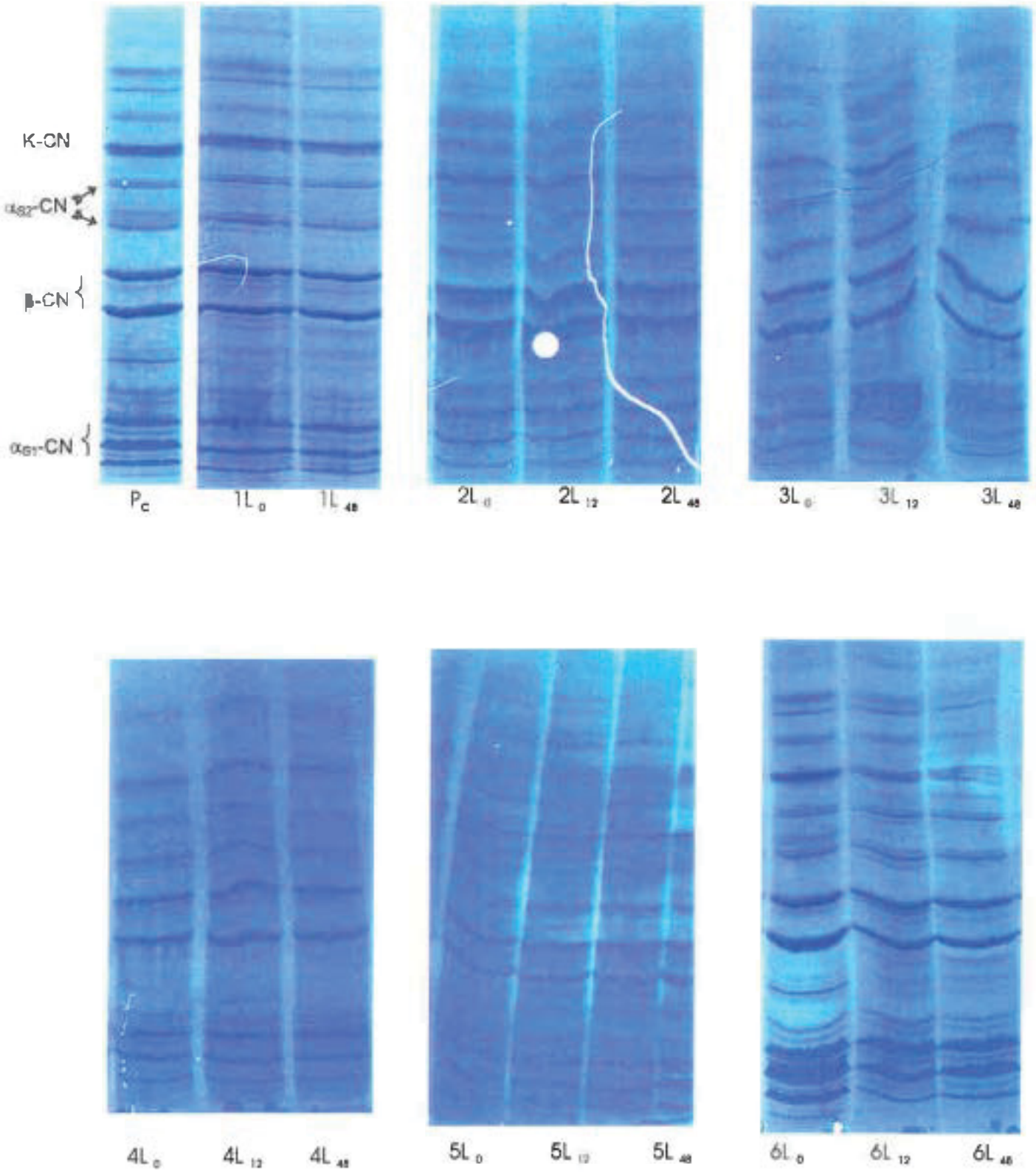


Figura 3.4 - IEF das amostras de leite Lacaune, identificadas por xLy. As amostras foram recolhidas durante 6 períodos (x = 1 a 6) e sujeitas a diferentes tempos de refrigeração (y toma valores de 0, 12 e 48 h). A amostra P_C , padrão comercial de caseína ovina. O gradiente de pH 4.2 - 5.4; a concentração das soluções de caseína para aplicação no gel: 5.0 a 6.0 mg/ml. A posição dos diferentes tipos de caseína estão assinados pelas →.

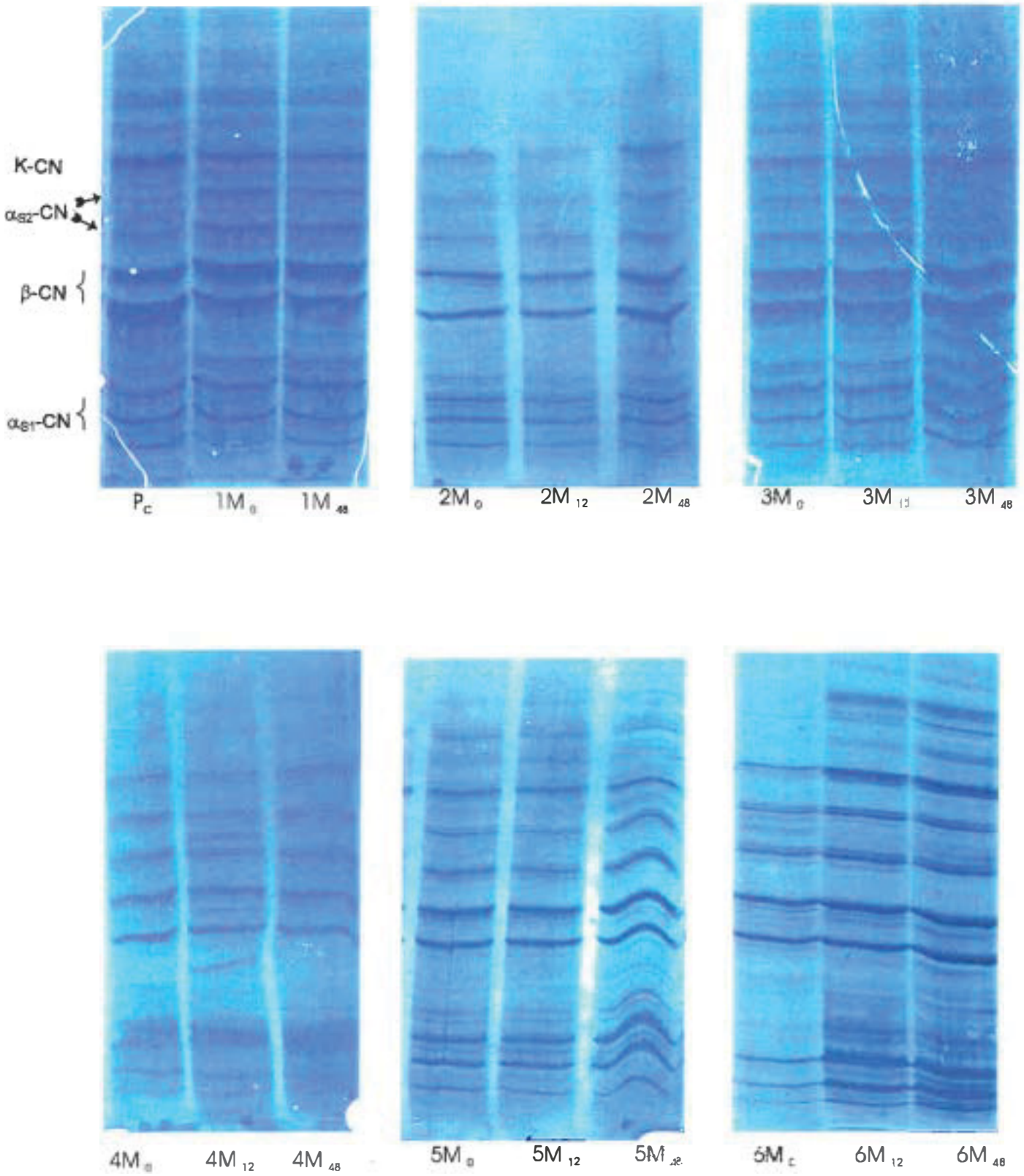


Figura 3.5 - IEF das amostras de leite Merino, identificadas por xMy. As amostras foram recolhidas durante 6 períodos (x = 1 a 6) e sujeitas a diferentes tempos de refrigeração (y toma valores de 0, 12 e 48 h). A amostra Pc , padrão comercial de caseína ovina. O gradiente de pH 4.2 - 5.4; a concentração das soluções de caseína para aplicação no gel: 5.0 a 6.0 mg/ml. A posição dos diferentes tipos de caseína está devidamente assinalada.

