



## **Avaliação da qualidade do leite de pequenos ruminantes utilizado na produção de queijos com DOP (composição química e células somáticas)**

Helena Isabel Simôa Beato

### **Orientadores**

Professor Doutor António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues

Coorientador

Doutor Christophe Ruis Espírito Santo

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Christophe Ruis Espírito Santo e do Professor Doutor António Moitinho Rodrigues, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Junho 2021**



## Composição do júri

Presidente do júri

Mestre João Pedro Várzea Rodrigues

Vogais

Doutor António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.



## Dedicatória

Ao meu marido e filho.



## Agradecimentos

Ao Professor António Moitinho Rodrigues, agradeço todo o apoio, toda a partilha de informação, preocupação e a inteira disponibilidade que sempre teve para comigo.

Ao Christophe Espírito Santo, obrigado por ter aceite orientar-me, pela paciência e disponibilidade bem como partilha de ensinamentos.

À minha família pelo apoio incondicional, por nunca ter deixado de acreditar em mim, pelo amor e compreensão.

À Catarina Caseiro, uma das peças fundamentais deste trabalho, uma das alavancas principais, obrigada minha querida amiga e colega deste trabalho.

À minha Sister de laboratório, Mafalda, sem ela seria tudo mais difícil. Quero-lhe agradecer de coração, por toda a ajuda tanto a nível profissional como pessoal, foi incansável, uma companheira e amiga de muitas horas, obrigada.

Às minhas queridas Anas (Riscado e Silveira), sem a ajuda delas seria impossível tanta coisa...tanto de ajuda laboratorial como pessoal, apoio incondicional e motivação.

À Inês Brandão, pelo apoio e troca de ensinamentos.

Ao Abel, por todo o auxílio e realização da parte estatística, sem ele seria impossível o término, obrigada de coração.

À Cátia, fonte de inspiração e garra, por querer mais e melhor.

Ao Mário pela paciência, disponibilidade e pelo tanto que me ensinou e explicou.

No fundo agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram relacionadas em mais uma etapa da minha vida, sou grata por fazerem parte dela.

Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade - CERNAS-IPCB, projeto UIDB/00681/2020 da Fundação para a Ciência e Tecnologia



Projeto - Programa de Valorização da Fileira do Queijo da Região Centro; código do projeto - CENTRO 04-3928-FEDER-000014

Cofinanciado por:



## Resumo

O leite é um dos alimentos mais nutritivos e essencial na dieta dos mamíferos. A qualidade deste alimento tem vindo a aumentar, uma vez que os produtores têm que atender às exigências dos consumidores, que se mostram cada vez mais atentos à qualidade e segurança dos alimentos.

A mamite é uma infeção bacteriana da glândula mamária que provoca alterações físicas, químicas e bacteriológicas no leite. A contagem de células somáticas (CCS) é um indicador de infeção intra-mamária (IIM). As células somáticas (CS) são protetoras do corpo do animal e combatem infeções. Uma contagem de CS elevada tem uma influência negativa sobre a qualidade do leite.

O leite de ovelha apresentou teores de proteína, gordura e sólidos totais mais elevados do que o leite de cabra bem como o potencial rendimento queijeiro. Por conseguinte o leite de cabra apresentou valores mais elevados de CS.

O leite destinado ao Queijo Serra da Estrela com DOP apresentou valores mais elevados de proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos e potencial rendimento queijeiro que o leite destinado à produção de queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP, por sua vez, este último apresentou valores mais elevados para a contagem de CS, linfócitos, neutrófilos e macrófagos. O leite destinado ao fabrico de Queijo Serra da Estrela com DOP apresentou valores inferiores para o mesmo tipo de CS, sendo um indicador de maior sanidade do úbere.

Em todos os casos, observou-se um aumento de CS na Primavera, sendo a época onde há maior escassez de leite e uma diminuição da quantidade de alimento.

## Palavras chave

Leite, células somáticas, contagem de células somáticas, infeção intra-mamária, queijo.



## **Abstract**

Milk is one of the most nutritious and essential foods in mammalian diet. Milk quality standards have been increasing over time, as producers must meet the demands of a growing consumer awareness of food safety and quality.

Mastitis is a mammary gland bacterial infection causing physical, chemical and bacteriological changes in milk. Somatic cell count (SCC) is an indicator of intra-mammary infection (IMI). SC are protective for the animal's body and fight infections. A high SC count has a negative influence on milk quality.

Sheep milk had higher protein, fat and total solids than goat milk, as well as potential cheese yield. In turn, goat milk had higher SC values.

Milk used for making Serra da Estrela Cheese PDO showed higher values of protein, fat, total solids, non-fat solids and potential cheese yield than milk used for making Beira Baixa Yellow cheese PDO. The latter showed higher values for SC, lymphocyte, neutrophil and macrophage counts. Milk used for producing Serra da Estrela Cheese PDO had lower values for the same type of SC, indicating a greater udder health status.

In all cases, an increase in SC was observed during spring, coinciding with a more pronounced milk shortage and a decrease in the available amount of food throughout the season.

## **Keywords**

Milk, Somatic cell, Somatic cell count, intra-mammary infection, cheese.



# Índice geral

I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	3
1. Pequenos ruminantes.....	3
1.1. Raças ovinas utilizadas na produção de Queijo com DOP na Região Centro .....	3
1.1.1. Merino da Beira Baixa.....	3
1.1.2. Lacaune.....	4
1.1.3. Assaf.....	4
1.1.4. Bordaleira da Serra da Estrela .....	5
1.2. Raça caprina introduzida utilizada na produção de Queijo com DOP da região Centro.	6
2. Leite .....	6
2.1. A glândula mamária.....	7
2.2. Leite de cabra.....	8
2.3. Leite de ovelha.....	9
2.4. Mamite .....	10
3. Células somáticas .....	10
3.1. Viabilidade celular – contagem de células somáticas.....	11
3.2. Diferenciação celular .....	12
4. Queijo .....	13
4.1 Queijo da Beira Baixa com DOP – Queijo Amarelo .....	14
4.2. Queijo do Rabaçal com DOP .....	16
4.3. Queijo da Serra da Estrela com DOP.....	16
4.4. As células somáticas e o queijo.....	17
III. Material e métodos.....	18
1. Matéria-prima.....	18
2. Procedimentos técnicos .....	19
2.1. Composição nutricional do leite analisado por Milkoscan™ .....	19
2.2. Viabilidade e identificação celular.....	19
2.2.1 Preparação de soluções.....	19
2.2.1.1. Solução tampão salina (PBS).....	20
2.2.1.2. Corante azul tripano a 0,4% .....	20
2.2.1.3. Solução May-Gruenwald (1:2).....	20
2.2.1.4. Solução de Giemsa a 3%.....	20
2.2.2. Preparação da amostra .....	20
2.2.3. Visualização ao microscópio .....	22
2.2.3.1. Viabilidade celular (CCS) .....	22

2.2.3.2. Identificação celular .....	23
2.3. Cálculo do Rendimento queijeiro.....	23
3. Análise estatística.....	23
IV. Apresentação e discussão de resultados .....	24
1. Comparação entre leite de ovelha e cabra .....	24
1.1. Diferenças na composição química.....	24
1.2. Viabilidade celular e células somáticas .....	25
2. Comparação entre leites das diferentes raças de ovelhas.....	26
2.1. Composição nutricional .....	26
2.2. Viabilidade celular e células somáticas .....	27
3. Evolução dos parâmetros do leite de ovelha ao longo de três estações do ano (Outono, Inverno e Primavera). .....	28
3.1. Composição química.....	28
3.2. Viabilidade celular e células somáticas .....	30
4. Correlação entre a composição nutricional, CCS e identificação celular do leite de ovelha	31
V. Considerações finais .....	34
VI. Referências bibliográficas.....	36

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Merino da Beira Baixa (adaptado de Produtos Tradicionais Portugueses, 2001).	3
<b>Figura 2</b> – Ovelha Lacaune (adaptado de A.R.C.O, 2021).	4
<b>Figura 3</b> – Ovelha Assaf (adaptado de ANIDOP, 2021b).	5
<b>Figura 4</b> – Bordaleira da Serra da Estrela(Parque Biológico de Gaia, 2021).	5
<b>Figura 5</b> – Cabra Saanen (adaptado de Capgenes, 2021).	6
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática da estrutura da glândula mamária (adaptado de Schroeder, 1997).	8
<b>Figura 7</b> - A- Neutrófilos; B- Macrófago; C- Linfócito.	13
<b>Figura 8</b> - Área de produção do Queijo Amarelo da Beira Baixa (DGADR, 2021a).	15
<b>Figura 9</b> - Área de produção do Queijo do Rabaçal (DGADR, 2021b).	16
<b>Figura 10</b> -Área de produção do Queijo da Serra da Estrela (DGADR, 2021c).	17
<b>Figura 11</b> -Preparação da amostra.	21
<b>Figura 12</b> -Preparação da amostra para verificação da viabilidade celular.	21
<b>Figura 13</b> -Preparação da amostra para verificação da viabilidade celular.	22
<b>Figura 14</b> -Microscópio ótico (Zess Primo Star).	22



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Composição química do leite de cabra e ovelha, por 100 g (adaptado de: Park <i>et al.</i> 2017). .....	9
<b>Tabela 2</b> - Número de amostras analisadas.....	18
<b>Tabela 3</b> - Preparação da Solução salina PBS.....	20
<b>Tabela 4</b> - Composição nutricional do leite de leite de ovelha (n=127) e de cabra (n=15). .....	24
<b>Tabela 5</b> - Contagem de células somáticas e identificação celular no leite de ovelha (n=108) e cabra (n=12). .....	25
<b>Tabela 6</b> - Diferenças nutricionais do leite de ovelha destinado ao fabrico dos queijos com DOP Serra da Estrela (n=58), Amarelo da Beira Baixa (n=54) e Rabaçal (n=15). .....	26
<b>Tabela 7</b> – CCS e Viabilidade celular do leite destinado ao fabrico dos queijos com DOP da Serra da Estrela (n=50), Amarelo da Beira Baixa (n=46) e Rabaçal (n=12).....	27
<b>Tabela 8</b> - Composição nutricional do leite de raça Bordaleira Serra da Estrela destinado ao fabrico dos queijos Serra da Estrela com DOP, no Outono (n=18), no Inverno (n=26) e na Primavera (n=14). .....	28
<b>Tabela 9</b> - Composição nutricional do leite destinado ao fabrico dos queijos Amarelo da Beira Baixa com DOP no Outono (n=20), no Inverno (n=20) e na Primavera (n=14).....	29
<b>Tabela 10</b> - Composição nutricional do leite destinado ao fabrico dos queijos Rabaçal com DOP, no Outono (n=6), no Inverno (n=5) e na Primavera (n=4). .....	29
<b>Tabela 11</b> - CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Serra da Estrela com DOP, no Outono (n=13), no Inverno (n=26) e na Primavera (n=11). .....	30
<b>Tabela 12</b> - CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Amarelo com DOP da Beira Baixa, no Outono (n=20), no Inverno (n=15) e na Primavera (n=11). .....	30
<b>Tabela 13</b> – CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Rabaçal com DOP, no Outono (n=5), no Inverno (n=4) e na Primavera (n=3). .....	31
<b>Tabela 14</b> - Tabela das correlações.....	31



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

CCS – Contagem de células somáticas

CE – Comunidade Europeia

CS – Células Somáticas

DOP – Denominação de Origem Protegida

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

GM- Glândula mamária

HCl - Ácido clorídrico

IIM – Infecção Intra-mamária

INE – Instituto Nacional de Estatísticas

NMP- Neutrófilos polimorfonucleares

NP – Norma Portuguesa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS- Solução tampão salina

PRQ - Potencial rendimento queijeiro

SARS-CoV-2- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2

ST- Sólidos totais



## I. Introdução

O leite é um dos alimentos naturais mais nutritivos e essenciais, considerado principal fonte de nutrição durante as primeiras fases de vida dos mamíferos, desde a nascença até se tornarem aptos a digerir alimentos sólidos (Park *et al.*, 2017). É um fluido biológico, sintetizado pelas glândulas mamárias tem cor esbranquiçada e é constituído por uma mistura complexa de água, hidratos de carbono, gordura, proteínas, minerais e vitaminas (Schlimme *et al.*, 2000).

Grande parte da nossa alimentação é composta essencialmente por leite e pelos seus derivados. O leite mais consumido a nível mundial é o de vaca. Contudo existem outros tipos de leite, tais como leites de ovelha, de cabra, de búfala e de camela (Brandão e Rodrigues, 2019). Em Portugal, o leite proveniente da ovelha e da cabra é destinado à produção de queijo (Martins *et al.*, 2009).

Na região Centro existem cinco tipos de queijo com Denominação de Origem Protegida (DOP), os 3 queijos da Beira Baixa com DOP (tipos Castelo Branco, Amarelo da Beira Baixa e Picante da Beira Baixa), o Queijo Serra da Estrela com DOP e o Queijo Rabaçal com DOP.

Dos três queijos da Beira Baixa com DOP, para este trabalho foi analisado apenas o leite destinado ao fabrico de Queijo Amarelo da Beira Baixa. É um queijo produzido a partir do leite cru de ovelha ou de mistura (ovelha e cabra) e é utilizado coagulante de origem animal. A pasta é semidura ou semimole e apresenta uma casca amarelada. É um queijo curado por um período de 40 dias. Quando este tempo é superior a 90 dias o queijo é designado por “queijo velho” (DGADR, 2021a).

Também foi avaliado o leite destinado ao fabrico do queijo Rabaçal com DOP. É um queijo curado, produzido a partir de mistura de leite de ovelha e cabra. O agente coagulante é de origem animal. A pasta é semidura a dura, de cor branco mate, com poucos ou nenhuns olhos e estes, quando existem, são pequenos e irregulares. O tempo de cura não pode ser inferior a 20 dias (DGADR, 2021b).

