



Efeito da refrigeração em leite de ovelha – evolução da flora microbiana e efeito na aptidão tecnológica para queijo

João Miguel da Silva Ramos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Professor Doutor António Pedro Louro

Co-orientador: Professora Doutora Luísa Brito

Júri:

Presidente: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Marília Catarina Leal Fazereres Ferreira, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Teresa de Jesus Silva Matos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

*A todos que tornaram o meu
mundo um pouco melhor*

AGRADECIMENTOS

Concluída a Dissertação de Mestrado quero aqui expressar o meu agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste:

Ao Professor Doutor Pedro Louro por ter aceite ser meu orientador, pela incansável disponibilidade e pela importantíssima ajuda que me deu durante toda a realização.

À Professora Doutora Luísa Brito por ter aceite ser minha co-orientadora, mostrando-se sempre disponível para me ajudar.

À D. Lena, D. Manuela e à Isabel pela ajuda, apoio, simpatia e amizade que sempre demonstraram.

A todos os professores que partilharam comigo seus conhecimentos.

A todos os meus colegas de curso e de faculdade que tornaram esta estadia no ISA, uma experiência única e inesquecível.

A todos os meus amigos da AgriculTUNA, pelas noites memoráveis passadas a cantar e não só, muito me ajudaram a crescer e aprender o que é ser tuno.

A todos os meus amigos do Judo, que sempre me motivaram e ensinaram a querer superar-me.

A todos os meus amigos dos escuteiros, em especial ao Agrupamento 597-Tires, que me proporcionaram uma formação integral. Momentos únicos à volta de uma fogueira, à noite em campo ou de mochila às costas, tornam a ver-me ultrapassar mais uma fase da vida e começar outra, sempre com um olhar no horizonte e convosco no meu coração, pois “Um amigo é um bem, é Um tesouro que se tem”.

Aos meus amigos mais chegados, Ricardo, Liliana, Diogo, Gonçalo, Arcanjo, Rita do Adro, Rita Santos, Clara, Bruno Bento, Chefito, Pedro, Maria João, Inês, Francisco, Pequito e David, por tudo, partilhas, gargalhadas, lágrimas, viagens, noitadas, o meu muito obrigado.

À Diana, minha melhor amiga, confidente e namorada, por todo apoio e felicidade que me deu, por me ter tornado uma pessoa melhor.

Um especial obrigado à minha família, mãe, pai, irmão, avós, tios e primos por terem estado sempre lá para mim e que sem eles nada era possível.

A todos um muito obrigado, por me terem ajudado a crescer como pessoa e como futuro profissional.

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito da refrigeração no leite de ovelha. Após caracterização inicial, o leite cru de ovelha foi refrigerado a 4 °C e a 8 °C durante sete dias, ao longo dos quais foi estudada a evolução da população microbiana (mesófila total (ISO/DIS 6610) e psicrotrófica (ISO/DIS 8552)), do pH e da aptidão à coagulação, através de ensaios de coagulação com o Optigraph. Ao fim de três dias de refrigeração, registaram-se aumentos nos valores das contagens de mesófilos de 10 e 52 vezes e de 15 e 87 vezes nos valores dos psicrotróficos, a 4 °C e a 8 °C, respectivamente. O pH diminuiu significativamente ao longo da refrigeração, sobretudo a 8 °C e a partir do 2º dia, o que influenciou significativamente o início da agregação micelar. A refrigeração a 4 °C não apresentou efeito significativo na aptidão à coagulação e permitiu controlar a evolução das populações microbianas (psicrotróficas particularmente) por um período de 48 horas.

Os resultados apresentados reforçam a convicção de que quando a refrigeração é feita a temperaturas e tempos de armazenagem inadequados, poderão ser seleccionadas populações de bactérias psicrotróficas que poderão afectar negativamente o fabrico de queijo com leite cru.