Como o objectivo da aplicação de IEF era procurar determinar o grau de proteólise decorrente da acção das bactérias psicrotróficas sobre as fracções caseínicas, procedeu-se à análise semiquantitativa das bandas focadas nos géis de poliacrilamida-ureia e que são referentes apenas às amostras com contagens mais elevadas deste agrupamento de microorganismos. Os resultados obtidos constam do cap. 4.2.

Pela técnica de IEF, tal como se pode verificar nas fig. 3.4 e 3.5, é possível separar os tipos de caseína, em bandas com diferentes localizações na coluna de gel e, posteriormente, quantificá-las por densitometria.

Importa salientar que limitações inerentes aos procedimentos analíticos utilizados, poderão ter repercussões no doseamento dos tipos de caseína.

4.2 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA IEF

Como já foi referido, para o estudo dos possíveis efeitos proteolíticos dos psicrotróficos, efectuou-se em primeiro lugar a escolha dos períodos de amostragem, tendo como único critério de selecção, os valores mais elevados das contagens de psicrotróficos a 8° C, em amostras refrigeradas durante 48 horas.

Em segundo lugar, estabeleceu-se uma comparação entre as áreas correspondentes a cada uma das fracções caseínicas das amostras refrigeradas, durante 12 h e 48 h e as respectivas áreas das fracções caseínicas da amostra padrão (amostra não refrigerada).

EXPLORAÇÃO A - Rebanho Lacaune

As contagens de psicrotróficos à temperatura de 8° C revelaram que o 5° período de amostragem era o que apresentava contaminação mais elevada, seguindo-se-lhe o 6° período, face aos valores obtidos na amostra $5L_{48}$ e $6L_{48}$. Com base nesta informação, que se concretiza em termos numéricos no Q.do 3.14, procedeu-se à leitura densitométrica das bandas correspondentes a estas amostras. Os densitogramas e a identificação dos respectivos picos com as correspondentes áreas encontradas para cada um dos tipos de caseína, estão patentes na fig. 3.6 e 3.7 e Q.do 3.15, respectivamente.

Quadro 3.14 - Contagens de psicrotróficos a 8° C, referentes às amostras quantificadas por densitómetro.

n x 10^3 u.f.c./ml

Níveis de contaminação em Psicrotróficos	Identificação das Amostras					
	$5L_0$	$5L_{12}$	$5L_{48}$	$6L_0$	$6L_{12}$	$6L_{48}$
	31	38	230	38	24	110

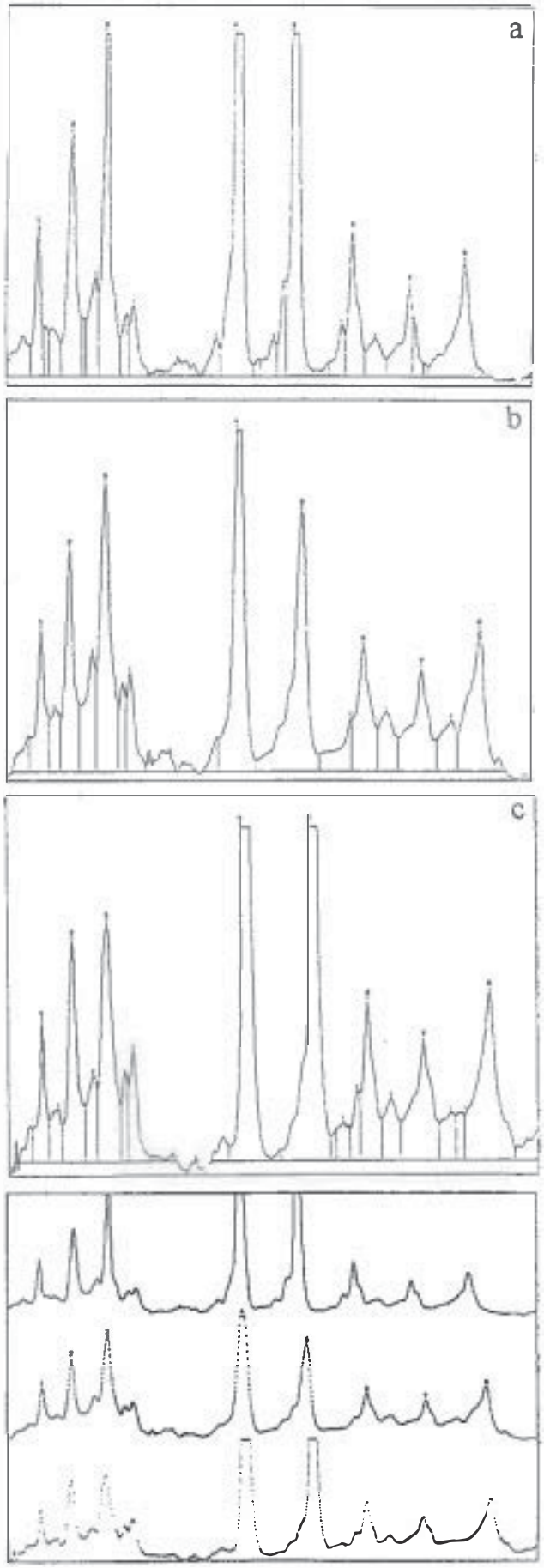


Figura 3.6 - Densitogramas das amostras $5L_o$ (a), $5L_{12}$ (b), $5L_{48}$ (c) e densitograma de comparação (d).

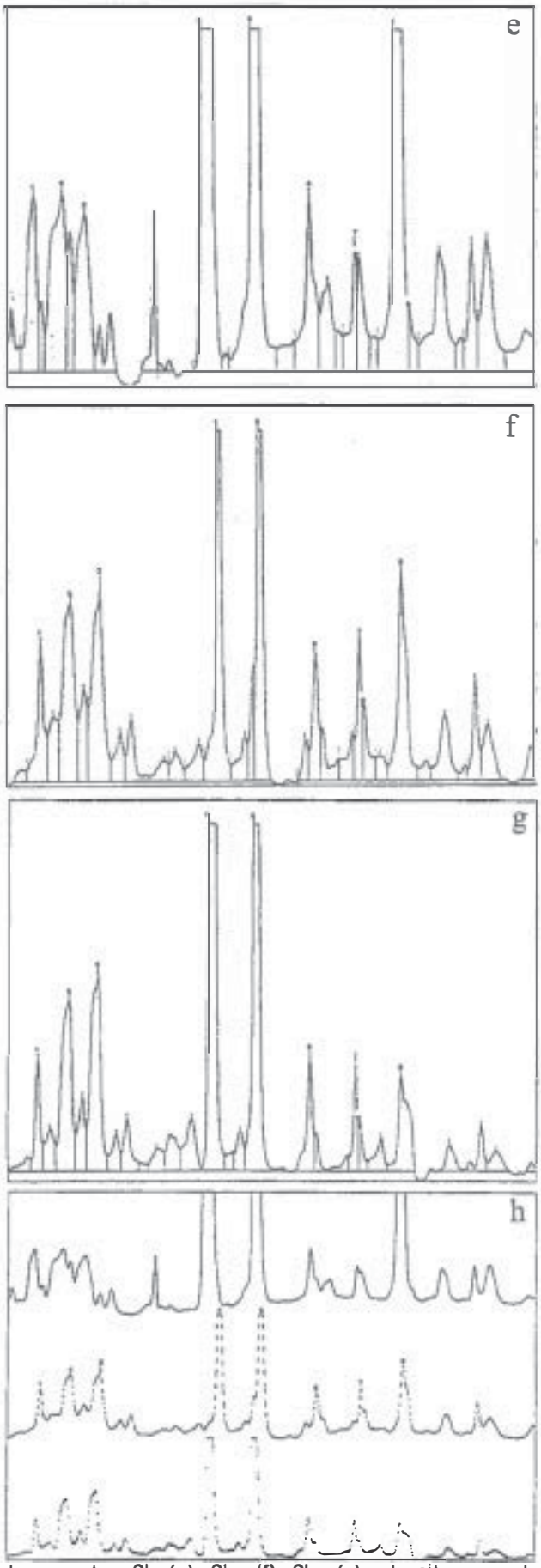


Figura 3.7 - Densitogramas das amostras $6L_0$ (e), $6L_{12}$ (f), $6L_{48}$ (g) e densitograma de comparação (h).