Também foi avaliado o leite destinado ao fabrico do queijo Serra da Estrela com DOP. É obtido a partir de leite cru de ovelha da raça Bordaleira da Serra da Estrela ou Churra Mondegueira. É um queijo curado, pode apresentar pasta semimole ou ser amanteigado de cor branca-amarelada ou pasta extra dura de cor laranja acastanhada, denominado de queijo velho. Utilizam infusão de flor de cardo moído como agente coagulante. O tempo mínimo de cura é de 30 dias (DGADR, 2021c).

Para obtermos queijos com uma boa aceitação no mercado necessitamos de leite com elevados padrões de qualidade. Assim, a contagem de células somáticas (CCS) é um dos parâmetros mais importantes que atesta a higiene do úbere e qualidade do leite. As células somáticas são constituídas por células de descamação do epitélio mamário, células secretoras de leite (que no final de vida são eliminadas), e células do sistema imunitário do organismo do animal tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os macrófagos e os neutrófilos são células fagocitárias, sendo que a sua ação é eliminar microrganismos e excedentes celulares (Ma *et al.*, 2000).

Uma contagem elevada de células somáticas (CCS) indica ocorrência de mamite. Uma doença infectocontagiosa provocada por microrganismos patogénicos (bactérias) que invadem o úbere sendo caracterizada por uma inflamação da glândula mamária (GM). Provoca a diminuição da produção de leite e alterações químicas no leite (Schroeder, 1997). O leite produzido por uma glândula mamária de uma ovelha saudável contém entre 10 a  $200 \times 10^3$  CCS/mL, sendo o tipo celular maioritariamente macrófagos. No leite de cabra, a concentração pode ascender a 270 -  $2000 \times 10^3$  CCS/mL, sendo a maioria neutrófilos (Paape *et al.*, 2001).

Os produtores de leite de pequenos ruminantes devem estar conscientes que são os principais prejudicados quando o leite dos seus efetivos tem uma elevada contagem de células somáticas. Como tal, necessitam de aplicar medidas de prevenção de mamites, ou seja, devem aplicar criteriosamente regras de higiene na ordenha e nas instalações dos animais, inspecionar as máquinas da ordenha e realizar testes laboratoriais periodicamente para controlar o número de células somáticas. Uma contagem baixa de células somáticas indica uma prevalência baixa de mamites, o que irá resultar no aumento da produção e da qualidade do leite, traduzindo-se num bom rendimento na produção de queijos, assim como de outros produtos de valor acrescentado.

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do leite de pequenos ruminantes, ovelha e cabra, bem como identificar o impacto do efeito sazonal sobre a qualidade do mesmo. Por conseguinte, foi avaliado o estado clínico da glândula mamária pela contagem diferencial de células somáticas ao longo de vários meses (outubro 2019 a junho 2020). Foi simultaneamente determinada a qualidade físico-química do leite (proteína, gordura, lactose, sólidos não gordos e sólidos totais). O leite foi recolhido na região Centro destinando-se ao fabrico de Queijos com DOP (Queijo do Rabaçal, Queijo Serra da Estrela e Queijo Amarelo da Beira Baixa).

## II. Revisão bibliográfica

### 1. Pequenos ruminantes

Ruminantes são mamíferos herbívoros que têm como principal característica ruminar, ou seja, depois de ingerirem os alimentos, estes são regurgitados para a boca, onde são novamente mastigados, ensalivados e deglutidos. Para que tal aconteça têm de ter um sistema digestivo adaptado, dividido em quatro cavidades diferentes rúmen, retículo, omaso e abomaso (Peter J. Van Soest, 1987).

#### 1.1. Raças ovinas utilizadas na produção de Queijo com DOP na Região Centro

##### 1.1.1. Merino da Beira Baixa

Esta designação é relativamente recente e traduz uma evolução dos ovinos desde o ano de 1870. Em Portugal existem três raças de merino, o Merino Branco, Merino Preto e o Merino da Beira Baixa (ANIDOP, 2021a).

Em regra, a ovelha da raça Merino da Beira Baixa (Figura 1) é explorada em regime extensivo, tem um parto por ano, o qual se verifica no fim do verão ou no princípio do outono. Estes partos correspondem a uma cobrição de primavera, de abril a junho. O primeiro parto verifica-se geralmente entre os 17 e os 23 meses de idade. Esta raça apresenta cor branca, pequena corpulência, sendo que o seu peso em adulto varia entre 28 a 30 kg. A produção de leite média diária é em cerca de 0,3 a 0,4 litros (ANIDOP, 2021a).



Figura 1 - Merino da Beira Baixa (adaptado de Produtos Tradicionais Portugueses, 2001).

### 1.1.2. Lacaune

A raça Lacaune (Figura 2) é de origem francesa e o seu nome deve-se aos montes Lacaune (Barillet *et al.*, 2001).

Os ovinos desta raça adaptam-se ao regime extensivo, no entanto, a sua produção é mais vocacionada para o sistema semi-intensivo ou mesmo intensivo, em regime de estabulação permanente. Estes animais apresentam pelagem clara e pouca lã. Passou a ser uma das raças mais utilizadas em Portugal devido à sua capacidade de produção de leite, contudo também existem linhagens para carne (CEAP, 2021). As ovelhas são geralmente ordenhadas durante seis a oito meses, tendo uma produção média diária de leite de aproximadamente 1 a 3 litros (Barillet *et al.*, 2001).



Figura 2 - Ovelha Lacaune (adaptado de A.R.C.O, 2021).

### 1.1.3. Assaf

As ovelhas de raça Assaf (Figura 3) são originárias de Israel e resultam do cruzamento entre a raça israelita Awassi e a raça alemã Frísia do Leste (Milkshaft), por isso é considerada uma raça exótica de ovinos de leite (Rummel *et al.*, 2005).

Em Portugal, esta raça de ovelhas é utilizada em sistema intensivo, semi-intensivo e em sistema de produção biológico, sendo que o sistema mais comum é o semi-intensivo (Freitas, 2017).

São caracterizadas pela presença de cauda gorda, velo de lã grosseira e cor branca. A cabeça e os membros são brancos ou castanho e, menos frequentemente, pretos (Rummel *et al.*, 2005).

Estes animais estão essencialmente destinados à produção de leite, produzindo em média cerca de 2,7 litros por dia (Gootwine e Pollott, 2000).



**Figura 3** - Ovelha Assaf (adaptado de ANIDOP, 2021b).

#### **1.1.4. Bordaleira da Serra da Estrela**

A Bordaleira da Serra da Estrela (Figura 4) é uma raça autóctone com uma excelente aptidão leiteira. Este leite tem como principal finalidade a produção de Queijo Serra da Estrela (DOP). Também é explorada na vertente produção de carne (ANIDOP, 2021c).

Esta raça apresenta estatura mediana, com um esqueleto bem desenvolvido, regularmente musculado, de cor branca ou preta. O peso de uma fêmea adulta varia entre 50 e 55 kg e o peso de um macho adulto varia entre 80 a 100 kg (ANCOSE, 2021).

Estes animais atingem produções superiores a 500 litros de leite por lactação, ou seja, cerca de 2,3 litros de leite por dia (ANIDOP, 2021c).



**Figura 4** - Bordaleira da Serra da Estrela (Parque Biológico de Gaia, 2021).

## 1.2. Raça caprina introduzida utilizada na produção de Queijo com DOP da região Centro

A raça de cabras Saanen (Figura 5) tem como origem o vale do Saanen na Suíça, apresentando uma maior distribuição pelo mundo comparativamente com qualquer outra raça caprina (Belanger, 1990).

As Saanen são animais de grande porte (Fernando Vieira de Sá, 1990), que se caracterizam fisicamente por apresentarem uma pelagem uniformemente branca ou creme clara, de pêlo curto e fino, podendo ser um pouco mais comprido na linha dorso-lombar e nas partes baixas do corpo (no caso dos machos). Os machos podem pesar entre 70 a 90 kg e as fêmeas entre 45 a 60 kg.

O período de lactação destas cabras dura de oito a doze meses, logo é considerada uma cabra com uma boa produção leiteira, pois pode produzir diariamente, em média, 2,9 litros (Ferrouillet e Bélanger, 2003). Pode produzir até 5 litros num sistema de produção intensivo (Boichard *et al.*, 1989).



Figura 5 - Cabra Saanen (adaptado de Capgenes, 2021).

## 2. Leite

De acordo com o Regulamento (CE) N.º. 853/2004 de 29 de abril, alterado pelo Regulamento (CE) N.º. 1662/2006 de 18 de novembro, o leite cru é definido como o *“leite produzido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C, nem submetido a um tratamento de efeito equivalente”*.

Conforme referido na Norma Portuguesa NP- 572 de 1981, o leite é definido por: *“um líquido segregado pelas glândulas mamárias da vaca em estado de saúde normal. Leite para fins alimentares é a secreção láctea obtida de uma ou mais ordenhas completas e ininterruptas, de uma ou mais fêmeas sadias, não fatigadas, mantidas em boas condições alimentares e de higiene, livre de substâncias estranhas, obtido com asseio e isento de colostro”*.

Segundo o Comité para Português para a UNICEF o leite materno é o alimento ideal e essencial para os recém-nascidos e crianças, dado que fornece todos os nutrientes para um desenvolvimento saudável. Para além de conter anticorpos que ajudam a

proteger doenças infantis comuns, é rico em proteínas e vitaminas lipossolúveis, que beneficiam o crescimento e desenvolvimento de células normais.

A designação genérica de leite é aplicada exclusivamente ao leite de vaca, sendo que o leite proveniente de outras espécies é designado pelo nome da fêmea produtora, como por exemplo leite de cabra, leite de ovelha,... (Luquet, 1985).

Os componentes característicos do leite podem variar em função da espécie, da raça, do estágio de lactação e do período de ordenha (Park *et al.*, 2017). O leite é um alimento complexo de elevada densidade, rico em água, lactose, lípidos (triglicéridos e ácidos gordos saturados e monoinsaturados), proteínas (caseínas e proteínas do soro), sais minerais (cálcio, magnésio, iodo e potássio) e vitaminas (riboflavina, B12, B5, A, D) (Brandão e Rodrigues, 2019).

Em Portugal, em 2019, a produção de leite de vaca correspondeu a 95,24 % (1.913.545 toneladas de leite) do total de leite produzido, 3,48 % leite de ovelha (70.000 toneladas de leite) e 1,28 % leite de cabra (25.728 toneladas de leite) (INE, 2021). A nível mundial, o leite de vaca é o mais produzido (83%), seguindo-se os leites de búfala (14%), de cabra (2%), da ovelha (1%) e de camela (0,3%) (FAOSTAT, 2021). A produção e o consumo de leite continuam a aumentar devido à crescente procura de leite e de produtos lácteos (Brandão e Rodrigues, 2019).

## 2.1. A glândula mamária

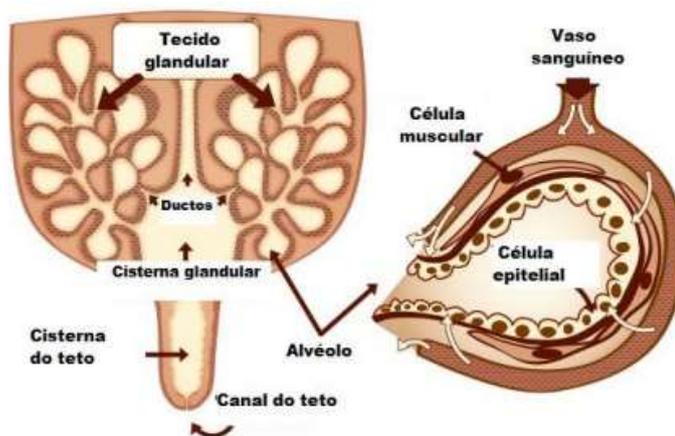
As glândulas mamárias (GM) são especializadas na produção de leite e estão presentes em todos os mamíferos, no entanto, a produção de leite ocorre apenas nas fêmeas.

Histologicamente, a GM (Figura 6) é uma glândula exócrina, destinado à secreção de leite. É composta por lóbulos constituídos por tecido glandular, os alvéolos (o diâmetro de cada alvéolo é de cerca de 50-250  $\mu\text{m}$ ), ductos coletores, cisterna da glândula e canal do teto. O tecido glandular ou porção secretora contém bolsas microscópicas chamadas alvéolos. Cada alvéolo é constituído por células epiteliais produtoras de leite que estão rodeados por células musculares que, ao contraírem, permitem que o leite saia dos alvéolos durante a ordenha (Schroeder, 1997).

Nos pequenos ruminantes a GM é composta por duas glândulas independentes, situadas na região inguinal, suportadas por um ligamento suspensor mediano comum e por um ligamento lateral associado a cada glândula (Schroeder, 1997).

As GM das cabras apresentam dimensões maiores e mais largas que a das ovelhas. Nos caprinos os tetos são cónicos e largos, podendo atingir, em plena lactação 7 a 8 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Nos ovinos, os tetos apresentam uma forma cilíndrica e podem atingir 2 a 3 cm de comprimento (Cedeño *et al.*, 2012).

O úbere nas ovelhas pode estar coberto de lã e nas cabras pode estar coberto de pelos finos (Dyce *et al.*, 2013)



**Figura 6** - Representação esquemática da estrutura da glândula mamária (adaptado de Schroeder, 1997).

## 2.2. Leite de cabra

O leite de cabra é um líquido branco-mate, limpo, sem grumos, de odor bastante neutro, sabor adocicado a ligeiramente salgado, agradável e característico. A cor um tanto mais branca deve-se ao facto de conter pró-vitamina e não conter  $\beta$ -carotenos pois estes são responsáveis pela tonalidade amarelada da gordura do leite de vaca. O sabor característico depende do tipo de alimentação que recebem. O leite não possui nenhum cheiro típico ou desagradável, mas se o apresentar, é devido às más condições de higiene (Belanger, 1990).