Palavras-chave: Leite cru de ovelha, queijo de ovelha, refrigeração, psicrotróficos, aptidão à coagulação

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of the cooling on ewe's milk. After an initial characterization, the raw milk was refrigerated at 4 °C and 8 °C for seven days, through what was studied the evolution of the microbial population (total mesophilic (ISO/DIS 6610) and psychrotrophic (ISO/ IS 8552)), pH and the ability to coagulation, through clotting tests with the Optigraph. After three days of cooling, there were increases in the population of mesophiles, 10 and 52, and 15 and 87 times the values of psychrotrophic, at 4 °C and 8 °C, respectively. The pH decreased very significantly along the cooling, especially at 8 °C and from 2nd day, which influenced the start of the micellar aggregation. The cooling at 4 °C showed no significant effect on the ability to clotting and allowed the control of development of microbial populations (particularly the psychrotrophic population) for a period of 48 hours.

The results presented in this study reinforce the belief that when the cooling is at inadequate temperatures and storage times, microbial populations can be selected favoring psychrotrophic bacteria that may have a negative effect on manufacture of the cheese from raw milk.

Key words: raw ewe's milk, ewe's cheese, cooling, psychrotrophic, the ability to clotting

EXTENDED ABSTRACT

Much of the ewe's milk produced worldwide is used in the production of cheese. In Portugal, you can say that the whole ewe's milk produced is used in the manufacture of cheese. With the gradual increase in the volume of milk processed in the manufacture of traditional cheese, it is necessary the integration of technologies elements of industry, in order to keep up the volume of production while preserving a traditional production system. In cheese PDO (Protected Designation of Origin) this need is even more evident. This study was aimed to investigate the effect of cooling on ewe's milk. It was used milk from a manufactures from the area of production of cheese from Azeitão. The samples of milk were collected weekly for a period of 13 weeks. After initial characterization (pH, acidity, density, fat, crude protein, total nitrogen, dry weight, fat-free dry, density), the milk was refrigerated at 4 °C and 8 °C for seven days. At one, two, three and seven days of cooling, were studied the effect of storage conditions of ewe's milk in the evolution of the microbial population through the evolution of the microbial population mesophilic (ISO/DIS 6610), as well as the development of the population psychrotrophic (ISO/DIS 8552). This last group of microorganisms is probably the major problems creator in the production of cheese from raw milk. To better understand the evolution of the milk was also determined the pH. To assess the technological meaning of the microbial level, tests at the beginning of and during the storage was used the test of milk-fermentation. Optigraph was the equipment that we appealed to assess the suitability of milk to coagulation with parameters R, AR, A2R, A₂₀, A₄₀ and 0K20, it was used two types of rennet, a *standard*, to be possible a comparison with results previously obtained by other authors and a rennet obtained from the thistle, which is used in the traditional manufacture of cheese, in order to approach the conditions of study to real manufacturing conditions. The milk was considered within the physical and chemical parameters for ewe's milk listed in the bibliography, although some parameters were closer to ewe from high-production, which normally are not used in the manufacture of traditional cheese. The cooling effect was significant (P <0.05) only on the startup of clotting, on the other hand had no effect on any of the other parameters of coagulation. The cooling effect was a highly significant (P <0.01) on the pH. As the pH is a highly important at the startup of clotting, may explain the fact that the effect of cooling has only recorded at the startup of clotting and other parameters such is curd firmness, was not affected. In the case of rennet extract of thistle, the effect of cooling was more significant (P <0.01) at the startup of coagulation and became significant (P <0.05) for the speed of micellar aggregation. As the clotting occurs later, were more certain parameters to assist in assessing the ability to clot, such as A₃₀, A₅₀, A₆₀, A₉₀. There was, in almost all situations, the influence of factors especially at the enzymatic phase of the clotting, but this effect is extended to the phase of micellar aggregation depending on the time of

manufacture. As was expected the cooling effect was a highly significant ($P < 0.01$) in the evolution of the microbial population, so much mesophilic as psychrotrophic, although it was higher in psychrotrophic. After three days of cooling, there were increases in the values of the counts of mesophiles, 10 and 52 times, and 15 and 87 times the values of psychrotrophic, at 4 °C and 8 °C, respectively. Based on the results of the test of milk-fermentation, were able to verify that the prolonged cooling, especially at 4 °C, is likely the cause of change in the type of dominant microbial flora in the sense of enrichment in flora not acidifier and 8 °C the same has not been as frequent but more the increase in proteolysis in the end of seven days.