Quadro 3.15 - Proporção relativa dos picos dos densitogramas da fig. 3.4. a, b, c, e, f, g, e correspondência com os diferentes tipos de caseína.

Nº do pico	$5L_0$ área (%)	$5L_{12}$ área (%)	$5L_{48}$ área (%)	$6L_0$ área (%)	$6L_{12}$ área (%)	$6L_{48}$ área (%)	Tipos de caseína
1	3.3	3.9	3.1	4.4	3.4	3.1	
2	7.7	6.1	6.3	7.2	7.4	8.2	α_{S1} - CN
3	10.0	10.0	9.0	7.1	7.7	9.2	
Total	21	20	18	19	19	21	
4	15.4	13.9	13.3	12.5	11.7	14.0	β_1 - CN
5	12.6	12.7	15.7	12.2	10.8	13.4	β_2 - CN
Total	28	27	29	25	23	27	
6	4.7	5.4	5.1	4.7	3.0	3.8	α_{S2} - CN
7	3.6	5.6	6.6	4.4	3.1	3.6	
Total	8	11	12	9	6	7	
8	6.6	7.2	9.9	11.7	7.0	5.0	K -CN

A análise comparativa entre a amostra padrão e as amostras refrigeradas ($5L_{12}$ e $5L_{48}$), relativas ao 5° período de amostragem, indica uma ligeira diminuição do valor global da α_{S1}-CN, passando de 21% para 18.4%, à medida que a refrigeração se prolonga.

Relativamente ao total da fracção β-CN, há apenas a registar uma quebra de 1.6% nos valores obtidos na $5L_0$ versus $5L_{12}$ (28% contra 26.4%). Nas restantes fracções verificam-se valores mais elevados para a $5L_{48}$ do que para a $5L_{12}$ e amostra padrão.

No 6° período de amostragem, verifica-se que os totais das fracções α_{S1}-CN e β-CN nas 3 amostras são ligeiramente diferentes, são mais elevados na $6L_{48}$ (ver Q.do 3.15). No que se refere à α_{S2}-CN e à K-CN, a proporção encontrada é maior na $6L_0$ e decresce à medida que aumenta o período de refrigeração, embora, nesta última fracção o intervalo de variação dos resultados seja superior.

As diferenças densitométricas registadas em ambos os conjuntos de amostras e a observação dos perfis isoelectroforéticos correspondentes (fig. 3.4) levam a admitir que tenham sido originadas por pequenas variações na concentração das amostras, no momento de aplicação no gel. Por outro lado, quando se procedeu à quantificação densitométrica, a escolha do local onde se traça uma linha horizontal imaginária que corresponderá ao sitio de leitura do aparelho, também influência grandemente o traçado do densitograma.

A repetibilidade dos resultados justificava-se para confirmar, se de facto, há semelhança nas proporções de cada uma das fracções caseínicas obtidas, tanto na amostra padrão como nas amostras refrigeradas.

Alguma da bibliografia existente (Gripon, 1983; Guamis et al., 1987) sobre leite de vaca, refere que só para contaminações psicrotróficas superiores a 10^6 - 10^7 u.f.c/ml se tornam evidentes os efeitos proteolíticos sobre algumas das fracções caseínicas, designadamente a β-CN e K-CN. Atendendo a que o mais alto nível de contaminação psicrotrófica no leite Lacaune foi de 2.3 x 10^5 u.f.c/ml e, portanto, de valor inferior ao citado poder-se-á dizer que o tempo de refrigeração a que as amostras estiveram sujeitas, não foi suficiente para proporcionar um desenvolvimento de microorganismos psicrotróficos capaz de produzir efeitos proteóliticos visíveis. Ainda que, na análise semiquantitativa se tenham encontrado algumas diferenças de valores na fracção α_{S1}-CN e K-CN estas diferenças não se podem considerar significativas.

EXPLORAÇÃO B - Rebanho Merino

Nesta exploração, o 3° período de amostragem revelou ser o conjunto de amostras com carga microbiana psicrotrófica mais elevada, como se pode ver no Q.do 3.16, logo seguido do 1° período, com um nível ligeiramente inferior.

Os doseamentos dos tipos de caseína em cada uma das amostras ana0lisadas, apresentam-se no Q.do 3.17 e encontram-se identificados por um número que corresponde ao número do pico no densitograma da respectiva amostra.

Quadro 3.16 - Rebanho Merino. Valores das contagens de psicrotróficos a 8° C referentes às amostras quantificadas por densitómetro.

n x 10^3 u.f.c./ml

Níveis de contaminação em Psicrotróficos	Identificação das Amostras				
	$3M_0$	$3M_{12}$	$3M_{48}$	$1M_0$	$1M_{48}$
	40	29	640	5	600

No 3° período de amostragem verifica-se que tanto o valor global da α_{S1}-CN, como da α_{S2}-CN, se apresentam semelhantes nas três amostras. Nas restantes fracções, designadamente para a β-CN, as proporção obtidas são mais elevadas nas amostras refrigeradas do que na amostra padrão. Enquanto que para a K-CN, se obtiveram percentagens semelhantes para $3M_0$ e $3M_{12}$, mas de valor inferior à obtida para $3M_{48}$.

A semelhança de percentagens para os diferentes tipos de caseína, nas amostras recolhidas no 1° período, leva-nos a admitir que durante as 48 horas de refrigeração não se registaram quaisquer quebras de fracções caseínicas. Embora não se dispondo de perfis de IEF em número idêntico ao dos outros conjuntos de amostras, optou-se por analisar estes, porque o valor da contagem microbiana para $1M_{48}$ era de todos o que se aproximava mais do valor obtido no 3° período de recolha. Contribui-se, deste modo, para aumentar a informação sobre os efeitos da refrigeração.

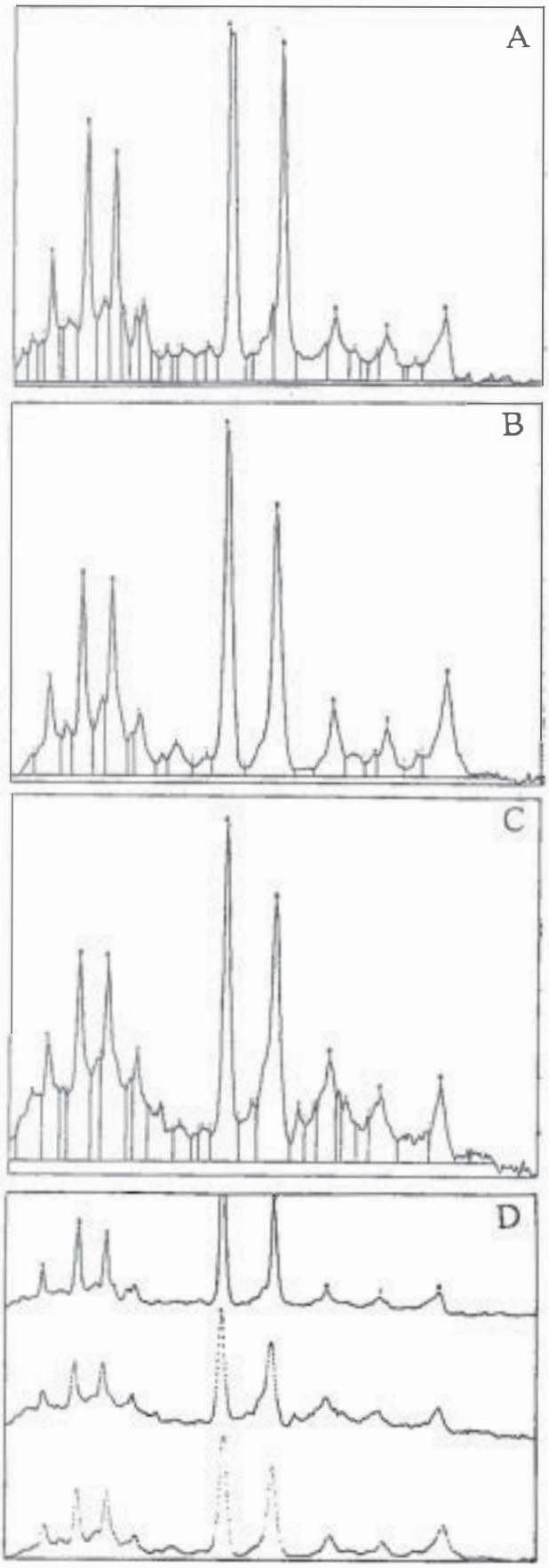
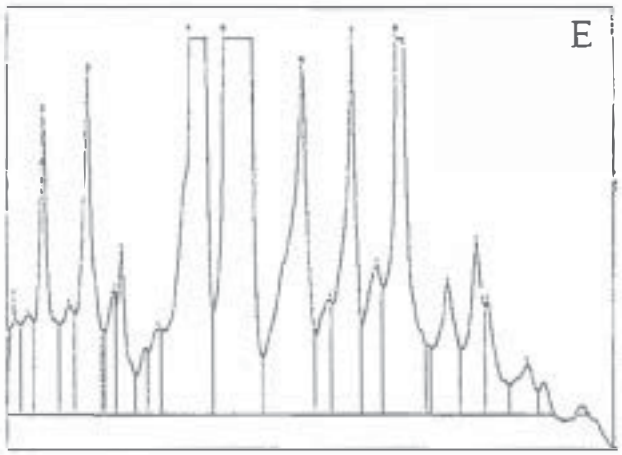
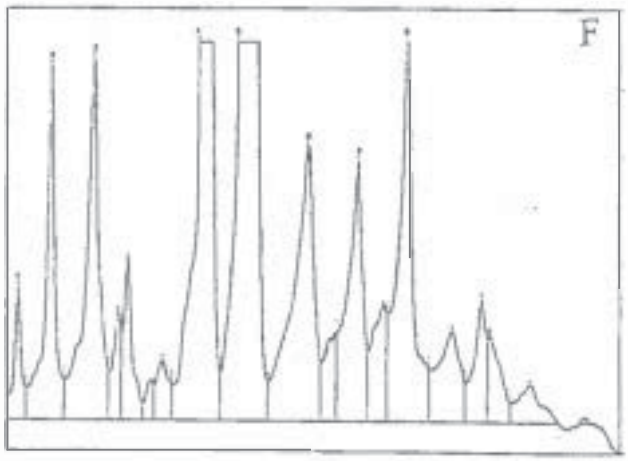