O leite de cabra é de relevante interesse para a população que apresenta intolerância à lactose e/ou alergia às proteínas do leite de vaca (Park *et al.*, 2017). Este leite possui uma maior digestibilidade face ao de vaca pois apresenta uma maior alcalinidade. A composição deste leite varia em função da espécie, raça, indivíduo, idade do animal, fase de lactação, alimentação, condições de ordenha, estação do ano, clima, entre outros fatores (Campbell e Marshall, 1975).

O leite de cabra é reconhecido pelas suas propriedades físico-químicas particulares, apresentando uma composição muito semelhante ao do leite vaca, porém com qualidade nutricional diferenciada. É um alimento com alto valor nutritivo e contém os elementos necessários à nutrição humana, como lactose, proteínas, gorduras, vitaminas, ferro, cálcio, fósforo e outros minerais. Contém, em média, cerca de 12,2% de sólidos totais, constituindo 3,8% de gordura, 3,5% de proteína e 4,1% de lactose e 0,8% de minerais (Tabela 1). Este leite apresenta mais gordura e proteína e menos lactose do que o leite de vaca (Park *et al.*, 2017). O leite de cabra também apresenta elevadas quantidades de ácidos gordos de cadeia curta (Alonso *et al.*, 1999), sendo estes ácidos gordos são os responsáveis pelo sabor do queijo de cabra (Park *et al.*, 2017).

Recentemente, tem havido uma crescente procura de produtos derivados de leite de cabra, pois apresentam um nível nutricional muito próximo do leite materno e são de fácil digestão. Entre os produtos mais procurados temos os iogurtes (Dinheiro vivo, 2021).

### 2.3. Leite de ovelha

A data exata da primeira utilização da ovelha na produção de leite, não se conhece, mas sabe-se que acompanhou o desenvolvimento da civilização mediterrânica (Luquet, 1985). Os ovinos são animais de reprodução sazonal. Assim, pode ocorrer alterações notórias na composição do leite de ovelha ao longo do ano (Park *et al.*, 2017).

O leite de ovelha possui coloração branca, é muito viscoso (característica pela qual a ascensão da gordura é muito lenta), cheiro e sabor pouco agradáveis. A fermentação láctica ocorre com dificuldade e a ação do coalho é pouco sensível (Pineda, 1980).

O leite de ovelha é quase exclusivamente reservado ao fabrico de queijo, devido ao seu teor em albumina, de qualidade superior face ao leite de cabra e de vaca (Pineda, 1980).

O leite de ovinos apresenta algumas diferenças na sua constituição em relação ao leite de outras espécies. Apresenta aproximadamente 5,7% de proteína, 7,1 % de gordura, 12,0% de sólidos não gordos e 4,6% de lactose (Park *et al.*, 2017). A gordura é o componente do leite que mais alterações sofre com a manipulação da dieta alimentar dos animais (Jenkins e McGuire, 2006), podendo o teor em gordura variar entre 3,60 a 9,97 g/100g (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

**Tabela 1** - Composição química do leite de cabra e ovelha, por 100 g (adaptado de: Park *et al.* 2017).

Componentes	Leite de Cabra	Leite de ovelha
Água (%)	87,5	82,0
Energia (cal)	70,0	107,0
Gordura (%)	3,8	7,1
Sólidos totais (%)	12,2	18,4
Sólidos não gordos (%)	8,9	12,0
Lactose (%)	4,1	4,6
Proteína (%)	3,5	5,7
Cinza total (%)	0,86	0,90

## 2.4. Mamite

Quando um microrganismo patogénico invade a glândula mamária, através do canal do teto, pode ocorrer uma infeção intramamária (IIM), o que desencadeia uma resposta inflamatória: a mamite (De Vlieghe *et al.*, 2012). A mamite consiste na inflamação do parênquima da glândula mamária, e pode ter diversas etiologias (Teixeira *et al.*, 2008). Podem ser classificadas em mamites clínicas e subclínicas. Nas mamites clínicas além das alterações do leite aparecem também alterações no úbere e no animal sendo os sintomas facilmente detetáveis. Nas mamites subclínicas a inflamação não é facilmente detetada (Menzies e Ramanon, 2001), pois o animal não apresenta sinais visíveis. Este tipo de mamites são as responsáveis por importantes quebras na produção de leite, disseminação de microrganismos e desconforto do animal (Queiroga *et al.*, 2007).

Numa situação sanitária adequada, a prevalência de mamites clínicas numa exploração de animais não deve exceder os 5%, enquanto que com mamite subclínica deve variar em entre 5 e 30%. Contudo, por vezes, há explorações com valores mais elevados (Contreras *et al.*, 2007). A ordenha incompleta ou ineficaz associada à inadequada higienização pré, durante e pós ordenha também são dos principais fatores predisponentes à causa de mamites (Mendonça, 2012). O tratamento consiste na aplicação de antibióticos intramamários, sendo que por vezes também é necessário a administração de anti-inflamatórios. O úbere de um animal não tratado perde capacidade de síntese de leite podendo mesmo provocar a morte do animal em situações extremas (Brown, 2021).

## 3. Células somáticas

O termo somático alude ao facto de as células serem derivadas do corpo (Sarikaya, 2006). As células somáticas (CCS) são todas as células presentes no leite que incluem as células originárias da corrente sanguínea, tais como os leucócitos (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos) e células de descamação do epitélio glandular secretor (Ma *et al.*, 2000). Os leucócitos são os glóbulos brancos do sangue, e constituem a maior fração de células somáticas (75-98%). Assim sendo, a sua contagem aumenta quando está presente uma infeção (Sarikaya, 2006). As células da descamação do epitélio glandular secretor são porções de citoplasma envolvido na membrana celular (2-25%) (Paula *et al.*, 2004). Numa glândula mamária saudável, estas células conferem proteção contra uma IIM, reconhecendo o microrganismo patogénico e iniciando uma resposta inflamatória (Bannerman *et al.*, 2008).

Existem diferentes fatores que podem influenciar a contagem de células somáticas (CCS), tais como: a IIM; o agente patogénico envolvido; a idade do animal; o número de lactações; o período de lactação; o manejo; a sazonalidade; a frequência de ordenha; o tipo de ordenha; o método de contagem; a genética (Malek dos Reis *et al.*, 2011).

A CCS é um indicador do estado sanitário da GM, isto é, o grau de IIM ou mamite. As IIM afetam a qualidade microbiológica, sanitária, química, física, organolética e industrial do leite. A CCS do leite faz parte de um programa de base mundial para o controlo de anomalias do leite de vaca, cabra e ovelha (Paape *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, o limite legal estabelecido é de  $750 \times 10^3$  CCS/mL para o leite de vaca e de

ovelha e, de  $1.500 \times 10^3$  CS/mL para o leite cabra (USPHS/FDA, 2017). Em Portugal, o regulamento (CE) N.º. 1662/2006, de 6 de novembro, determina como limite legal para o leite cru de vaca  $4,0 \times 10^5$  CS/mL, não impondo limites para o leite proveniente de pequenos ruminantes.

A despistagem das mamites deve ser feita pelo menos uma vez por mês a todos animais em produção, por forma a impedir a propagação da infeção (Teixeira *et al.*, 2008). A CCS pode realizar-se através da colheita de amostras de um animal individualmente ou de um tanque (que reflete o número de IIM de todos os animais). Contudo, a CCS individualmente é a melhor maneira de identificar qual ou quais são os animais com mamite clínica e/ou subclínica. A amostra recolhida na máquina de ordenha deve ser representativa, depois de uma correta homogeneização e de forma higiénica (Oliveira *et al.*, 2011).

### 3.1. Viabilidade celular - contagem de células somáticas

Existem vários métodos para a contagem de células somáticas, tais como, observação directa por microscopia, pelo contador Coulter e por citometria de fluxo (Djabri *et al.*, 2002).

O método clássico de microscopia directa, sugerido por Prescott, S.C & Breed (1910), continua a ser utilizado embora tenha sofrido modificações. Atualmente são aceites outras colorações tais como a o método modificado de Prescott e Breed: Broadhurst-Paley, May Grunwald-Giemsa, Hematoxilina-eosina e o Panótipo®, corante à base de eosina e azul de metileno (Djabri *et al.*, 2002). A contagem microscópica é pouco utilizada, pois acarreta muito tempo para o operador e apresenta baixa reprodutibilidade devido à subjetividade do método (Koess e Hamann, 2008).

O contador Coulter indica o número de impulsos elétricos resultantes da passagem de partículas entre dois eléctrodos (Djabri *et al.*, 2002). Na citometria de fluxo, as células do leite são coradas com brometo de etídio, emitindo fluorescência com comprimento de onda específico quando iluminadas por uma lâmpada de alta energia. Equipamentos como o Fossomatic®, são contadores de células por identificação e contagem de núcleos fluorescentes (Djabri *et al.*, 2002).

### 3.2. Diferenciação celular

A CCS determina todos os tipos de células presentes no leite, pelo que não faz a diferenciação entre os tipos de células (Koess e Hamann, 2008). Cada tipo de célula tem a sua função na resposta imunitária da glândula mamária e a contagem diferencial de células no leite pode ser uma ferramenta útil na avaliação da saúde do úbere (Sarikaya, 2006). Por conseguinte, a coloração de CS no leite permite observar a diferenciação celular. Para que seja feita a diferenciação celular podemos utilizar a coloração pan-ótica de acordo com o método Pappenheim. Este método permite a diferenciação das CS quando observadas ao microscópio ótico e fornece informações adicionais sobre o estado imunológico da glândula mamária (Sarikaya, 2006). A coloração pan-ótica, segundo Pappenheim, é uma combinação da coloração de May-Grünwald e da coloração de Giemsa (Biomed, 2021).

No leite existem diferentes tipos de células, incluindo os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (estes incluem os basófilos, eosinófilos e grânulos), macrófagos e linfócitos. As células epiteliais também fazem parte das células somáticas, mas estão presentes em menor quantidade (Figura 7) (Sarikaya, 2006).

Os PMN são de origem mielóide, ou seja, formam-se na medula óssea, e o seu citoplasma é preenchido por grânulos (Sarikaya, 2006). Possuem um diâmetro de 12  $\mu\text{m}$  e seu núcleo é segmentado (Tizard, 2018). Contribuem para a resposta imunitária e são recrutados ativamente para o local da infeção. São as principais células de defesa encontradas no tecido mamário e nas secreções durante a fase inicial do processo inflamatório (Jensen e Eberhart, 1981). Os números de PMN são relativamente baixos na glândula mamária saudável, aumentam até 90% do total da CCS durante a mamite (Paape *et al.*, 2002). Em resposta à inflamação, os PMN migram para o sangue do úbere e fagocitam o agente patogénico (Paape *et al.*, 1979)

Os macrófagos são células de defesa, mononucleares. Possuem igualmente função fagocítica, além disso também têm a função de secretar citocinas e, estas têm um papel de extrema importância na regulação da resposta imunitária. Possuem um diâmetro de 15  $\mu\text{m}$ , bastante citoplasma em volta do núcleo central, lisossomas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os macrófagos são menos ativos que os neutrófilos no leite, mas são capazes de fagocitar uma maior quantidade de bactérias (Tizard, 2018)

Os linfócitos são responsáveis pela resposta do sistema imunitário e pela defesa do organismo. São as únicas células do sistema imunitário capazes de reconhecer antígenos específicos através de recetores da membrana. Produzem-se na medula óssea vermelha, através das células-tronco. Estes são pequenas células redondas que contêm um grande núcleo, citoplasma estreito, mitocôndrias, ribossomas e um pequeno complexo de Golgi. O seu diâmetro varia entre 7 e 15  $\mu\text{m}$  (Tizard, 2018).

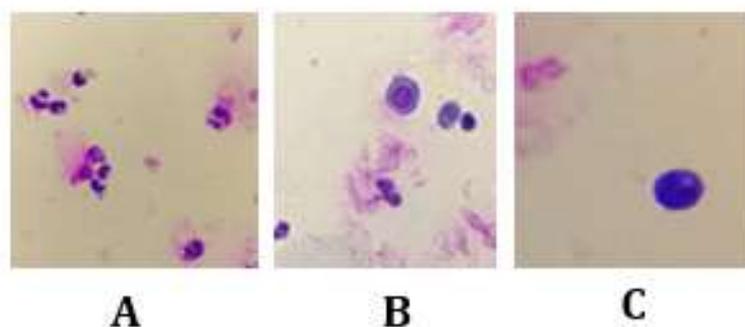


Figura 7- A- Neutrófilos; B- Macrófago; C- Linfócito.

No leite de cabra os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são predominantes, tanto em animais com infecção como em animais saudáveis (Paape *et al.*, 2007). Em cabras sem IIM, os PMN estão presentes em percentagens que variam entre 45 e 74%. Em cabras com IIM estão presentes entre 71 e 86%. Os macrófagos, em animais não infetados, variam entre 15-41% e em animais infetados entre 8-18%. A percentagem de linfócitos corresponde a 9-20% das células somáticas no leite de animais não infetados e 5-11% em animais infetadas. A contagem de células epiteliais no leite de cabra apresenta valores relativamente baixos, pois a identificação por microscopia é difícil de realizar devido à presença de partículas citoplasmáticas no leite (Paape *et al.*, 2001).

Há relatos que as células epiteliais constituíam menos de 1% no total de células. No entanto, estudos mais recentes relatam que 6% das células da glândula mamária não infetada são epiteliais. A secreção de leite na cabra é apócrina, logo as partículas citoplasmáticas são vertidas no leite, a partir da porção apical da glândula mamária. O número de partículas citoplasmáticas presentes no leite das GM não infetadas variam entre 71 e  $306 \times 10^3$  CS/mL e entre 98 a  $231 \times 10^3$  CS/mL para as GM infetadas (Paape *et al.*, 2007).

Os macrófagos são o tipo de células que predominam no leite de uma ovelha saudável (46-84%). Os PMN correspondem a 2-28% de CS no leite e os linfócitos correspondem entre 11-20%.