In short, it was noted the decrease in pH during the cooling due to changes in the microbial flora acidifier mesophilic and also because of lactic bacteria psychrotrophic. This decline was more pronounced at 8 °C than at 4 °C, showing that you can refrigerate the milk to 4 °C up to three days without significant changes, in contrast to three days to 8 °C, the pH is below the recommended in the bibliography for the manufacture of cheese (6,50). The start of clotting decreased, i.e., the clotting occurred earlier, which is in a way contrary to what is referred in the bibliography, as the cold tends to decrease the size of micelle and solubilize calcium, making the micelles more stable, making it difficult to clotting. A population of more than 10^8 CFU/mL of psychrotrophic can also help reduce the size of the micelle by proteolysis that can selectively record level of α - and β casein, leaving the κ -casein most vulnerable to rennet. The change in pH might have countered the negative effects of cooling in the behavior of the milk in face to coagulation.

Key words: raw ewe's milk, ewe's cheese, cooling, psychrotrophic, the ability to clotting

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
EXTENDED ABSTRACT	VII
ÍNDICE	IX
Índice de Quadros	XI
Índice de Figuras	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leite de Ovelha	2
1.2. Aptidão tecnológica do leite – Coagulação	5
1.3. Refrigeração	7
1.3.1. Efeito a nível físico-químico	9
1.3.2. Efeito a nível da microbiologia no leite	11
1.4. Objectivos do presente estudo	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Breve descrição da Queijaria	20
2.2. Recolha e preparação das amostras.	20
2.3. Análises físico-químicas	21
2.4. Análises microbiológicas	25
2.5. Registo e análise estatística dos resultados	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1. Composição do leite.	26
3.1. Efeito da refrigeração na aptidão do leite para a coagulação.	27
3.1.1. Coagulação com coalho standard (quimosina)	29
3.1.2. Coagulação com extracto de cardo	35
3.2. Efeito da refrigeração na evolução da população microbiana.	39
5. CONCLUSÕES	47
6. BIBLIOGRAFIA	49
6.1. Cibergrafia	65
7. ANEXOS	67

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I – Produção mundial de leite em 2007.	2
Quadro II – Produção portuguesa de leite em 2007.	3
Quadro III – Composição global de diferentes leites (%).	3
Quadro IV – Composição média do leite usado neste estudo.	26
Quadro V – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados.	29
Quadro VI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – R e 0k20.	30
Quadro VII – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – A20 e A40.	31
Quadro VIII – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – AR e A2R.	32
Quadro IX – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados – pH, R, AR, A2R e 0K20.	34
Quadro X – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados – A ₂₀ , A ₃₀ , A ₄₀ , A ₅₀ , A ₆₀ e A ₉₀ .	35
Quadro XI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – R e 0K20.	35
Quadro XII – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – AR e A2R.	37
Quadro XIII – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – A ₂₀ , A ₃₀ e A ₄₀ .	38
Quadro XIV – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – A ₅₀ , A ₆₀ e A ₉₀ .	38
Quadro XV – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados.	40
Quadro XVI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nas contagens de psicrotróficos a 21 °C e de mesofilos totais a 30 °C.	41
Quadro XVII – Quadro-resumo do nº de ensaios que ultrapassam as 500 000 UFC/mL e respectivas percentagens.	43
Quadro XVIII – Resumo dos resultados do teste de lactofermentação.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Foto-resumo para exemplo de resultados do teste da lactofermentação, original (a) e editada (b).	22
Figura 2 – Exemplo de produção de gás (a) e de proteólise (b).	22
Figura 3 – Representação gráfica de alguns parâmetros avaliados através do optigraph (adaptado de Mahaut <i>et al.</i> (2000), por Martins <i>et al</i> (2007)).	23
Figura 4 – Evolução do pH e do R ao longo do tempo de refrigeração para as duas temperaturas.	30
Figura 5 – Evolução de A20 e A40 durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.	31
Figura 6 – Evolução do AR e do A2R durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.	32
Figura 7 – Evolução de 0k20 durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.	33
Figura 8 – Evolução do pH e do R durante a refrigeração para as duas temperaturas.	36
Figura 9 – Evolução do 0k20 durante a refrigeração para as duas temperaturas.	36
Figura 10 – Evolução de AR e A2R ao longo do tempo de refrigeração para as duas temperaturas.	37
Figura 11 – Evolução da consistência do gel durante a coagulação de leite com 1, 2, 3 e 7 dias de refrigeração, para as duas temperaturas de refrigeração, a, b, c e d respectivamente.	39
Figura 12 – Evolução da população mesófila e da população psicotrófica ao longo do tempo de refrigeração, para as duas temperaturas.	42
Figura 13 – Contagens iniciais de psicotróficos e mesófilos, ao longo do estudo (E – ensaio).	43
Figura 14 – Exemplo de um teste de lactofermentação.	45