Figura 3.8 - Densitogramas das amostras $3M_0$ (A), $3M_{12}$ (B), $3M_{48}$ (C) e densitograma de comparação (D).





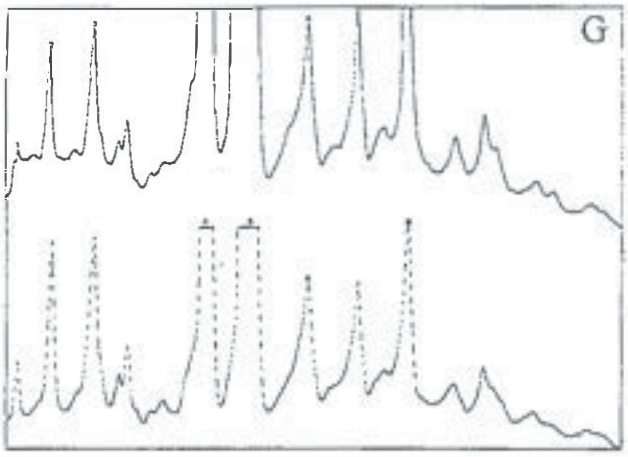


Figura 3.9 - Densitogramas das amostras $1M_0$ (E), $1M_{48}$ (F) e densitograma de comparação (G).

Quadro 3.17 - Proporção relativa dos picos dos densitogramas da fig. 3.4. a, b, c, e, f, g, e correspondência com os diferentes tipos de caseína.

Nº do pico	$3M_0$ área (%)	$3M_{12}$ área (%)	$3M_{48}$ área (%)	$1M_0$ área (%)	$1M_{48}$ área (%)	Tipos caseínas
1	4.0	4.8	5.4	1.4	1.5	
2	7.1	7.9	8.0	4.5	5.2	α_{S1} - CN
3	7.4	8.9	9.0	5.6	7.7	
Total	19	22	22	12	14	
4	12.5	12.2	15.0	11.5	12.1	β_1 - CN
5	11.6	14.5	14.1	13.8	14.6	β_2 - CN
Total	24	27	29	25	27	
6	4.2	4.8	4.5	8.0	8.6	α_{S2} - CN
7	3.5	4.1	3.5	5.6	6.2	
Total	8	10	8	14	15	
8	3.8	3.3	8.1	7.9	8.5	K -CN

Tal como foi referido para o rebanho Lacaune, também neste caso as limitações de ordem técnica estão na origem das diferentes quantificações das fracções caseínicas, obtidas por densitómetro. Esta ilacção é reforçada dirigindo-se uma observação atenta às correspondentes corridas de IEF (fig.3.5) onde é possível comprovar que aparentemente, de uma amostra para outra, não há diferença entre as bandas.

Em ambos os conjuntos de amostras, face aos resultados obtidos é possível concluir que, o nível de contaminação psicrotrófica no leite Merino, durante as 48 horas de refrigeração, ainda que superior ao encontrado no leite Lacaune ($6,4 \times 10^5$), não terá sido suficiente para proteolisar algumas das fracções caseínicas.

Em termos globais da análise instrumental tecem-se algumas considerações:

- Os resultados desta análise não podem ser conclusivos, atendendo ao volume restrito de dados, pelo que se justificaria a repetibilidade, para poder atribuir aos resultados o desejado carácter de generalização. No entanto, algumas pistas podem surgir para a realização de futuros trabalhos nesta área, que se considera do máximo interesse perante a carência de informação nesta matéria.

- Os doseamentos de cada tipo de caseína nas amostras refrigeradas comparativamente aos doseamentos obtidos na amostra padrão apresentaram diferenças percentuais ligeiras, nas amostras de ambas as explorações.

- Em virtude da baixa contaminação em psicrotróficos (inferior a 10^6 u.f.c/ml), não se verificaram, após 48 de refrigeração, efeitos proteolíticos visíveis no leite dos dois rebanho. Isto é, nas amostras de contaminação mais elevada, as bandas correspondentes à amostra padrão e às amostras refrigeradas, não apresentaram diferenças percentuais significativas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações que a seguir se apresentam não têm carácter conclusivo, devido à natureza prospectiva do presente estudo. Dever-se-à também tomar em consideração, que o mesmo está circunscrito apenas a duas explorações com características peculiares, e não generalizáveis quanto às práticas higiénicas ali adoptadas.

A amostragem e o respectivo período de recolha cobrem um período limitado do alavão, condicionado pela especificidade do gado Merino, neste particular. Estes condicionalismos não puderam ser suportados porquanto o período experimental do presente estudo não poderá ser prolongado para o alavão seguinte.
No entanto, ao conseguir pistas sobre este tema, julga-se ter, de certa forma, dado uma útil contribuição informativa.

- Os índices fisicos e químicos dos leites de ambos os rebanhos apresentaram valores característicos de cada uma das raças, Lacaune e Merina, respectivamente.

- O leite produzido nas explorações em estudo apresentou comprovada genuinidade e valor tecnológico bastante para transformação em queijo.

- Ambas as explorações demostraram regularidade nas boas práticas higiénicas, durante o ciclo de produção de leite. Por consequência, obtiveram-se baixos níveis de contaminação psicrotrófica (10^4 -10^5 u.f.c./ml para 5° e 8° C e 10^3 - 10^4 u.f.c./ml para 3° C), após 48 horas de refrigeração.

- O desenvolvimento da flora psicrotrófica é influenciado pela temperatura e tempo de refrigeração. Assim e, após 48 horas de conservação no frio, verificou-se um desenvolvimento dos microorganismos mais elevado à temperatura de 8° C do que à de 3° C, e à temperatura de 5° C o desenvolvimento foi intermédio, mas de valor aproximado ao de 8° C.

• Em ambos os casos, os leites apresentaram baixa contaminação inicial em psicrotróficos (< 10^6 u.f.c/ml). Após 48 horas de conservação do leite no frio, os níveis encontrados apresentaram-se novamente baixos, o que nos leva a admitir que não constituem risco para a qualidade higiénica e tecnológica da matéria prima. Isto desde que as temperaturas de refrigeração não excedam os 3° - 4° C, sendo os 3° C a temperatura mais aconselhável.
A importância da adopção destas temperaturas, deve-se ao facto das mesmas prolongarem a "fase Lag" da biomassa contaminante e ao mesmo tempo, permitirem a dilatação da vida útil do leite. Julgando-se mesmo que a temperatura de 3° C, à semelhança do que está estudado para leite de vaca, inibe a actividade proteásica dos psicrotróficos.