As células plasmáticas estão presentes no colostro embora em pequeno número (0-20%), bem como as células epiteliais (1-2%). Numa glândula mamária infetada, a percentagem de PMN aumenta 50% e a CCS é de cerca de  $200 \times 10^3$  CS/mL. As partículas citoplasmáticas são constituintes normais do leite de ovelha. No entanto, as concentrações são 10 vezes menores do que as partículas citoplasmáticas no leite de cabra, com uma média de  $15 \times 10^3$  CS/mL (Paape *et al.*, 2007).

## 4. Queijo

O queijo encontra-se presente na alimentação humana há muitos milhares de anos, sendo difícil precisar o início da sua conceção. Contudo, existem relatos de consumo deste produto no ano 7000 a.C., bem como provas arqueológicas encontradas na

Mesopotâmia, que comprovam a presença de queijos feitos com leite de vaca e de cabra datadas de 6000 anos a.C. (Macrae *et al.*, 1993)

Atualmente, segundo a Portaria Nº. 73/90 de 1 de fevereiro, considera-se o queijo como "*o produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite ou do leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído, e também da nata, leitelho, bem como da mistura de alguns ou todos estes produtos, incluído o lactossoro, sem ou com adição de géneros alimentícios*". Por outro lado, "*entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo*"

A classificação dos queijos baseia-se em características decorrentes do tipo de leite utilizado, do tipo de coagulação, da consistência da pasta, do teor de gordura, do tipo de casca e do tempo de cura. (Cassoli, 2013).

A Denominação de Origem Protegida (DOP) consiste num mecanismo de proteção das indicações geográficas e denominações de origem de produtos agrícolas e de géneros alimentícios da União Europeia e dos países do Espaço Económico Europeu que resulta da aplicabilidade direta dos Estados Membros da União do Regulamento (Regulamento (CE) n.º 510/2006, de 20 de Março 2006).

Entende-se por "Denominação de Origem, o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excecionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício

- originário dessa região, desse local determinado ou desse país,
- cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos, e
- cuja produção, transformação e elaboração ocorrem numa área geográfica delimitada".

O uso da DOP obriga a que os queijos sejam produzidos de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações, o qual inclui, designadamente, as condições, de fabrico do produto.

O queijo, é um dos alimentos mais nutritivos, constituído por proteínas, lipídios, hidratos de carbono, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas as vitaminas A e B (Jornal Oficial da União Europeia, 2006).

#### **4.1 Queijo da Beira Baixa com DOP - Queijo Amarelo**

O queijo amarelo da Beira Baixa é um queijo português oriundo da região da Beira Baixa (Figura 8). Segundo o anexo II do Despacho Nº. 10518/ 2007 é definido como um queijo curado, fabricado a partir de leite cru de ovelha (50-100%) estreme ou mistura de leite de ovelha e cabra (0-50%) e que utiliza, como agente coagulante, o coalho de origem animal. É um queijo de pasta semi-dura ou semi-mole, ligeiramente amarelada e mediantemente amanteigada. Possui no seu interior alguns olhos irregulares e é obtido pelo esgotamento da coalhada após coagulação do leite. A crosta aparenta uma consistência semi-dura e bem formada, fina e inteira e de cor amarelo ou amarelo-

torrado. O seu aroma é intenso, mas agradável e o sabor é limpo e ligeiramente acidulado. A maturação tem um tempo mínimo de 40 dias e decorre em condições que variam entre os 10 e os 18°C para a temperatura, e entre os 50 e os 70% de humidade relativa. As dimensões e pesos estabelecidos variam para o diâmetro, entre os 7 e os 10 cm, e para o peso entre 200 a 500 g (DGADR, 2021a).



Figura 8- Área de produção do Queijo Amarelo da Beira Baixa (DGADR, 2021a).

## 4.2. Queijo do Rabaçal com DOP

O queijo Rabaçal (Figura 9) é oriundo da freguesia do Rabaçal, no concelho de Penela, distrito de Coimbra.

É um queijo artesanal curado, de pasta semidura a dura, com poucos ou nenhuns olhos pequenos e irregulares distribuídos na massa branca-mate. É obtido por esgotamento lento da coalhada, após a coagulação de leites de ovelha e cabra, por ação do coalho animal. O sabor distintivo deste queijo é devido a uma planta chamada “Santa Maria” (*Thymus zygis*). Trata-se de um tomilho espontâneo, abundante na área, que serve de alimento às ovelhas e cabras que fornecem o leite para a produção deste queijo. Comercialmente pode apresentar-se com um peso compreendido entre 0,3 kg a 0,5 kg e dimensões com diâmetro de 10 - 12 cm e altura de 3,3 a 4,2 cm (DGADR, 2021b).



Figura 9- Área de produção do Queijo do Rabaçal (DGADR, 2021b).

## 4.3. Queijo da Serra da Estrela com DOP

O queijo da Serra da Estrela (Figura 10) é um produto tradicional da Beira Alta. É produzido em dezoito concelhos de quatro distritos (DGADR, 2021c).

Este queijo é produzido com leite de ovelha cru. As ovelhas têm que ser de raças locais, tais como a Bordaleira da Serra da Estrela e/ou Churra Mondegueira. Normalmente o período de produção é entre novembro e abril (Inácio *et al.*, 2020).

O queijo “Serra da Estrela é definido como um queijo de ovelha curado, de pasta semi-mole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada bem ligada, cremosa e untosa, com poucos ou nenhuns “olhos”, obtido por dessoramento lento da coalhada, depois da coagulação do leite de ovelha cru e pelo cardo (*Cynara cardunculus*), de fabrico artesanal e proveniente da Região Demarcada/Área Geográfica de Produção” Serra da Estrela. A maturação deste queijo é lenta, a temperaturas baixas entre 6 e 12°C e humidade relativa elevada que varia entre 85 e 90%, sendo o tempo mínimo de cura

de 30 dias. O seu peso deve estar compreendido entre 1,0 e 1,7 kg, com um diâmetro de aproximadamente 15 a 20 centímetros (DGADR, 2021c).



Figura 10-Área de produção do Queijo da Serra da Estrela (DGADR, 2021c).

#### 4.4. As células somáticas e o queijo

Quanto melhor for a qualidade do leite, maior vai ser o rendimento no fabrico de queijos (Cassoli, 2013). A CCS tem influência direta no rendimento da produção de queijos (Barbano *et al.*, 1991).

A alteração da composição do leite influencia diretamente a qualidade dos produtos lácteos. O leite com uma elevada CCS está associado a um aumento do tempo de coagulação, aumento das proteínas e redução do teor de gordura, aumento da humidade do queijo e redução do rendimento queijeiro, observando-se uma proteólise mais intensa durante o processo de maturação do queijo (Mazal *et al.*, 2007).

### III. Material e métodos

#### 1. Matéria-prima

Foram recolhidas as amostras de leite de ovelha e cabra em cinco distritos da Região Centro de Portugal, mais concretamente nos distritos de Castelo Branco, Coimbra, Guarda, Leiria e Viseu.

A amostragem foi realizada por um técnico devidamente especializado, a cada quinze dias, duas vezes por semana (terça e sexta-feira). As recolhas para este estudo foram realizadas entre 08 de outubro de 2019 a 26 de junho de 2020. Devido ao primeiro Estado de Emergência Nacional, provocado pelo SARS-CoV-2, não foram efectuadas as recolhas de amostras programadas para o mês de abril de 2020.

As amostras foram retiradas do tanque de leite da exploração, acondicionadas em frascos esterilizados (de 100 mL) e transportadas em malas térmicas refrigeradas (0-4°C), de modo a evitar alterações e/ou deterioração do leite. O período entre a colheita da amostra e a análise da mesma nunca excedeu as 24 horas.

Foram analisados os parâmetros físico-químicos de 127 amostras de leite de ovelha, das quais 58 correspondem à raça Bordaleira Serra da Estrela, 69 de mistura entre as raças Assaf, Lacaune e Merino e 15 amostras de leite de cabra da raça Sannen.

Para a contagem diferencial de células somáticas foram analisadas 108 amostras de leite de ovelha das quais 50 correspondem à raça Bordaleira Serra da Estrela e 58 de mistura entre as raças Assaf, Lacaune e Merino.

Para a identificação celular analisaram-se 100 amostras de leite de ovelha das quais 48 correspondem à raça Bordaleira Serra da Estrela e 52 de mistura entre as raças Assaf, Lacaune e Merino (Tabela 2).

**Tabela 2-** Número de amostras analisadas.

Raça	FQ	CCS	Identificação celular
Ovelha - Bordaleira Serra da Estrela	58	50	48
Ovelha - Cruzamento (Assaf, Lacaune e Merino)	69	58	52
Cabra - Sannen	15	12	11

## **2. Procedimentos técnicos**

### **2.1. Composição nutricional do leite analisado por Milkoscan™**

O Milkoscan™ (FT120 da Foss®) é um equipamento automático, que permite analisar elevado número de amostras leite, num curto espaço de tempo, utilizando um volume reduzido de amostra.

O leite foi analisado segundo o Método interno PT.LFQ.0403 Através de uma bomba automática, integrada no equipamento, é sugada uma pequena porção de amostra, que passa por um homogeneizador de alta pressão (reduzindo o tamanho dos glóbulos de gordura). Posteriormente, a amostra é injetado na célula de análise onde é analisada por infravermelhos com transformação de Fourier (FTIR).

É de salientar, que antes de proceder à análise da amostra é necessário limpar o equipamento (Washing Machine) e efectuar o Zero Setting.

Foram determinados os teores de proteína, gordura, sólidos totais (ST), sólidos não gordos e lactose, sendo os resultados expressos em % (m/m).

### **2.2. Viabilidade e identificação celular**

#### **2.2.1 Preparação de soluções**

Para a avaliação da viabilidade e identificação celular foi necessário preparar diversas soluções antes de visualizar ao microscópio ótico, nomeadamente, solução tampão-salina (PBS), corante azul tripano a 0,4%, solução May-Gruenwald e solução de Giemsa a 3%.

A solução PBS é uma solução salina que contém cloreto de sódio, é isotónica e não é tóxica para as células. É utilizada como diluente e como uma solução de limpeza celular.

O corante azul tripano é um corante vital, ou seja, a reatividade deste baseia-se no fato do cromóforo ser negativamente carregado e não interagir com as células a menos que a membrana esteja danificada. Assim, as células que excluem o corante são teoricamente viáveis, ficando as células mortas coradas de azul e as viáveis ficam translúcidas brilhantes.

Os corantes May-Grunwald e Giemsa podem ser usados em conjunto na coloração de células para contagem diferencial de leucócitos, durante uma análise hematológica. Tem como características permitir a visualização de forma pormenorizada de diversas características citoplasmáticas.

### 2.2.1.1. Solução tampão salina (PBS)

Para a preparação de 1 L de solução tampão salina PBS necessitou-se (Tabela 3).

**Tabela 3** - Preparação da Solução salina PBS

	<i>Cloreto de sódio (NaCl)</i>	<i>Cloreto de potássio (KCl)</i>	<i>Fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</i>	<i>Fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</i>
<b>Quantidade (g)</b>	80	2	14,4	2,4

O pH final da solução deve ser 7,4, caso não esteja certo, é necessário ajustar com ácido clorídrico (HCl), e perfazer a solução com água destilada. Autoclavar a solução final a 121°C durante 15 minutos. A solução deve ser armazenada à temperatura ambiente.

### 2.2.1.2. Corante azul tripano a 0,4%

Para a preparação do corante azul tripano (Sigma) pesou-se 0,4 g do reagente para um balão volumétrico, dissolveu-se e adicionou-se água destilada até perfazer 100 mL.

### 2.2.1.3. Solução May-Gruenwald (1:2)

Colocou-se 50 mL de corante May-Gruenwald (LabKem) para um balão volumétrico de 100 mL, e perpez-se o volume com água destilada esterilizada.

### 2.2.1.4. Solução de Giemsa a 3%

Adicionou-se-se 3 mL de solução de Giemsa (LabKem) para um balão volumétrico de 100 mL e perpez-se o volume com água destilada esterilizada.

## 2.2.2. Preparação da amostra

Para a realização das técnicas de viabilidade e identificação celular utilizou-se o mesmo procedimento na preparação da amostra.

Colocou-se a amostra de leite num tubo de falcon de 50 mL (Figura 11 A). De seguida centrifugou-se (Eppendorf Centrifuge 5810 R) durante 30 minutos a 1500 g e a 4°C (Figura 11 B). Posteriormente removeu-se a camada de gordura (que se formou no topo), com o auxílio de uma espátula, e descartou-se o sobrenadante (Figura 11 C). Ressuspendeu-se o sedimento celular em 5 mL de PBS (frio) (Figura 11 D). Perpez-se o volume com PBS até aos 50 mL (Figura 11 E) e centrifugou-se durante 15 minutos a

460 g e a 4°C (passo de lavagem). Após o término da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com PBS o sedimento até aos 5 mL.