• Em virtude da pequena contaminação inicial dos leites com psicrotróficos, e após 48 horas de refrigeração, não foi possivel observar por IEF efeitos proteolíticos relevantes. De acordo com a bibliografia referida para leite de vaca, admite-se (com as devidas ressalvas de que se trata de um trabalho prospectivo e que requer confirmação) que nas condições de baixos níveis de contaminação psicrotrófica, baixas temperaturas de conservação e refrigeração < 48 h, a concentração enzimática microbiana que se forma não é suficiente para causar efeitos proteolíticos graves.

ANEXOS

Dados das análises físicas e químicas do rebanho Lacaune

Amostras	Acidez	pH	Densidade	Proteína	Gordura
1L1	26	7,01	1,034	6,94	9,54
1L48	26	6,96	1,034	6,4	6,39
2L1	34	6,71	1,04	5,0	5,11
2L12	35	6,62	1,037	5,17	3,86
2L48	35	6,75	1,04	5,89	5,44
3L1	25	6,66	1,036	6,52	7,14
3L12	23	6,78	1,037	6,04	5,74
3L48	24	6,75	1,036	6,41	6,32
4L1	25	6,7	1,04	5,85	6,1
4L12	25	6,7	1,039	5,63	6,05
4L48	25	6,69	1,039	5,79	6,12
5L1	28	6,7	1,038	6,12	5,4
5L12	29	6,68	1,038	5,68	6,8
5L48	28	6,69	1,037	5,83	6,2
6L1	26	6,89	1,037	5,86	5,4
6L12	27	6,29	1,036	5,31	7,3
6L48	25	6,71	1,037	5,74	6,1

Dados das análises físicas e químicas para o rebanho Merino

Amostras	Acidez	pH	densidade	proteína	gordura
1M1	36	6,71	1,035	6,63	12,35
1M48	37	6,59	1,034	6,95	9,34
2M1	28	6,71	1,036	7,55	11,17
2M12	27	6,62	1,037	8,56	10,1
2M48	28	6,64	1,036	7,73	11,22
3M1	19	6,66	1,033	6,05	10,11
3M12	23	6,64	1,032	6,01	10,11
3M48	25	6,69	1,032	6,02	10,12
4M1	31	6,49	1,035	7,6	8,0
4M12	33	6,6	1,035	7,37	8,4
4M48	34	6,59	1,037	7,41	7,4
5M1	28	6,69	1,036	6,2	8,8
5M12	29	6,69	1,034	6,04	9,2
5M48	29	6,7	1,035	6,21	7,8
6M1	28	6,46	1,034	7,31	9,8
6M12	28	6,69	1,036	7,12	8,9
6M48	28	6,6	1,036	7,34	8,7

Dados referentes às análises microbiológicas efectuadas ao leite Lacaune

	Coliformes	Mesófilos	Psicrotróficos		
			8º C	5º C	3º C
1M 0	25	6,6E+04	4,8E+03	3,1E+03	3,7E+04
1M48	25	3,7E+05	6,0E+05	1,2E+05	2,6E+05
2M0	110	1,4E+05	1,1E+04	2,1E+03	1,1E+04
2M12	140	2,2E+05	3,0E+04	4,0E+03	3,9E+04
2M48	110	1,6E+05	6,2E+04	1,5E+04	4,0E+04
3M0	45	5,4E+05	4,0E+04	2,0E+03	2,9E+04
3M12	0,4	7,5E+04	2,9E+04	3,4E+03	2,3E+04
3M48	4,5	6,0E+05	6,4E+05	4,5E+05	1,6E+05
4M0	0,4	1,2E+06	1,8E+05	1,7E+04	9,5E+05
4M12	45	1,6E+06	2,7E+05	3,3E+05	9,3E+05
4M48	45	6,6E+05	2,8E+05	4,6E+04	4,0E+05
5M0	0,3	1,4E+05	1,6E+03	1,6E+03	-
5M12	0,9	1,2E+05	1,3E+04	1,9E+03	-
5M48	20	1,7E+05	3,9E+04	1,3E+04	1,0E+04
6M0	2	3,4E+05	9,4E+04	1,5E+03	1,8E+03
6M12	9,5	1,1E+05	1,4E+04	1,1E+04	1,6E+05
6M48	15	1,2E+05	1,6E+03	2,3E+04	1,3E+04

Dados referentes às análises microbiológicas efectuadas ao leite Merino

	Coliformes	Mesófilos	Psicrotróficos		
			8º C	5º C	3º C
1M 0	7,5	6,2E+04	1,0E+04	2,0E+04	1,5E+03
1M48	4,5	3,0E+04	1,1E+04	2,2E+04	2,1E+04
2M0	2	5,7E+05	2,9E+03	3,4E+03	2,1E+04
2M12	2	1,8E+05	3,6E+04	2,7E+04	4,1E+04
2M48	2,5	1,1E+05	4,0E+04	3,3E+04	5,7E+04
3M0	110	5,2E+05	1,5E+04	2,4E+02	1,1E+04
3M12	0,4	2,0E+05	2,5E+04	7,7E+03	7,3E+03
3M48	25	3,1E+05	1,8E+04	1,8E+03	6,7E+03
4M0	4	7,4E+04	1,4E+04	1,8E+03	3,8E+04
4M12	110	2,1E+05	9,9E+04	1,1E+04	1,3E+05
4M48	9	1,7E+05	1,1E+05	7,9E+03	1,1E+05
5M0	4	1,5E+05	3,1E+04	6,1E+03	7,3E+04
5M12	2	2,5E+05	3,8E+04	2,0E+03	1,4E+05
5M48	110	3,1E+05	2,3E+05	2,1E+05	1,3E+05
6M0	0,4	4,9E+04	3,8E+04	5,0E+03	2,1E+03
6M12	4	3,6E+05	2,4E+05	5,3E+04	5,3E+04
6M48	20	1,3E+06	1,1E+05	1,1E+04	1,1E+04

BIBLIOGRAFIA

ADAMS D. M., BARACH J. T., SPECK M. L. 1975. - Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J.Dairy sci.* 58 (6) 828-834.

ADEO, F., Mauriello, R., MOIO, L., LAEEZA, P., CHIANESE, L., DILUCCIA, A. 1992. Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunochemical and chromatographic techniques. *Milchwissenschaft*, 47, 283-287.

ALAIS, C. 1985. *Ciência de la leche. Principios de técnica lechera.* Versão Espanhola por Dom António Lacasa Gordina. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.

ALAIS C., JOLLES P. 1967. - Isolation, purification and analysis of two K-casein like fractions from sheep casein. *J. Dairy Sci,* 50, 10,1555.

ALI A. E., ANDREWS T. A., CHEESEMAN G. C. 1980. - Influence of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationsship to cheesemaking parameters. *J. Dairy Res,* 47, 371-382.

ALVARENGA, N. 1995. - Caracterização de leite de ovelha. Ponto de congelação. Relatório de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial do Instituto Superior de Agronomia. Lisboa

AMARAL, O. M. R. P. 1996. - Caracterização de queijo de Serpa proveniente de três genótipos ovinos. Tese de Mestrado em Tecnologia Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

AMIOT, J. 1991. *Ciência e Tecnología de la Leche* - Principios y aplicaciones - Valor nutritivo de la leche y productos lacteos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 55-75.

ANDREWS, A. T. 1986. - Electrophoresis Theory, Techniques and biochemical and Clinical Applications. Claredon Press, Oxford, 2ª edição.

ANIFANTAKIS, E. M. 1986. - Comparison of the phsyco-chemical properties of ewes' and cows' milk. *Bulletin Fil - IDF.*, nº 202. Session II, 42-53.

ANIFANTAKIS E. M., VEINOGLOU B., RAMOU C. 1980. - Travaux scientifiques de l'institut Technologique Superieur des Industries Alimentaires. Plovdiv. Bulgaria. Tom XXVII. CB 1. Cit por Anifantakis (1986).

ASCHAFFENBURG R., DREWRY , J. 1957. - Improved method for the preparation of crystalline β-lactoglobulin and α-lactalbumin from cow's milk. Biochem., 65, 273-277.

ASSENAT, L. 1985. - Le lait de brebis. Composition et proprietés. In *Laits et Produits Laitiers*, vol.1, Coord. F. M. Luquet, Tec. & Doc. Lavoisier, Paris.

BALLESTER P., MITTAINE J. 1971. - La fabricación de productos lácteos tipicos a partir de leches de oveja y cabra y su evolución. *Rev. Esp. Lecheria*, nº 80, 59-77.

BALTADJIEVA, M. et al., 1982. - La composition du lait de brebis de la région de Plovdiv en Bulgarie et de Lonina en Gréce. *Le Lait*, 62, 191-201.

BANKS J., GRIFFITHS M. W., PHILLIPS J. D., MUIR D. D. 1988.- A comparison of the effects of storage of raw milk at 2° C and 6° C on the yield and quality of Cheddar Cheese. *Food Microbiology*, 5, 9-16.

BANKS W., DALGLEISH D. G., ROOK.J A. F. 1990. - The milk and your processing. In: *Dairy Microbiology*, Robinson, R. K., Elsevier App. Sci. Vol. I, (2nd. Ed.), Londres.

BAUTISTA, L. et al,, 1986. - Seasonal variation and characterization of Micrococcaceae present im ewe's raw milk. *J. Dairy Res.*, 53, 1-5.

BETTENCOURT, A. J. 1968. - A produção leiteira da ovelha merina na área da intendência de pecuária de Serpa - Aspectos actuais e possibilidades de potencialização. Direcção geral dos Serviços Pecuários. Lisboa.

BETTENCOURT, A. J. 1989. - Cheese production from ewe milk in Portugal. July. Portugal.1-7.

BETTENCOURT, A. J. B. 1989. - Problemática da produção de leite em ovinos (zona Sul). Jornadas Ibéricas de Medicina Veterinária. 29/30 Abril a 1 Maio. Lisboa.

BETTENCOURT, A. J. B. 1986. - Queijo Serpa sua importância na exploração ovina sul alentejana. FILAGRO.

BETTENCOURT A. J. B., GAMA L. T., BETTENCOURT C. M. V. s/data. - La production de lait de brebis au Portugal et les pratiques tradittionnelles de fabrications fromageres fermieres. Serpa.

BETTENCOURT C. M. V., SOBRAL L. F. 1995 - Serpa cheese production in Portugal.

BETTENCOURT, C. M. V., MATOS, C. A. P., BATISTA T., CANADA J., FIALHO J. B. R.. S/data. - Preliminary data on the ewe breed effect on the quality of Portuguese Serpa cheese.

BJÖRCK, L. 1977. - Antibacterial effect of the lactoperóxidase system on psychrotrophic bacterial in milk.Agicultural College of sweden, Uppsala, Sweden.

BLOQUE R., VEILLET-PONCET L. 1980. - Evolution et détermination de la flore bactérienne d'un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. *Le Lait*, Lx, 474-486.

BOISNARD, M., HUE D., BOUNIOL C., MERCIER J. C., GAYE P. 1991 - Multiple mRNA species code for two non-allelic forms of ovine α_{s2}-casein. *Eur. J. Biochem*, 201, 633-641.

BORREGO, J. D. 1990. - Produção ovina - Necessidade de actualizaras suas técnicas. *Vida Rural*, nº 11, 20-22.

BORREGO, J. D. 1985. *Manual da Produção de Ovinos.* I parte. Publicações Ciência e Vida, Lda. Lisboa.

BROCHET, M. 1982. - Thèse. 3ème Cycle. University Claude-Bernard. Lyon. Cit. por Assenat (1985).

C.N.E.R.N.A., (1981). Recommandations pour l'amélioration de la qualité bactériologique du lait au niveau des laiteries. *La Technique Laitière* nº 955, 39-44.

CALHEIROS, F. S. C. 1992. - A ovinicultura em Portugal: Situação e perspectivas de desenvolvimento nos anos 90. *Rev. Soc. Port. Ovi. e Cap.*,3, nº 1, 127-136.

CAMÕES, A. M. H. 1901. - O fabrico do Queijo no Norte-Alemtejo. In: *Os Queijos Tradicionais do Alentejo*, coord. por Oliveira, C., Lisboa. Ed. Prog. Das Artes e Oficios Tradicionais / IFADAP.

CARMONA BELO, C., RIBEIRO J., VAZ PORTUGAL A.. 1991. - Produção de leite de ovelha em Portugal. *Vida Rural*, nº 22, 9-11.

CARREIRA, D. 1980. O valor alimentar do leite. Conferência proferida na FILAGRO. Lisboa.

CARREIRA, D. 1997. - Aspectos do rendimento do leite em queijo. artigo que aguarda publicação.

CHAPMAN H.R., SHARPE E. M., LAW B. A. 1976. - Some effects of low temperature storage of milk on cheese production and Cheddar cheese flavour. *Dairy Industries*, 41, 42.

CHAPMAN H. R., SHARP M. E., LAW B. A. 1976. - Some effects of low-temperature storage of milk on cheese production and cheddar cheese flavour. *Dairy Ind. Inter.*, vol. 41, 2, 42-45.

CHIANESE L., GARRO G., ADDEO F., LÓPEZ-GÁLVEZ G., RAMOS M. 1993. - Discovery of an ovine α_{s2}-casein variant. *J. Dairy Res*, 60, 485-493.

CHIANESE L., GARRO G., MAURIELLO R., LAEZZA P., FERRANTI P., ADDEO F. 1996. - Occurrence of five α_{s1}-casein variants in ovine milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 49-59.

CHIANESE L., MAURIELLO R., MOIO L., INTORCIA N., ADDEO F. 1992. - Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophorensis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research*, 59, 39-47.

COGAN, T. 1977. A review of heat resistent lipases and proteinases and the quality of dairy products. *Iris J. Food Sci. Technology*, 1, 95-105.

CONDUTO, R. 1977. - A Raça Ovina Campaniça. *Ovelha*, ano X - nº 35, Set.

COTTIER, H. 1985. - Production du lait de Brebis. In: *Laits et Produits Laitiers*, F. M. Luquet, Tec. & Doc. Lavoisier, Vol.1, Coord.Paris.

COUSIN M. A., MARTH E. H. 1977. - Changes in milk protein caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft,* 32, 337-341.

COUSIN, M. 1982. - Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and diry products: A R*eview. J.Food Prot.,* 45, 172-207.

CROMIE, S. 1992. - Psychrotrophs and their enzyme resuidues in cheese milk. The *Australian J. Dairy Technology*, 47, 96-100.

DAVIES D. T., WHITE J. C. D. 1960. - The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. *J. Dairy Res.*, 27, 171.

DAVIS, J. 1965. *Cheese,* J&A Churchill, LTD, London.

DIGREGORIO P., RANDO A., PIERAGOSTINI E., MASINA P. 1991. - DNA polimorphism at the casein loci in sheep. *Animal Genetics*, 22, 21-30.

DILANIAN, A. Z. 1969. - Properties of cows' , ewes' and buffaloes' milk in the socialist Republic of Armenia. *Annual Bull. Fil-IDF.* Part VI.

DOUSSET X., DEMAIMAY M., RAVAUD C., LEVESQUE A., PINET X., KERGO Y. 1988. - Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cours de son stockage. *Le lait*, 68 (2), 143-156.

DURR, R. 1974. Le développement des bactéries psychrotrophes dans le lait cru réfrigéré. *Rev. Lait. Frse.*,nº 326, 913.

EIGEL W., BUTLER J., ERNSTROM C., FARREL Jr, H., HARWALKAR V., JENNESS R., WHITNEY R. 1984. - Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *J. Dairy Sci,*, 67, 1599-1631.

FAO, 1972. Monografia 27.

FERRANTI P., MALORNI A., NITTI G., LAEZZA P., PIZZANO R., CHIANESE L., ADDEO F. 1995. - Primary structure of ovine α_{s1}-caseins: localization of phosphorylation sites and characterisation of genetic variants A, C and D. *J. Dairy Res.*, 62, 281-296.

FEUILLAT S., LE GUENNEC S., OLSSON A. 1976. - Contribution à l'étude de la protéolise des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages á pâte molle. *Le Lait*, nº 558, 521-536.

GAYA P., et al., 1987. - Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and in raw ewe's milk. *J. App. Bacteriology*, 62, 321-326.