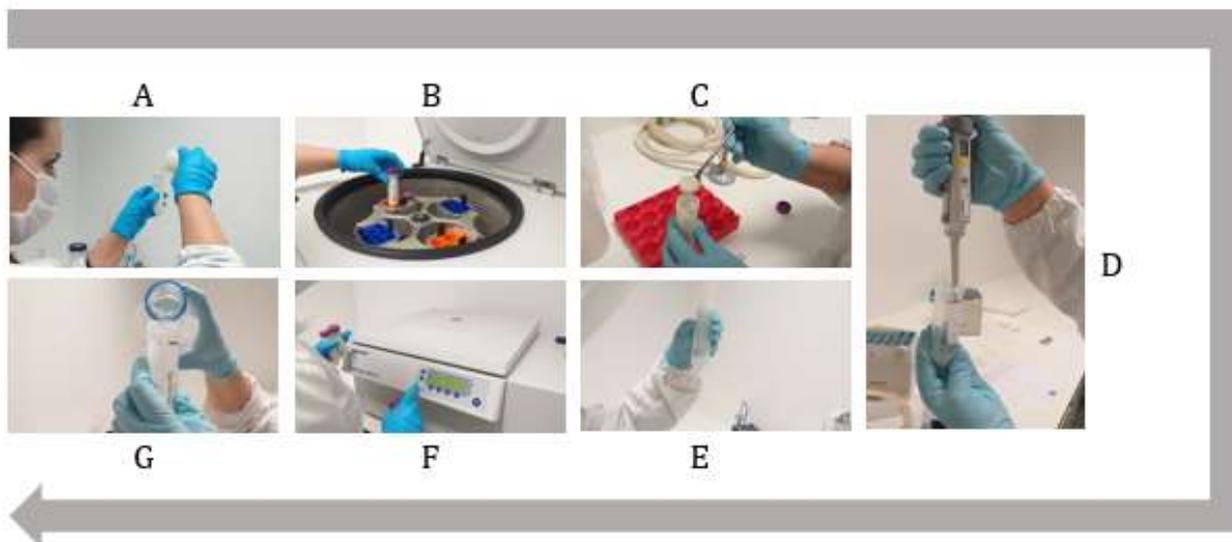


Figura 11-Preparação da amostra.

Para a observação da viabilidade celular (Figura 12) retirou-se 25  $\mu$ L de suspensão final para um eppendorf e adicionar 25  $\mu$ L de azul tripano a 0,4%. Homogeneizou-se, com a ajuda de uma micropipeta, e de seguida encheram-se os dois poços da câmara de *Neubauer*.



Figura 12-Preparação da amostra para verificação da viabilidade celular.

Para a identificação celular (Figura 13), retirou-se 10  $\mu$ L de amostra e espalhou-se na lâmina de microscópio, na qual se encontrava desenhada uma circunferência com 1 cm de diâmetro. A lâmina ficou a secar durante 24 horas.

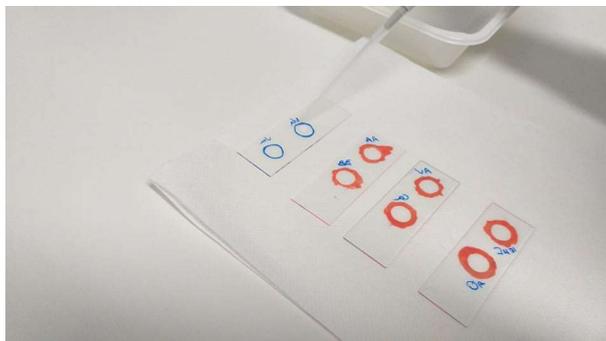


Figura 13-Preparação da amostra para verificação da viabilidade celular.

No dia seguinte, procedeu-se à coloração. A lâmina foi corada com a solução May-Gruenwald durante 3 minutos. De seguida corou-se com a mesma solução, mas na proporção de 1:2, durante 1 minuto. Por último corou-se com solução Giemsa a 3% durante 14 minutos. Lavou-se suavemente a lâmina com PBS e colocou-se a secar, ao ar, durante 1 hora.

### 2.2.3. Visualização ao microscópio

#### 2.2.3.1. Viabilidade celular (CCS)

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado um microscópio Zess Primo Star (Figura 14).

Colocou-se a câmara de *Neubauer* no microscópio e visualizou-se na objetiva de 40x. De seguida procedeu-se à contagem das células. Salienta-se, que as células vivas apresentavam-se brilhantes e translúcidas, enquanto as células mortas estavam coradas de azul-escuro.



Figura 14-Microscópio óptico (Zess Primo Star).

### 2.2.3.2. Identificação celular

Foram contabilizadas até 100 células na zona delimitada feita nas lâminas. Para a identificação celular recorreu-se ao microscópio e utilizou-se a objetiva de 100x. Previamente colocou-se na lâmina uma gota de óleo de imersão.

## 2.3. Cálculo do Rendimento queijeiro

O rendimento queijeiro é definido como a quantidade de queijo expresso em gramas, obtido a partir de 100 mL de leite. Quanto maior a percentagem de sólidos do leite recuperados maior será a quantidade de queijo obtido e, como tal, maior o rendimento económico (Paolo *et al.*, 2008).

Para estimar o potencial rendimento queijeiro (PRQ) de leite de ovelha (Marques *et al.*, 2011) utilizou-se a seguinte equação:

**PRQ (g MS/100 mL de leite)** = -1,14683 + 0,00034652 x leite (mL) + 8,17472 x gordura (%) + 7,38509 x proteína (%) + 8,15955 x lactose (%) - 6,69179 x ST (%)

## 3. Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado utilizando o software SPSS versão 23. Para cada caso foi determinada a média e o desvio padrão da amostra. Utilizou-se o teste T-Student, como teste para comparação de médias relativamente aos parâmetros em que a análise foi feita com base em dois tratamentos. A comparação de médias de parâmetros com base em três ou mais tratamentos, foi realizada através de uma análise de variâncias (ANOVA). Para a sua ordenação foi utilizado o teste de Bonferroni. As diferenças significativas entre médias foram aceites para  $p < 0,05$ . O teste de Pearson foi utilizado para analisar as correlações entre as variáveis.

## IV. Apresentação e discussão de resultados

### 1. Comparação entre leite de ovelha e cabra

#### 1.1. Diferenças na composição química

O leite de ovelha apresenta diferenças na sua constituição em relação ao leite de cabra, ou seja, na sua constituição apresenta maiores teores de proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos ( $p < 0,05$ ) enquanto que para a lactose não existem diferenças, como se pode observar na tabela 4.

A composição do leite, tanto de ovelha como de cabra, varia de acordo com a raça, alimentação e ambiente. A lactose é um dos parâmetros nutricionais mais estáveis na composição química do leite (González, 2001)

De acordo com a revisão bibliográfica (tabela 1), a percentagem de proteína é de 5,7% e 3,5% para o leite de ovelha e de cabra, respectivamente. Por outro lado, o teor de gordura é superior no leite de ovelha, sendo 7,1% e 3,8% para o leite de cabra (Park *et al.*, 2017). Os teores de proteína e gordura, tanto para o leite de ovelha como de cabra (tabela 4), estão de acordo com os valores da literatura (tabela 1) (Park *et al.*, 2017).

**Tabela 4** - Composição nutricional do leite de ovelha (n=127) e de cabra (n=15).

Composição	Ovelha	Cabra
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
Proteína (%)	5,85 <sup>a</sup> ±0,58	3,57 <sup>b</sup> ±0,21
Gordura (%)	7,45 <sup>a</sup> ±0,90	4,67 <sup>b</sup> ±0,40
Sólidos totais (%)	18,77 <sup>a</sup> ±1,35	13,53 <sup>b</sup> ±0,63
Sólidos não gordos (%)	11,38 <sup>a</sup> ±0,66	8,82 <sup>a</sup> ±0,28
Lactose (%)	4,62 <sup>a</sup> ±0,24	4,58 <sup>a</sup> ±0,08
PRQ (g MS/100 mL)	15,14 <sup>a</sup> ±1,30	10,30 <sup>b</sup> ±0,99

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ ; PRQ - potencial rendimento queijeiro; MS - matéria seca.

O leite de ovelha tem simultaneamente um teor de ST (18,77%) e um PRQ (15,14%) mais elevado que o leite de cabra ( $p < 0,05$ ) (tabela 4). Estes resultados estão em concordância com o que é referido por Martins *et al.* (2009) quando refere que os leites que apresentam um teor mais elevado de sólidos totais, têm uma maior potencial para a produção de queijo.

## 1.2. Viabilidade celular e células somáticas

A quantidade de CS no leite é considerado um importante indicador da saúde do úbere, uma vez que estas fazem parte do sistema imunológico inato e estão envolvidas na proteção da glândula mamária de infecções. A CCS no leite é influenciada por vários fatores, como espécie animal, o nível de produção de leite, a fase de lactação e também fatores individuais e ambientais (Rupp *et al.*, 2000). Embora a CCS esteja sujeita a variações, são usadas como um indicador da qualidade do leite em várias espécies, especialmente nos ruminantes (Sharma *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2013)

O leite de ovelha apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a contagem de células somáticas em relação ao leite de cabra, sendo o valor superior ( $4,37 \times 10^5$  CS/mL) para o leite de cabra (Tabela 5). Segundo Paape *et al.*, (2001), para leite produzido por uma glândula mamária saudável, a CCS é de 10 a  $200 \times 10^3$  CS/mL para o leite de ovelha e de 270 a  $2000 \times 10^3$  CS/mL para o leite de cabra. O leite cru de cabra tem uma CCS sempre mais elevado em comparação com o leite de ovelha e de vaca, pois é um tipo de leite apócrino, que contém naturalmente quantidades mais elevadas de células epiteliais bem como fragmentos provenientes da descamação do epitélio e da regeneração dos alvéolos mamários (Podhorecká *et al.*, 2021).

Podemos observar, que existem diferenças significativas, para as contagens dos diferentes tipos de células (Tabela 5). O número de linfócitos ( $8,02 \times 10^4$  CS/mL), de neutrófilos ( $3,21 \times 10^5$  CS/mL) e de macrófagos ( $3,19 \times 10^4$  CS/mL) é sempre superior para o leite de cabra.

No leite de ovelha, para a GM saudável, as células predominantes são os macrófagos, enquanto para o leite de cabra são os neutrófilos (Paape *et al.*, 2001). No leite os macrófagos atuam contra a invasão de agentes patogênicos, uma vez estes agentes, libertam mensageiros químicos, que desencadeiam a migração dos PMN para a infecção.

Os PMN fagocitam e destroem os agentes patogênicos invasores. Os linfócitos contribuem para a defesa do sistema imunitário (Pirisi *et al.*, 2002).

**Tabela 5** - Contagem de células somáticas e identificação celular no leite de ovelha (n=108) e cabra (n=12).

Células	Ovelha	Cabra
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
CS (células/mL)	$8,07 \times 10^4 \text{ }^b \pm 7,18 \times 10^4$	$4,37 \times 10^5 \text{ }^a \pm 1,17 \times 10^5$
Linfócitos (células/mL)	$2,21 \times 10^4 \text{ }^b \pm 2,45 \times 10^4$	$8,02 \times 10^4 \text{ }^a \pm 1,82 \times 10^4$
Neutrófilos (células/mL)	$2,94 \times 10^4 \text{ }^b \pm 4,25 \times 10^4$	$3,21 \times 10^5 \text{ }^a \pm 1,09 \times 10^5$
Macrófagos (células/mL)	$2,26 \times 10^4 \text{ }^a \pm 2,58 \times 10^4$	$3,19 \times 10^4 \text{ }^a \pm 4,44 \times 10^4$

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ .

## 2. Comparação entre leites das diferentes raças de ovelhas

### 2.1. Composição nutricional

O leite proveniente da região da Serra da Estrela apresentam teores de proteína superiores (6,07%) comparativamente ao leite proveniente da Beira Baixa e do Rabaçal. Os teores de gordura, sólidos totais, sólidos não gordos, lactose e o PRQ encontrados também são superiores ( $p < 0,05$ ) no leite de ovelha proveniente da Serra da Estrela quando comparados com o leite de ovelha da região da Beira Baixa. Contudo não foram encontradas diferenças significativas com o leite do Rabaçal. Adicionalmente o leite do Rabaçal apresentam um teor de lactose superior (4,82%;  $p < 0,05$ ) ao do leite da região da Beira Baixa e da Serra da Estrela.

**Tabela 6** - Diferenças nutricionais do leite de ovelha destinado ao fabrico dos queijos com DOP Serra da Estrela (n=58), Amarelo da Beira Baixa (n=54) e Rabaçal (n=15).

Composição do leite	Serra da Estrela	Amarelo Beira Baixa	Rabaçal
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
Proteína (%)	6,07 <sup>a</sup> ±0,46	5,70 <sup>b</sup> ±0,66	5,53 <sup>b</sup> ±0,28
Gordura (%)	7,66 <sup>a</sup> ±0,91	7,24 <sup>b</sup> ±0,93	7,43 <sup>ab</sup> ±0,56
Sólidos totais (%)	19,24 <sup>a</sup> ±1,23	18,30 <sup>b</sup> ±1,45	18,61 <sup>ab</sup> ±0,66
Sólidos não gordos (%)	11,66 <sup>a</sup> ±0,46	11,11 <sup>a</sup> ±0,78	11,26 <sup>ab</sup> ±0,35
Lactose (%)	4,67 <sup>a</sup> ±0,22	4,50 <sup>b</sup> ±0,23	4,82 <sup>a</sup> ±0,08
PRQ (gMS/100 mL)	15,73 <sup>a</sup> ±1,19	14,48 <sup>b</sup> ±1,24	15,21 <sup>ab</sup> ±0,70

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ ; PRQ - potencial rendimento queijeiro; MS - matéria seca.

A maior percentagem de constituintes sólidos do leite proveniente da região da Serra da Estrela está relacionada com a genética e com o manejo alimentar da raça Bordaleira da Serra da Estrela. O leite recolhido em explorações com mistura de raças autóctones (Merino) e raças exóticas (Lacaune e Assaf) que é destinado ao fabrico dos queijos Amarelo da Beira Baixa e Rabaçal, apresentam menores teores de gordura e de proteína provavelmente devido não só aos animais cruzados serem mais produtivos, como também devido ao sistema de produção mais intensivo a que estes animais estão sujeitos. Os valores encontrados no nosso trabalho estão de acordo com os referidos por Martins *et al.*, (2009) que, ao analisarem leites de 3 raças de ovinos (Assaf, Merina e Saloia) criadas em Portugal, encontraram variações no teor em gordura do leite entre 9,20% na raça Saloia e 7,65% na raça Assaf, no teor em proteína do leite entre 6,96% na raça Merina e 5,48% na raça Assaf e no teor em sólidos não gordos do leite entre 12,28% na raça Merina e 11,05% na raça Assaf.

## 2.2. Viabilidade celular e células somáticas

O leite destinado ao fabrico de queijo com DOP Amarelo da Beira Baixa apresenta uma contagem de CS superior ( $1,32 \times 10^5$  CS/mL) em relação aos outros dois tipos de leite (tabela 7).

O número de linfócitos é mais elevado ( $3,82 \times 10^4$  CS/mL) no leite da Beira Baixa. Os outros dois tipos de células (Neutrófilos e Macrófagos) também apresentam valores mais elevados no leite proveniente da região da Beira Baixa, no entanto, o leite proveniente da Serra da Estrela possui os valores mais baixos. Estes resultados indicam que o leite da Serra da Estrela tem menor quantidade de células somáticas, um indicador de maior qualidade.

**Tabela 7** - CCS e Viabilidade celular do leite destinado ao fabrico dos queijos com DOP da Serra da Estrela (n=50), Amarelo da Beira Baixa (n=46) e Rabaçal (n=12).

Células do leite	Serra da Estrela	Amarelo Beira Baixa	Rabaçal
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
CS (células/mL)	$3,50 \times 10^4 \text{ }^b \pm 2,21 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5 \text{ }^a \pm 8,03 \times 10^4$	$7,35 \times 10^4 \text{ }^b \pm 3,18 \times 10^4$
Linfócitos (células/mL)	$9,61 \times 10^3 \text{ }^b \pm 5,66 \times 10^3$	$3,82 \times 10^4 \text{ }^a \pm 3,10 \times 10^4$	$1,66 \times 10^4 \text{ }^b \pm 1,05 \times 10^4$
Neutrófilos (células/mL)	$8,94 \times 10^3 \text{ }^b \pm 1,25 \times 10^4$	$5,32 \times 10^4 \text{ }^a \pm 5,60 \times 10^4$	$2,95 \times 10^4 \text{ }^{ab} \pm 1,74 \times 10^4$
Macrófagos (células/mL)	$1,51 \times 10^4 \text{ }^b \pm 9,21 \times 10^3$	$3,14 \times 10^4 \text{ }^a \pm 3,67 \times 10^4$	$2,21 \times 10^4 \text{ }^{ab} \pm 1,49 \times 10^4$

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ .

As CS presentes no leite são uma consequência das infeções da glândula mamária que exercem influência extremamente prejudicial sobre a composição e características físico-químicas do leite (Müller, 2002). A composição do leite, a sua atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos, são influenciados negativamente (Müller, 2002) e a baixa qualidade do leite para consumo pode acarretar sérios problemas para a saúde pública (Ribeiro Júnior *et al.*, 2008)

### 3. Evolução dos parâmetros do leite de ovelha ao longo de três estações do ano (Outono, Inverno e Primavera).

#### 3.1. Composição química

De acordo com a tabela 8, o leite destinado ao fabrico de queijos com DOP da Serra da Estrela, ao longo das três estações do ano (Outono, Inverno e Primavera) não apresenta diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros proteína, gordura, sólidos totais e rendimento queijeiro. No entanto, podemos observar que para a proteína (6,19%) e para os sólidos não gordos (11,83%) os valores são significativamente maiores no Inverno ( $p < 0,05$ ). Pelo contrário, os valores de gordura (8,09%), de ST (19,54%) e de PRQ (15,86%) são mais elevado na Primavera. No Outono e no Inverno constata-se que a percentagem de lactose é superior ( $p < 0,05$ ) em relação à Primavera. Pode-se concluir que perante os parâmetros nutricionais analisados, o leite da Serra da Estrela mantém-se relativamente constante ao longo do ano.

**Tabela 8** - Composição nutricional do leite de raça Bordaleira Serra da Estrela destinado ao fabrico dos queijos Serra da Estrela com DOP, no Outono (n=18), no Inverno (n=26) e na Primavera (n=14).

Composição	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
Proteína (%)	5,92 <sup>a</sup> ±0,39	6,19 <sup>a</sup> ±0,49	6,05 <sup>a</sup> ±0,46
Gordura (%)	7,37 <sup>a</sup> ±0,98	7,63 <sup>a</sup> ±0,88	8,09 <sup>a</sup> ±0,73
Sólidos totais (%)	18,82 <sup>a</sup> ±1,27	19,37 <sup>a</sup> ±1,27	19,54 <sup>a</sup> ±1,04
Sólidos não gordos (%)	11,57 <sup>ab</sup> ±0,32	11,83 <sup>a</sup> ±0,47	11,45 <sup>b</sup> ±0,50
Lactose (%)	4,74 <sup>a</sup> ±0,12	4,71 <sup>a</sup> ±0,18	4,52 <sup>b</sup> ±0,31
PRQ (g MS/100 mL)	15,54 <sup>a</sup> ±1,19	15,79 <sup>a</sup> ±1,15	15,86 <sup>a</sup> ±0,86

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ ; PRQ - potencial rendimento queijeiro; MS - matéria seca.

No caso do leite destinado ao fabrico de queijo Amarelo com DOP da região da Beira Baixa (Tabela 9), observa-se que há diferenças significativas para o teor de proteína (6,15%) no Outono, sendo este valor superior ( $p < 0,05$ ) comparativamente com as outras duas estações do ano, não havendo diferenças significativas entre o Inverno e a Primavera. O mesmo acontece para os parâmetros gordura (7,75%), sólidos totais (19,12%) e sólidos não gordos (11,45%) que são significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no Outono. A lactose apresenta um valor mais elevado (4,63%) no Inverno e na Primavera (4,57%).

Os resultados da composição nutricional indicam que o leite tem variações em vários parâmetros ao longo do ano, o que afeta o rendimento queijeiro (Tabela 9) que é menor ( $p < 0,05$ ) na Primavera (14,01 g MS/100 mL). Isto pode indicar que o aumento da disponibilidade de pastagem na Primavera vai influenciar favoravelmente o volume de leite produzido por ovelha diminuindo as percentagens dos constituintes sólidos do leite.

**Tabela 9** - Composição nutricional do leite destinado ao fabrico dos queijos Amarelo da Beira Baixa com DOP no Outono (n=20), no Inverno (n=20) e na Primavera (n=14).

Composição	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
Proteína (%)	6,15 <sup>a</sup> ±0,82	5,47 <sup>b</sup> ±0,43	5,40 <sup>b</sup> ±0,25
Gordura (%)	7,75 <sup>a</sup> ±1,23	6,98 <sup>b</sup> ±0,55	6,88 <sup>b</sup> ±0,46
Sólidos totais (%)	19,12 <sup>a</sup> ±1,86	17,92 <sup>b</sup> ±0,98	17,68 <sup>b</sup> ±0,63
Sólidos não gordos (%)	11,45 <sup>a</sup> ±1,08	11,00 <sup>ab</sup> ±0,47	10,79 <sup>b</sup> ±0,37
Lactose (%)	4,34 <sup>b</sup> ±0,28	4,63 <sup>a</sup> ±0,12	4,57 <sup>a</sup> ±0,12
PRQ (g MS/100 mL)	15,06 <sup>a</sup> ±1,61	14,23 <sup>ab</sup> ±0,85	14,01 <sup>b</sup> ±0,73

a, b -

notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ ; PRQ - potencial rendimento queijeiro; MS - matéria seca.

Por último, o leite de ovelha destinado ao fabrico de queijo com DOP Rabaçal (Tabela 10) apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o teor de proteína, no Outono e Primavera, embora apresente um valor superior (5,75%) no Outono. O teor de ST e lactose é superior no Inverno (18,95%) e no Outono (18,79%) comparativamente à Primavera (17,92%).

Os sólidos não gordos diferem apenas na Primavera, apresentando um valor mais baixo (10,81%), não apresentando diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no Outono e no Inverno. Para o parâmetro da gordura e para o PRQ não há diferenças significativas nas diferentes estações do ano, embora apresentem um teor de gordura (7,73%) ligeiramente superior no Inverno.

Verifica-se a mesma situação que no leite da Serra da Estrela, apesar de haver algum decréscimo em alguns parâmetros na Primavera, a qualidade nutricional do leite mantém-se relativamente constante ao longo do ano.

**Tabela 10** - Composição nutricional do leite destinado ao fabrico dos queijos Rabaçal com DOP, no Outono (n=6), no Inverno (n=5) e na Primavera (n=4).

Composição	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
Proteína (%)	5,75 <sup>a</sup> ±0,26	5,48 <sup>ab</sup> ±0,13	5,26 <sup>b</sup> ±0,20
Gordura (%)	7,39 <sup>a</sup> ±0,66	7,73 <sup>a</sup> ±0,43	7,10 <sup>a</sup> ±0,44
Sólidos totais (%)	18,79 <sup>ab</sup> ±0,54	18,95 <sup>a</sup> ±0,49	17,92 <sup>b</sup> ±0,59
Sólidos não gordos (%)	11,52 <sup>a</sup> ±0,25	11,30 <sup>a</sup> ±0,15	10,81 <sup>b</sup> ±0,15
Lactose (%)	4,82 <sup>ab</sup> ±0,08	4,87 <sup>a</sup> ±0,02	4,75 <sup>b</sup> ±0,07
PRQ (gMS/100 mL)	15,34 <sup>a</sup> ±0,62	15,57 <sup>a</sup> ±0,62	14,58 <sup>a</sup> ±0,63

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ ; PRQ - potencial rendimento queijeiro; MS - matéria seca.

### 3.2. Viabilidade celular e células somáticas

O leite de ovelha destinado ao fabrico de queijo com DOP Serra da Estrela (Tabela 11) não apresenta diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) durante o Outono e o Inverno, mas há um aumento do número de CS na Primavera ( $5,98 \times 10^4$  CS/mL).

O número de linfócitos aumenta durante a Primavera ( $1,56 \times 10^4$  CS/mL), bem como o número de neutrófilos e de macrófagos.

Como seria de esperar, com o aumento do número de células somáticas há um aumento dos diferentes tipos celulares.

**Tabela 11** - CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Serra da Estrela com DOP, no Outono (n=13), no Inverno (n=26) e na Primavera (n=11).

Células	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
CS (células/mL)	$2,99 \times 10^4 \text{ b} \pm 1,90 \times 10^4$	$2,71 \times 10^4 \text{ b} \pm 7,80 \times 10^3$	$5,98 \times 10^4 \text{ a} \pm 3,07 \times 10^4$
Linfócitos (células/mL)	$9,08 \times 10^3 \text{ b} \pm 5,67 \times 10^3$	$7,29 \times 10^3 \text{ b} \pm 3,21 \times 10^3$	$1,56 \times 10^4 \text{ a} \pm 6,55 \times 10^3$
Neutrófilos (células/mL)	$9,06 \times 10^3 \text{ ab} \pm 1,09 \times 10^4$	$4,27 \times 10^3 \text{ b} \pm 4,70 \times 10^3$	$1,98 \times 10^4 \text{ a} \pm 1,92 \times 10^4$
Macrófagos (células/mL)	$8,84 \times 10^3 \text{ c} \pm 9,18 \times 10^3$	$1,55 \times 10^4 \text{ b} \pm 4,64 \times 10^3$	$2,44 \times 10^4 \text{ a} \pm 9,79 \times 10^3$

a, b, c - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ .

Para o leite destinado ao fabrico de queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP, podemos observar na tabela 12, que o número de células somáticas aumenta na Primavera ( $1,84 \times 10^5$  CS/mL), havendo um decréscimo no Inverno.

O número de linfócitos ( $5,39 \times 10^4$  CS/mL) e de neutrófilos ( $9,67 \times 10^4$  CS/mL) também é superior na Primavera. Relativamente ao número de macrófagos, o valor é superior no Outono ( $5,06 \times 10^4$  CS/mL).

**Tabela 12** - CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Amarelo com DOP da Beira Baixa, no Outono (n=20), no Inverno (n=15) e na Primavera (n=11).

Células	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
CS (células/mL)	$1,33 \times 10^5 \text{ ab} \pm 8,61 \times 10^4$	$9,23 \times 10^4 \text{ b} \pm 5,35 \times 10^4$	$1,84 \times 10^5 \text{ a} \pm 7,48 \times 10^4$
Linfócitos (células/mL)	$3,65 \times 10^4 \text{ a} \pm 2,24 \times 10^4$	$2,84 \times 10^4 \text{ a} \pm 1,70 \times 10^4$	$5,39 \times 10^4 \text{ a} \pm 4,82 \times 10^4$
Neutrófilos (células/mL)	$3,09 \times 10^4 \text{ b} \pm 6,13 \times 10^4$	$4,36 \times 10^4 \text{ b} \pm 4,02 \times 10^4$	$9,67 \times 10^4 \text{ a} \pm 4,53 \times 10^4$
Macrófagos (células/mL)	$5,06 \times 10^4 \text{ a} \pm 5,53 \times 10^4$	$1,49 \times 10^4 \text{ b} \pm 1,35 \times 10^4$	$3,36 \times 10^4 \text{ ab} \pm 1,16 \times 10^4$

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ .

Relativamente ao leite destinado ao fabrico de queijo com DOP Rabaçal podemos observar, na tabela 13, que não há diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para a contagem

de CS nas diferentes estações do ano, contudo podemos constatar que este número é superior na Primavera ( $1,04 \times 10^5$  CS/mL).

Em relação à identificação celular, pode-se verificar que o valor de linfócitos, neutrófilos e macrófagos é sempre superior na Primavera, seguindo-se do Outono e do Inverno, respetivamente.

**Tabela 13** - CCS e diferenciação celular no leite destinado ao fabrico dos queijos Rabaçal com DOP, no Outono (n=5), no Inverno (n=4) e na Primavera (n=3).