GONÇALVES FERREIRA F. A. e SILVA GRAÇA M. E., 1961. *Tabela de Composição dos Alimentos Portugueses,* Ministério da Saúde e Assistência. Instituto Superior de Higiene Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

GRIPON, J. 1983. - Caractérisation de la dégradation des protéines du lait par les bactéries psychrotrophes. Utilization des techniques électrophorétiques. *La Technique Laitiére*, n° 974, 31-34.

GUAMIS B., HUERTA T., GARAY E. 1987. - SDS-PAGE study of milk proteolisis by selected psycrotrophs from raw milk. *Milchwissenschaft*, 42, (2), 89-91.

GUILLARD, J. et al., 1993. - Bactéries sporulantes psychrotrophes et traitement technologique des aliments. *Actualités techniques et Industrielles*, Juin, 460-461.

HARTMAN A. M., DRYDEN L. P. 1965. - Vitamins in milk and milk products. *Rev. American Dairy Science Association.* Cit. por Assenat (1985).

HASSOUNA A., NAFTI A., GHRIR R. 1996. - L'affinage d'un fromage à pâtte molle et à croûte fleurie de type Camembert au lait cru de brebis: aspects microbiologiques et physico-chimiques. *Sciences des Aliments*, 16, 187-203.

HOLSTEIN, F. M. S. 1981. - Contributo para o estudo da composição fisica e química do leite de ovelha. Rel. final de est. do Curso de Eng. Agrónomica. Lisboa.

HOLT, C. 1992. - Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* 43, 63-151.

ICHILCZYK-LEONE J., AMRAM Y., SCHNEID N., LENOIR J. 1981. - Le refroidissemnent du lait et son comportement en fromagerie. I. Incidences du refroidissement du lait sur ses caracteres phisico-chimiques et son comportement vis-a-vis de la presure. *Rev. Lait. Frse*, n° 401, 7-14.

JENNESS, R. 1982. - Inter-species comparison of milk proteins. Development in dairy chemistry. Vol. 1. Elevier Applied Publishers, 87-114.

JENNESS, R. 1985. - Biochemical and nutricional aspects of milk and colostrum. Lactation, ed. por Larson. B: L. Publ. Iowa State University Press/ Ames. Cap. 3, 80-128.

JOLLÈS J., FIAT A. M., SCHOENTGEN F., ALLAIS C., JOLLÈS P. 1974. - The amino acid sequence of sheep KA-casein. II. Sequence studies concerning tha KA-caseinoglicopeptide and establishement of the complete primary structure of the protein. *Biochimica et Bioph.Acta* 365, 335-343.

KEHAGIAS, C. H. 1982. The influence of cooling raw sheep's and cow's milk on their phisico-chemical and microbiological characteristics. Egyptian *J. Dairy Sci.*, 10, 35-42.

KROEKER E. M., NG-KWAI-HANG K. F., HAYES J. F., MOXLEY J. E. 1985. - Effects of environmental factors and milk protein polimorphism on composition of casein fraction in bovine milk. *J. Dairy Sci*, 68, 1752-1757.

KWAI-HANG K. F., KROEKER E. M. 1984. - Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine molk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*,67, 3052-3056.

LAGRIFFOUL, G. et al., 1997. - Qualité bactériologique et composition. *Réussir Pâtre*, n° 447, 40-42.

LAW, B. et al., 1976. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in storage milk on the development of rancidity in Cheddar Cheese. *J.Dairy Res.*, 43, 459.

LAW, B. 1979. - Reviews of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrofic bacteria and their effects on milk and products.*J. Dairy Res.*, 46, 573-588.

LENOIR J., VEISSEYRE R., CHOISY C. 1974. - Le lait réfrigéré matière première de la fromagerie moderne. *Rev. Lait. Frse.*, 322, 453.

LENOIR, J. 1985. - Les caséines du lait. *Rev. Lait. Frse*, n° 440, 17-23.

LENOIR, M. 1980. - L'évolution de la qualité du lait et ses conséquences technologiques. *La Technique laitiére*, n° 949, 15-20.

LEONIL J., MOLLÉ D., GAUCHERON F., ARPINO P., GUÉNOT P., MAUBOIS J. 1995. - Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Lait* 75, 193-210.

LÓPEZ-GÁLVEZ G., RAMOS M., JUARÉZ M. 1994. - Review: Genetic polimorphism in ovine milk proteins. *Revista Espanhola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, 34, 609 - 622.

LUQUET, F. M. 1985. *Laits et Produits Laitiers. Vache, Brebis, Chevre*, vol.1, Tec. & Doc. Lavoisier, Paris.

MANFREDINI M., MASSARI M. 1989. Leite de pequenos ruminantes. Aspectos técnológicos: armagenagem e processamento. *Options Méditerranéennes. Seminaires Mediterraneens.* CIHEAM, Serie A, n°6.

MARTINS, A. P. L. 1989. - Leite de ovelha: Produção, utilização e características. Contribuição para o estudo do leite de ovelha da região de Azeitão. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Estação Nacional de Tecnologia dos Produtos Agrários. Núcleo de Tecnologia do Leite e Derivados. Lisboa.

MATALLANA S., BALLESTER P. 1978. - Importance et evolution de la production du lait de brebis dans le bassin mediterranean: perspectives d'avenir dans le cadre des equilibres lait - viande. XX *Int. Dairy Cong.* 9 EC. Paris.

MATI A., GIRARDET J. M., XENAKIS D., LINDEN G. 1991. - Isolement et caractérisation de la fraction hydrophobe des protéose-peptones des laits bovin, ovin et caprin. *Le Lait*, 71, 259 - 273.

MILLIERE J., VEILLET-PONCET L. 1979. - Détermination de la flore bactérienne caséolytique psychrotrophe des laits crus réfrigérés. Le Lait, n° 581-582, 57-79.

MIRANDA G., GRIPON J. 1986. - Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Le Lait*, 66, 1-18.

MOR-MUR M., CARRETERO C., PLA R., GUAMIS B. 1994. Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 11, 177-185.

MOR-MUR M., CARRETERO C., PLA R., GUAMIS B. 1994. - Microbiologicl changes during ripening of Cendrat del Montesec, a goat's milk cheese. *Food Microbiology,* 11, 177-185.

MUIR D. D., KELLY M. E., PHILLIPS J. D. 1978. The effect of storage temperature on bacterial growth and lipolysis in raw milk. *J. Soc. Dairy Technol*, 31, 203.

MUIR D., HORNE D. S., LAW A. J. R, STEELE W. 1993. - Ovine milk. 1. Seasonal changes in composition of milk from a commercial Scottish flock. *Milchwissenchaft* , 48, 363 - 366.

MUR, A. G. 1966. *Técnicas Modernas Aplicadas al Analisis de la Leche*. Editorial Doussat, S.A., 1966. Madrid.

NOBLE, R. C. et al., 1970. - The composition of ewe's milk fat during early lactation. *J.Dairy Res.*, 37, 1970, 297-301.

NORMA PORTUGUESA, NP - 1935, 1986. - Leites e productos lácteos. Pesquisa de bácterias coliformes.

NORMA PORTUGUESA, NP - 1986, 1991 - Leites. Fdeterminação do teor em proteína. Técnica Kjedahl.

NORMA PORTUGUESA, NP - 2307, 1987. - Regras gerais para a contagem de microorganismos psicrotróficos.

NORMA PORTUGUESA, NP - 402, 1966. - Leite. Colheita de amostras.

NORMA PORTUGUESA, NP - 459, 1985. - Leites. Contagem de microorganismos a 30° C. Processo de referência.

NORMA PORTUGUESA, NP - 469, 1983. - Leites. Determinação da matéria gorda. técnica de Gerber. Processo corrente.

NORMA PORTUGUESA, NP - 470, 1983. - Leites. Determinação da acidez.

NORMA PORTUGUESA, NP - 474, 1983. - Leites. Determinação da densidade relativa. Processo corrente.

NUÑEZ J. A., CHAVARRI F. J., NUÑEZ M. 1984. - Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, withj particular reference to Gram negative rods. *J. Applied Bacteriology*, 51, 23-29.

NUÑEZ M., et al. 1989. - Ewe's milk cheese : technology, microbiology and chemistry. *J. Dairy Res.*, 56, 303-321.

NUÑEZ, M., NUÑEZ J. A., MEDINA A. L., ASER C. G., RODRIGUEZ-MARIN M. A. 1981. Contribucion al estudio de la flora psicrotrofa del Queso Manchego. *An. INIA/Ser. Ganadera*, nº 12, 1981.