Células	Outono	Inverno	Primavera
	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
CS (células/mL)	$7,32 \times 10^4 \text{ }^a \pm 2,87 \times 10^4$	$5,08 \times 10^4 \text{ }^a \pm 9,91 \times 10^3$	$1,04 \times 10^5 \text{ }^a \pm 3,58 \times 10^4$
Linfócitos (células/mL)	$1,54 \times 10^4 \text{ }^a \pm 6,35 \times 10^3$	$1,18 \times 10^4 \text{ }^a \pm 8,58 \times 10^3$	$2,47 \times 10^4 \text{ }^a \pm 1,82 \times 10^4$
Neutrófilos (células/mL)	$3,03 \times 10^4 \text{ }^a \pm 1,84 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4 \text{ }^a \pm 8,58 \times 10^3$	$4,04 \times 10^4 \text{ }^a \pm 2,38 \times 10^4$
Macrófagos (células/mL)	$1,92 \times 10^4 \text{ }^a \pm 1,54 \times 10^4$	$1,48 \times 10^4 \text{ }^a \pm 9,57 \times 10^3$	$3,92 \times 10^4 \text{ }^a \pm 9,11 \times 10^3$

a, b - notações diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,05$ .

O tipo de alimentação ou privação de água resulta numa diminuição dramática na produção de leite e num aumento na CCS. A CCS é geralmente inferior durante o Inverno e mais elevada no Verão, esta mudança corresponde a uma maior taxa de invasão de bactérias coliformes, bactérias indicadoras de contaminação, sem qualquer relação com o aumento da temperatura (Boutinaud e Jammes, 2002).

#### 4. Correlação entre a composição nutricional, CCS e identificação celular do leite de ovelha

Na tabela 14, identifica-se o efeito que o total de células somáticas, total de linfócitos, total de neutrófilos e total de macrófagos presentes nas amostras de leite de ovelha produzido nas três áreas geográficas de produção de queijos com DOP da Região Centro tem sobre os constituintes sólidos do leite (proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos e lactose) e sobre o potencial rendimento queijeiro.

Quando ocorre uma infeção bacteriana na glândula mamária (mamite), ocorrem processos inflamatórios com destruição do tecido epitelial. Esta situação vai afetar a capacidade de síntese do tecido epitelial secretor e aumentando o número de células somáticas no leite (Nasiri *et al.*, 2017).

Consultando a tabela 14, identificam-se coeficientes de correlação negativos elevados entre a CCS e os teores de proteína ( $r = -0,706$ ;  $p < 0,01$ ), gordura ( $r = -0,611$ ;  $p < 0,01$ ), ST ( $r = -0,702$ ;  $p = 0,01$ ), sólidos não gordos ( $r = -0,737$ ;  $p < 0,01$ ) e PRQ ( $r = -0,718$ ;  $p < 0,01$ ), ou seja, quanto maior for o número de CS menor vai ser o teor de proteína, gordura, ST, sólidos não gordos e rendimento queijeiro (Tabela 14).

**Tabela 14** - Tabela das correlações.

Coefficiente de correlação de Pearson \*p<0,05 \*\* p<0,01

Segundo Brito e Brito, (1998) a concentração de gordura no leite com elevada CCS tende a diminuir, devido à ação das lipases. Pirisi *et al.*, (2002), referem que a

	Proteína (%)	Gordura (%)	ST (%)	Sólidos não gordos (%)	Lactose (%)	PRQ (gMS/100 mL)	CS (CS/mL)	Linfócitos (CS/mL)	Neutrófilos (CS/mL)
Gordura (%)	0,848**								
ST (%)	0,956**	0,958**							
Sólidos não gordos (%)	0,970**	0,771**	0,920**						
Lactose (%)	-0,054	-0,241**	-0,071	0,182**					
PRQ (gMS/100 mL)	0,870**	0,937**	0,953**	0,856**	0,046				
Células Somáticas (CS/mL)	-0,706**	-0,611**	-0,702**	-0,737**	-0,212*	-0,718**			
Linfócitos (CS/mL)	-0,555**	-0,422**	-0,531**	-0,618**	-0,273**	-0,547**	0,837**		
Neutrófilos (CS/mL)	-0,766**	-0,666**	-0,756**	-0,774**	-0,096	-0,750**	0,951**	0,706**	
Macrófagos (CS/mL)	0,027	0,017	0,003	-0,029	-0,266**	-0,081	0,351**	0,297**	0,081

quantidade de células somáticas presentes no leite de ovelha está negativamente correlacionada com a lactose, proteínas do soro, proteína total, caseína solúvel, proporção de caseína / proteína total, cálcio, potássio e firmeza da coalhada. No entanto, Nasiri *et al.*, (2017) referem que o aumento de células somáticas no leite de ovelha aumenta o pH e os teores de gordura e proteína, mas diminui o teor em lactose. Em relação às proteínas do leite, Müller (2002) refere que ocorre uma redução das proteínas que são sintetizadas na glândula mamária (caseínas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) e um aumento nas proteínas de origem plasmática (soro-albumina e imunoglobulinas). De acordo com o mesmo autor, a proteína total do leite tem pouca variação, mas a concentração dos diferentes tipos de proteínas varia acentuadamente.

A elevada contagem de CS, está associada à existência de infeção no úbere provocando a diminuição da concentração de lactose no leite (Müller, 2002). A lactose é sintetizada pelo aparelho de Golgi das células epiteliais secretoras e a mamite causa danos neste tecido e altera os sistemas enzimáticos nas células secretoras, tendo como consequência a diminuição da biossíntese da lactose (Lima *et al.*, 2006). Também Villalobos *et al.*, (2015), referem que o leite de ovelha com elevada contagem de CS tem

menor teor em lactose e piores indicadores associados à coagulação do leite (tempo para coagulação e firmeza do coalho) para transformação em queijo.

Tudo isto acontece devido à destruição de parte do tecido epitelial secretor e à acumulação de leite no úbere devido à oclusão de alguns ductos da glândula mamária. A destruição do tecido epitelial secretor provoca a redução da sua capacidade de síntese e o aumento da permeabilidade dos tecidos afetados provocando a passagem para o sangue de parte da lactose e a infiltração de proteínas do plasma (Luquet, 1985). Quanto mais grave é a infecção mais a composição do leite se aproxima da composição do plasma sanguíneo. O úbere lesado comporta-se como um órgão de eliminação; diminuem as moléculas elaboradas e aumentam as moléculas filtradas. As alterações na composição do leite e a extensão do aumento da CCS estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido epitelial secretor atingido pela reação inflamatória, existindo uma correlação negativa entre a CCS e a concentração dos componentes sólidos do leite (Müller, 2002).

Analisando agora as correlações entre as diferentes células somáticas identificadas e os constituintes sólidos do leite, confirma-se que existe uma correlação negativa entre os linfócitos e o teor de proteína ( $r=-0,555$ ;  $p<0,01$ ), gordura ( $r=-0,422$ ;  $p<0,01$ ), ST ( $r=-0,531$ ;  $p<0,01$ ), sólidos não gordos ( $r=-0,618$ ;  $p<0,01$ ) e o PRQ ( $r=-0,547$ ;  $p<0,01$ ). Verifica-se que também existe uma correlação negativa entre os valores de neutrófilos e o teor de proteína ( $r=-0,766$ ;  $p<0,01$ ), gordura ( $r=-0,666$ ;  $p<0,01$ ), ST ( $r=-0,756$ ;  $p<0,01$ ), sólidos não gordos ( $r=-0,774$ ;  $p<0,01$ ) e PRQ ( $r=-0,750$ ;  $p<0,01$ ). Também se encontrou uma correlação negativa significativa entre a contagem de macrófagos e o teor de lactose ( $r=-0,266$ ;  $p<0,01$ ).

## V. Considerações finais

Foram identificadas diferenças entre a composição química das amostras de leite de ovelha (raça Serra da Estrela e cruzamentos Merino x Lacaune X Assaf) e do leite de cabra (raça Saanen). O leite de ovelha apresentou teores de proteína, gordura e sólidos totais significativamente mais elevados do que o leite de cabra. O potencial rendimento queijeiro também foi maior no leite de ovelha. Relativamente às células somáticas, identificaram-se diferenças entre os leites de ovelha e cabra. O leite de cabra apresentou sempre valores mais elevados para a contagem de células somática, bem como de linfócitos, de neutrófilos e de macrófagos.

Na composição química dos leites destinados ao fabrico dos queijos com DOP Amarelo da Beira Baixa, Rabaçal e Serra da Estrela também foram identificadas diferenças. As amostras de leite produzido na Área Geográfica de Produção do Queijo Serra da Estrela com DOP apresentaram valores mais elevados de proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos e potencial rendimento queijeiro. Pelo contrário, as amostras de leite recolhidas na área geográfica de produção do queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP apresentaram valores mais baixos de proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos, lactose e potencial rendimento queijeiro. Relativamente à quantidade de células somáticas, o leite destinado ao fabrico do Queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP apresentou valores mais elevados para o total de células somáticas, linfócitos, neutrófilos e macrófagos. Pelo contrário, o leite destinado ao fabrico de Queijo Serra da Estrela com DOP apresentou valores mais baixos para o mesmo tipo de células somáticas o que é um indicador de maior sanidade do úbere.

Ao analisarmos o efeito da época do ano sobre a composição química das amostras de leite destinadas ao fabrico do Queijo Serra da Estrela com DOP, verificámos que no Inverno o leite apresentou teores mais elevados de proteína, gordura e sólidos não gordo. No entanto, o teor de gordura e de sólidos totais do leite e o seu potencial rendimento queijeiro foi maior na Primavera. As amostras de leite destinado ao fabrico do Queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP apresentaram, no Outono, valores mais elevados de proteína, gordura, sólidos não gordos e potencial rendimento queijeiro. O leite destinado ao fabrico do Queijo Rabaçal apresentou teores mais elevados de proteína e sólidos não gordos no Outono e de gordura, sólidos totais, lactose e potencial rendimento queijeiro no Inverno.

Ao analisarmos o efeito da época do ano sobre a qualidade do leite utilizado no fabrico do Queijo Serra da Estrela com DOP, verificámos que o total de células somáticas, de linfócitos, de neutrófilos e de macrófagos apresentaram valores mais elevados na Primavera. No Inverno, com exceção dos macrófagos, os valores observados foram sempre menores. Situação semelhante ocorreu com o leite destinado ao fabrico do Queijo Amarelo da Beira Baixa com DOP que, com exceção dos macrófagos, apresentou, na Primavera, células somáticas, linfócitos e neutrófilos mais elevados. As amostras de leite destinado ao fabrico do Queijo Rabaçal com DOP apresentaram sempre valores mais baixos no Inverno e mais elevados na Primavera (células somáticas, linfócitos neutrófilos e macrófagos). Para o leite proveniente das três áreas geográficas de produção constatou-se a influência da época de produção

sobre a quantidade de células somáticas presentes no leite, menos células somáticas no Inverno e mais células somáticas na Primavera.

Identificou-se o forte contributo dos neutrófilos, dos linfócitos e menos dos macrófagos, para o aumento de células somáticas no leite de ovelha proveniente das três áreas geográficas de produção. Obteve-se uma forte correlação negativa entre as células somáticas, os linfócitos e os neutrófilos e os teores em proteína, gordura, sólidos totais, sólidos não gordos e potencial rendimento queijeiro (mais células somáticas, mais linfócitos e mais neutrófilos, menos percentagem de constituintes sólidos do leite e menor potencial rendimento queijeiro). A quantidade de macrófagos, com exceção do teor em lactose, pouco influenciou os constituintes sólidos do leite.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos concluir que a composição química do leite de ovelha utilizado para a produção de queijos da Região Centro com DOP, está fortemente influenciada, negativamente, pela quantidade de células somáticas, de linfócitos e neutrófilos presentes no leite.

Este trabalho foi o primeiro passo para a caracterização da qualidade do leite de pequenos ruminantes utilizados na produção de queijo com DOP na zona Centro, mais concretamente na quantificação e identificação celular.

## VI. Referências bibliográficas

- A.R.C.O. 2021. Lacaune. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/index.php/mn-srgo/mn-padroesraciais/35-lacaune> (Acedido em 10/04/2021).
- Alonso, L., J. Fontecha, L. Lozada, M. J. Fraga, M. Juárez. 1999. Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids. *J. Dairy Sci.* 82:878–884. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75306-3.
- ANCOSE. 2021. Bordaleira Serra da Estrela. Disponível em: [http://ancose.com/raca\\_serrana.html](http://ancose.com/raca_serrana.html) (Acedido em 10/04/2021).
- ANIDOP. 2021a. ANIDOP - Merina da Beira Baixa. Disponível em: <https://anidop.iniav.pt/index.php/racas/racas-autoctones/ovinos/merina-da-beira-baixa> (Acedido em 10/04/2021).
- ANIDOP. 2021b. ANIDOP - Assaf. Disponível em: <https://anidop.iniav.pt/index.php/racas/racas-exoticas/ovinos-exoticos/assaf> (Acedido em 11/04/2021).
- ANIDOP. 2021c. ANIDOP - Serra da Estrela. Disponível em: <https://anidop.iniav.pt/index.php/racas/racas-autoctones/ovinos/serra-da-estrela> (Acedido em 11/04/2021).
- Bannerman, D. D., A. C. W. Kauf, M. J. Paape, H. R. Springer, J. P. Goff. 2008. Comparison of Holstein and Jersey innate immune responses to *Escherichia coli* intramammary infection. *J. Dairy Sci.* 91:2225–2235. doi:10.3168/jds.2008-1013.
- Barbano, D. M., R. R. Rasmussen, J. M. Lynch. 1991. Influence of Milk Somatic Cell Count and Milk Age on Cheese Yield. *J. Dairy Sci.* 74:369–388. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78179-4.
- Barillet, F., C. Marie, M. Jacquin, G. Lagriffoul, J. M. Astruc. 2001. The French Lacaune dairy sheep breed: use in France and abroad in the last 40 years. *Livest. Prod. Sci.* 71:17–29.
- Belanger, J. 1990. Criação de Cabras. Publicações Europa-América.
- Biomed. 2021. Standardized Pappenheim staining with HemaPapp for blood smears. Disponível em: <https://www.biomed.de/en/products/staining-solutions/pappenheim-staining/> (Acedido em 20/03/2021)
- Boichard, D., N. Bouloc, G. Ricordeau, A. Piacere, F. Barillet. 1989. Genetic parameters for first lactation dairy traits in the Alpine and Saanen goat breeds. *Genet. Sel. Evol.* 21:205–215. doi:10.1186/1297-9686-21-2-205.
- Boutinaud, M., H. Jammes. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 43:133–147. doi: 10.1051/rnd:2002013.
- Brandão, I., A. M. Rodrigues. 2019. APROLEP - Leite, um alimento insubstituível. *Prod. leite.* 20:26–28.
- Brito, J. R. F., M. A. V. P. Brito. 1998. Qualidade Higienica do leite. Ministério da Agric. e do Abast. 1–18.
- Brown, K. 2021. Common Diseases in Goats. *Ext. Livest. Coord. Mississippi State Univ. Ketosis.* 1–4.
- Campbell, J. R., R. T. Marshall. 1975. The science of providing milk for man. McGraw Hill Book Company, New York.
- Capgenes. 2021. La race Saanen française - Capgenes. Disponível em: <https://www.capgenes.com/les-races-caprines/race-saanen-francaise/> (Acedido em 25/04/2021).

Cassoli, L. D. 2013. Produção de queijo: Qual a importância da qualidade do leite? Milkpoint. 3–7. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/clinica-do-leite/producao-de-queijo-qual-a-importancia-da-qualidade-do-leite-205226n.aspx> (Acedido em 27/04/2021).

CEAP. 2021. CEAP - Ovinos. Disponível em: <http://www.ceap.com.pt/ovinos.htm> (Acedido em 28/04/2021).

Cedeño, C. B., E. A. B. García, H. C. Vázquez, W. Wolter, M. A. C. Vazquez, B. Kloppert. 2012. Mastitis Caprina.

Contreras, A., D. Sierra, A. Sánchez, J. C. Corrales, J. C. Marco, M. J. Paape, C. Gonzalo. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 68:145–153. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.

DGADR. 2021a. Produtos Tradicionais Portugueses - Queijo da Beira Baixa DOP. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/97-queijos-da-beira-baixa-dop-queijo-de-castelo-branco-queijo-picante-da-beira-baixa-e-queijo-amarelo-da-beira-baixa> (Acedido em 28/03/2021).

DGADR. 2021b. Produtos Tradicionais Portugueses - Queijo Rabaçal DOP. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/92-queijo-rabacal-dop> (Acedido em 28/03/2021).

DGADR. 2021c. Produtos Tradicionais Portugueses - Queijo Serra da Estrela DOP. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/31-queijo-da-serra-da-estrela> (Acedido em 28/03/2021).

Dinheiro vivo. 2021. Tété aposta na diferença e lança iogurte de leite de cabra. Disponível: <https://www.dinheirovivo.pt/fazedores/tete-aposta-na-diferenca-e-lanca-iogurte-de-leite-de-cabra-12834891.html> (Acedido em 24/04/2021).

Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau, H. Seegers. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 36:335–337.

DRE. 1990. Portaria n.º 73/90 de 1 de Fevereiro. *Diário da República* nº 27– I Série. 436–438.

Dyce, K. M., W. O. Sack, C. J. G. Wensing. 2013. Anatomía veterinaria. 4 Edição e. Manual Moderno.

FAOSTAT. 2021. FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> (Acedido em 13/06/2021).

Fernando Vieira de Sá. 1990. A Cabra . Clássica Editora.

Ferrouillet, C., D. Bélanger. 2003. Les Mammites subliniques chez la chèvre laitière. 33:16–20.

Freitas, M. R. 2017. Produção Leiteira e Curvas de Lactação de ovelhas Assaf. Universidade de Lisboa.

González, F. H. D. 2001. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação \*. 5–21.

Gootwine, E., G. E. Pollott. 2000. Factors affecting milk production in Improved Awassi dairy ewes. *Anim. Sci.* 71:607–615. doi:10.1017/S1357729800055387.

Hunt, K. M., J. E. Williams, B. Shafii, M. K. Hunt, R. Behre, R. Ting, M. K. McGuire, M. A. McGuire. 2013. Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeed. Med.* 8:105–110. doi:10.1089/bfm.2011.0141.

Inácio, R. S., A. M. P. Gomes, J. A. Saraiva. 2020. Serra da Estrela cheese: A review. *J. Food Process. Preserv.* 44:1–10. doi:10.1111/jfpp.14412.

INE. 2021. Instituto Nacional de Estatística. Disponível em:

[https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000919&&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000919&&xlang=pt) (Acedido em 25/04/2021).

Instituto Português de Qualidade. 1981. Norma Portuguesa – NP – 572 Leite. Definição e classificação. Recolha de normas portuguesas. Leite e laticínios. Lisboa.

Jenkins, T. C., M. A. McGuire. 2006. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. Elsevier.

Jensen, D. L., R. J. Eberhart. 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 42 (5):743-7.

Jornal Oficial da União Europeia. 2006. REGULAMENTO (CE) N.º 510/2006 DO CONSELHO de 20 de Março de 2006.

Koess, C., J. Hamann. 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy Res.* 75:225-232. doi:10.1017/S0022029908003245.

Levy, L., H. Bértolo. 2012. Manual de Aleitamento Materno. Com. Port. para a UNICEF.

Lima, M. da C. G. de, M. J. de Sena, R. A. Mota, E. S. Mendes, C. C. de Almeida, R. P. P. Silva. 2006. Contagem de células somáticas e análises Físico-Químicas e Microbiológicas do leite cru tipo C produzido na região de Agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.* 73:89-95.

Luquet, F. M. 1985. O Leite - do Úbere À Fábrica de Laticínios. (F. M. Luquet, editor.). Publicações Europa-América, Mem Martins.

Ma, Y., C. Ryan, D. M. Barbano, D. M. Galton, M. A. Rudan, K. J. Boor. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 83:264-274. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74873-9.

Macrae, R., R. K. Robinson, M. Sadler. 1993. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. 1<sup>st</sup> ed. Academic Press.

Malek dos Reis, C. B., J. R. Barreiro, J. F. G. Moreno, M. A. F. Porcionato, M. V. Santos. 2011. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *J. Dairy Sci.* 94:4406-4412. doi:10.3168/jds.2010-3776.

Marques, M. R., S. Bernardino, J. M. Ribeiro, A. T. Belo, C. C. Belo. 2011. Sheep Milk: Yield, Composition and Potential Cheese Yield. *DF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk. Spec. Issue Int. Dairy Fed.* 1201. 44-46.

Martins, A., A. Belo, M. Vasconcelos, A. Fontes, E. Pereira, C. Belo. 2009. Characterisation of production system of Niza cheese (PDO): Effect of sheep breed on milk composition and coagulation properties. *Options Méditerranéennes. Séries A.* 91:221-225.

Mazal, G., P. C. B. Vianna, M. V. Santos, M. L. Gigante. 2007. Effect of somatic cell count on prato cheese composition. *J. Dairy Sci.* 90:630-636. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)71545-X.

Mendonça, Á. 2012. Guia Sanitário para criadores de pequenos ruminantes.

Menzies, P. I., S. Z. Ramanoon. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17:333-358. doi:10.1016/S0749-0720(15)30032-3.

Método interno PT.LFQ.0403- Determinação do teor de gordura, proteína, sólidos totais, extrato seco desengordurado, lactose e ureia em leite por MilkoScan. CATAA.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DESENVOLVIMENTO RURAL E PESCAS. 2007. DESPACHO 10518/2007.

Müller, E. E. 2002. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. *Anais do II Sul: Simpósio*

sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. In: . Editores G.T. dos Santos et al. UEM/CCA/DZO - NUPEL, editor. Maringá. p. 206–217.

Nasiri, M., H. Ezzatpanah, S. Jahanfari, A. Sharifi. 2017. Effect of somatic cell count on physicochemical properties of Shal breed Ewe milk Mina. In: Journal of Food Processing & Technology. Vol. 08. Paris, France.

Oliveira, C. M. C., M. G. S. Sousa, N. da Silva e Silva, C. L. Mendonça, J. A. S. Silveira, R. P. Oaigen, S. J. T. Andrade, J. D. Barbosa. 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesqui. Vet. Bras.* 31:104–110. doi:10.1590/S0100-736X2011000200002.

Paape, M. J., B. Poutrel, A. Contreras, J. C. Marco, A. V Capuco. 2001. Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. *J. Dairy Sci.* 84:E237–E244. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)70223-8.

Paape, M. J., W. P. Wergin, A. J. Guidry, R. E. Pearson. 1979. Leukocytes–Second Line of Defense Against Invading Mastitis Pathogens. *J. Dairy Sci.* 62:135–153. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83215-4.

Paape, M. J., G. R. Wiggans, D. D. Bannerman, D. L. Thomas, A. H. Sanders, A. Contreras, P. Moroni, R. H. Miller. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rumin. Res.* 68:114–125. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.014.

Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, C. Burvenich. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7:109–121. doi:10.1023/A:1020343717817.

Paolo, F., S. Andrea, M. Massimo, M. Primo. 2008. Cheese yield: factors of variation and predictive formulas. A review focused particularly on grana type cheeses. *Ann. della Fac. di Med. Vet. Univ. di Parma.* 28:211–232.

Park, Y., G. F. W. Haenlein, W. L. Wendorf. 2017. Handbook of milk of non-bovine mammals. 2nd ed. John Wiley & Sons, New Delhi, India.

Parlamento Europeu. 2004. Regulamento (CE) N° 853/2004.

Parque Biológico de Gaia. 2021. Parque Biológico de Gaia - Ovelha. Disponível em: <https://parquebiologico.pt/animais-plantas/fauna/mamiferos/item/ovelha> (Acedido em 24/04/2021).

Paula, M. C. de, N. P. Ribas, H. G. Monardes, J. E. Arce, U. V. C. de Andrade. 2004. Contagem de células somáticas em amostras de leite. *Rev. Bras. Zootec.* 33:1303–1308. doi:10.1590/s1516-35982004000500023.

Peter J. Van Soest. 1987. Nutritional Ecology of the Ruminant - Peter J. Van Soest - Google Livros. 2 nd. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Pineda, J. M. S. Y. 1980. Indústrias lácteas. 5a Edição. Biblioteca Técnica Litexa, Lisboa.

Pirisi, A., G. Piredda, M. Corona, S. P. M. Pes, A. Ledda. 2002. Influence of Somatic Cell Count on Ewe'S Milk Composition, Cheese Yeld and Cheese Quality.

Podhorecká, K., M. Borková, M. Šulc, R. Seydlová, H. Dragounová, M. Švejcarová, J. Peroutková, O. Elich. 2021. Somatic Cell Count in Goat Milk: An Indirect Quality Indicator. *Foods.* 10:1046. doi:10.3390/foods10051046.

Prescot, S.C & Breed, R. S. 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* 632–640.

Produtos Tradicionais Portugueses. 2001. Produtos Tradicionais Portugueses - Borrego da Beira IGP. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/carne/carne-de-ovino/539-borrego-da-beira>

igp (Acedido em 02/04/2021).

Queiroga, M. C., M. E. Potes, E. M. Duarte, A. A. M. Marinho, C. M. Bettencourt, C. A. P. Matos, C. C. Belo, J. M. Ribeiro, C. L. Vilela. 2007. Unidade de estudos de mastites em pequenos ruminantes – estudos em ovinos de regime extensivo. *Rev. Ciências Agrárias*. 30.

Raynal-Ljutovac, K., G. Lagriffoul, P. Paccard, I. Guillet, Y. Chilliard. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rumin. Res.* 79:57–72. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.07.009.

Regulamento. 2006. Regulamento (CE) N. 1662/2006 da Comissão de 6 de Novembro de 2006. *J. Of. da União Eur.*

Ribeiro Júnior, E., M. H. Silva, S. A. D. A. Viegas, E. J. Ramalho, M. D. Ribeiro, F. C. S. de Oliveira. 2008. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 9:680–686.

Rummel, T., A. V. Zárate, E. Gootwine. 2005. The Worldwide Gene Flow of the Improved Awassi and Assaf Sheep Breeds. *Grauer*.

Rupp, R., F. Beaudeau, D. Boichard. 2000. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. *Prev. Vet. Med.* 46:99–111. doi:10.1016/S0167-5877(00)00142-2.

Sarikaya, H. 2006. Somatic cell populations in milk : Importance in mammary gland physiology and behaviour during technological processes. 79.

Schlimme, E., D. Martin, H. Meisel. 2000. Nucleosides and nucleotides : natural bioactive substances in milk and colostrum. S59–S68. doi:https://doi.org/10.1017/S0007114500002269.

Schroeder, J. W. 1997. Bovine Mastitis and Milking Management. *NDSU extension*. 1–12.

Sharma, N., N. K. Singh, M. S. Bhadwal. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 24:429–438. doi:10.5713/ajas.2011.10233.

Teixeira, P., C. Ribeiro, J. Simões. 2008. Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros.

Tizard, I. R. 2018. *Veterinary Immunology*. 10<sup>th</sup> ed. Elsevier, Texas.

USPHS/FDA. 2017. Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance (PMO). U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Public Heal. Serv. Food Drug Adm. 1–426.

Villalobos, J. C., A. I. G. Sigler, B. Oliete, R. A. Sánchez, L. Jiménez, N. N. Sánchez, A. L. Martínez Marín. 2015. Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe’s milk. *Mljekarstvo*. 65:138–143. doi:10.15567/mljekarstvo.2015.0208.

De Vlieghe, S., L. K. Fox, S. Piepers, S. McDougall, H. W. Barkema. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95:1025–1040. doi:10.3168/jds.2010-4074.