O'CONNOR P., FOX P. K. 1977. - The proteins and salts of some non-bovine milks. *J. Dairy Res.*, 44, 607 - 609.

ONO, T. et al. 1989. - Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. *J. Dairy Res.*, 56, 61 - 68.

ONUORAH E. C., HICHS C. L., O'LEARY J. 1980. Effect of milk storage on cheddar cheese yield. *J. Dairy Sci.* Ab., 63 sup 1, 63-64.

ORDOÑEZ, V. C. 1971. - Problemas planteados por la explotación y conservación de los rebaños con especial referencia a los pastores. *Rev. Esp. Lecheria*, nº 80, 79 - 106.

PARDO GONZÁLEZ J. E., MARTÍNEZ A. C., SORIAA R. G., SÁNCHEZ R. A., MARTÍNEZ, C. E. S., ANGULO, V. M., LÓPEZ S. A. 1995. - Estudo de la calidad de la leche utilizada en queserias industriales inscritas en la denominaçion de origen Queso Manchego. *Alimentaria*, Out., 19-23.

PELLEEGRINI O., REMEUF, F., RIVEMALE M. 1994.- Évolution des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres de coagulation du lait de brebis collecté dans la region de Roquefort. *Le Lait*, 74, 425 - 442.

PLA R., CARRETERO C., MOR-MUR N., GUAMIS B. 1992. - Refrigeración de leche de oveja en la granja. Influencia de la conservación a baja temperatura sobre los recuentos de flora total y sicrótrofa. *Rev. Esp. Lecheria*. Deciembre, 42 - 44.

PORTARIA Nº 533/93, Diário da Républica Nº 118, I Série-B, 21 de Maio de 1993.

PORTER, J. W. G. 1975. *Milk and Dairy Foods*. Oxford University Press. Great Britain.

PORTUGAL AGRÍCOLA, 1993, INE, Lisboa.

PROJECTO DE NORMA PORTUGUESA. prNP - 3547 - Leite cru de ovelha. Definição e características.

RAMOS M., JUARÉZ M. 1981. - The composition of ewe's and goat's milk. *Bull. Fil-IDF*. Doc nº 140.

REBELO, A. G. 1983. *Queijo : Notas sobre queijos Regionais da Beira*. Colecção Agros.

REBELO, A. 1994. *Queijaria racional*. Ministério da Agricultura, publicações IEADR.

RECIO I., PÉREZ-RODRÍGUEZ M. L., RAMOS M., AMIGO L. 1997. - Capillary electrophoretic analysis of genétic variants of milk proteíns from different species. *J. of Chromatography* A, 768, 47-56.

REIMERDES E. H., HERLITZ E. 1979. The formation of Y-caseins during cooling of raw milk. *J. Dairy Res.*, 46, 219-221.

REMEUF, F. 1994. Relations entre caractéristiques phisico-chimiques et aptitudes fromagères des laits. *Rec. Méd. Vét.*- special, Juin/juillet, 359-364.

RIBEIRO A. M. R., BETTENCOURT A. J. B. 1982. - A comercialização do leite de ovelha e de cabra e derivados (queijos).

RICHARD, J. 1983. - Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Le Lait*, 63, 148-170.

RICHARDSON C. B., MERCIER J. C. 1979. The primary Struture of the ovine β-caseins. *Europeian J. Biochem.*, 99, 285-297.

RICHARDSON B. C., CREAMER L. K. 1976. - *New Zeland J. of Dairy Science and Technology.* 11. 46. Cit. por Ribadeau-Dumas (1978).

RICHARDSON, B. C. et al. 1974. - Comparative micelle structure. II-structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *J. Dairy Res.*, 41, 239 - 247.

RICHARDSON C. B., MERCIER J. C. 1979. - The primary structure of the ovine β-caseins. *Eur. J. Biochem.*, 99, 285 - 297.

RICHTER, R. 1980. - The effect of psychrotrophic bacteria on cheese manufacture. *American Dairy Review*, 44, 48-49.

RIVEMALE, M. 1982. - Communic Inter. Lab. Société des Caves-Roquefort. Cit. por Assenat (1985).

ROBINSON, R. K. 1990. *Dairy Microbiology*, Elsevier App. Sci.; vol. I, (2nd. Ed.). Londres.

RODRIGUES, H. 1944. *O problema queijeiro das Beiras.* Direcção Geral dos Serviços Agrícolas.

ROWE M., GILMOUR A. 1985. - The present and future importance of psychrotrophic bacteria. *Dairy Industries International*, 50 (11), 14-19.

SCHOLZ, W. 1997. *Elaboración de Quesos de Oveja y de Cabra.* Editorial Acribia, S. A.. Zaragoza.

SCOTT, R. 1991. *Fabricación de Queso.* 2ª Edição, Zaragoza, Ed. Acribia, S.A.

SOBRAL, L. F. 1993. - Queijos tradicionais Portugueses - Queijo Serra - Parcela importante do nosso património histórico- cultural. *Vida Rural*, nº 18, 20 - 21.

SOROA, J. M. 1980. - Indústrias lácteas. Litexa. 5ª edição., 21 - 85 e 288 - 367.

STEGER, H. 1960. - Arch. Tierzucht. 3. 6. Cit. Anifantakis (1986).Technique et Documentation. Lavoisier. APRIA.

THOMAS S., THOMAS B. 1973. - Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk collected raw milk.I-II. *Dary Ind.*, 38, 11-15 e 61-70.

TRIEU-CUOT P., GRIPON J. C. 1981. - Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.*, 48, 303-310.

TRIEU-CUOT P., GRIPON J. C. 1982. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.*, 49, 501-510.

TRIEU-CUOT P., GRIPON J. C., 1983. - Etude électrophorétique de la protéolyse au cours de l'affinage des fromages à pâte persillée du type bleu d'Auvergne. *Le lait,* 63, 116-128.

UCEDA R., GUILLEN A. M., GAYA P., MEDINA M., NUÑEZ M. 1994. - Chemical and rheological charactyeristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft,* 49 (9), 494-498.

UCEDA R., GUILLEN A. M., GAYA P., MEDINA M., NUÑEZ M. et al., 1993. - Effect of pseudomonas fluorescens growth in ewe milk on casein breakdow, peptide formation and coagulation characteristics. *Milchwissenschaft*, 48 (11), 619-622.

VALLES E., MOURGUES R., VANDEWEGHE J., THIEBAUD L. 1986. - Une méthode rapide pour évaluer la protéolyse du lait causée par les bactéries psychrotrophes. *Tech. Lait. & Mark,*. nº 1015, 33-43.

VEISSEYRE, R. 1988. *Lactologia Técnica*: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Editorial Acribia, s. a. Zaragoza.

VIEIRA DE SÁ F., BARBOSA M. 1990. *O leite e os seus produtos*. Nova Colecção Técnica Agrária. Clássica Editora. 5ª edição.

VOUTSINAS L. P., DELEGIANNIS C., KATSIARI M. C., PAPPAS C. 1988. - Chemical composition of Boutsiko ewe milk during lactation. *Milchwissenschaft.* 43, 766 - 771.

WEATHERUP W., MICHAEL W., MULLAN A., KORMOS J. 1988. - Effects of storing milk at 3° and 7° C on the quality and yield of Cheddar Cheese. *Dairy Ind. Inter.*, vol. 52, nº 2, 16-25.

WHITNEY, R. M., BRUNNER J. R., EBNER K. E., FARRELL Jr. H. M., JOSEPHSON R. V., MORR C. V., SWAISGOOD H. E.. 1976. - Nomenclature of the proteins of cow's milk . Fouth Revision. *J. of Dairy Sci.*, vol. 59, nº 5, 795 - 810.

WITTER, L. 1961. - Psychrotrophilic bacteria - A review. *J. Dairy Sci.*, 983-1012.

ZALAZAR C., MEINARDI C. A., REINHEIMER J. A., BERNAL S. 1987. - Effecto della conservazione a freddo del latte nella produzione di fromaggi a pasta semidura. *Scienza e Tecnica Lattiero-Caseria*, 38 (5), 415- 431.

ZALL, R. R. 1990. - Control and destruction of microorganisms. In: *Dairy Microbiology*, Robinson, R. K., Elsevier App. Sci.. Vol. I, (2nd. Ed.), Londres.