1. INTRODUÇÃO

A grande parte do leite de ovelha produzido mundialmente destina-se à produção de queijo (Schoenian, 2006, consultado a 09/10/08). É possível afirmar que, em Portugal, a totalidade de leite de ovelha produzido é utilizado no fabrico de queijo (Martins *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007). O fabrico de queijo é, na sua essência, um processo de conservação dos componentes do leite, um produto alimentar facilmente perecível, por períodos mais ou menos longos. A maior ou menor alteração, utilizando diferentes meios de conservação, como a desidratação, a acidificação ou a diminuição do pH, são aspectos que compõem, no seu conjunto, aquilo que se designa por tecnologia de fabrico de queijo (Martins e Vasconcelos, 2004).

Com o aumento progressivo do volume de leite transformado torna-se necessário garantir a subsistência económica, mantendo a qualidade requerida pelo consumidor e as características próprias dos produtos. No fabrico de queijo tradicional ou nas DOP (Denominação de Origem Protegida), esta necessidade é ainda maior, tendo sido necessária, ao longo do tempo, a incorporação de elementos das tecnologias industriais, de forma a acompanhar o aumento de volume de produção, mantendo no entanto, uma produção próxima do tradicional (Martins e Vasconcelos, 2001).

A refrigeração do leite, logo a seguir á ordenha, durante o transporte e, por vezes, na queijaria, é um dos elementos que faz parte das tecnologias industriais e que foi incorporado no fabrico tradicional de queijo. A refrigeração do leite tornou possível um aumento dos níveis de produção de queijo, nem sempre acompanhado dos níveis de qualidade do queijo desejados, embora em muitos casos se tenha considerado uma adaptação dos métodos de trabalho tradicionais.

A refrigeração do leite é já uma prática habitual e até imprescindível na produção de leite para consumo e na produção de queijo de leite de vaca. A utilização da refrigeração logo a seguir à ordenha ajuda a controlar a microflora mesófila, mas pode trazer novos problemas, como por exemplo o desenvolvimento da flora psicrotrofica (Čanigová, 1998; Čanigová *et al.*, 2002; Hadbavný *et al.*, 2002; Ondrašovič *et al.*, 2002)

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final dos produtos lácteos. Quando é refrigerado, leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, devido à presença de bactérias psicrotóficas formadoras ou não de esporos, as quais, apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases), que rapidamente alteram o produto (Bishop e White, 1988;

Craven e Macaulley, 1993). O termo psicrotrófico surgiu no Seminário da Federação Internacional de Lacticínios (F.I.L., 1968), o qual engloba todos os microrganismos cujo óptimo de temperatura ocorre a cerca de 8 °C, podendo adaptar-se à gama dos mesófilos¹ (até ±28 °C) (Witter, 1961; Law, 1979; Cousin, 1982; Veisseyer, 1988; Cromie, 1992). Em Outubro de 1976, num encontro da International Dairy Federation, os psicrotróficos ficaram definidos como microrganismos que podem crescer a 7 °C ou menos, independentemente da sua temperatura óptima (Collins, 1981).

1.1.LEITE DE OVELHA

Não se conhece a origem exacta da primeira utilização da ovelha na produção leiteira, mas sabe-se que acompanhou o desenvolvimento da civilização mediterrânica. O *Antigo Testamento*, a *Ilíada*, a *Odisseia*, as *Bucólicas*, mencionam ou narram o pastoreio de ovelhas nos tempos de então (Luquet, 1985). Apesar de diminuta a nível mundial (Quadro I), a tradição herdada da tradição mediterrânica da produção de leite de ovelha nota-se também em Portugal (Quadro II), onde a proporção face ao total de leite produzido (cerca de 4,7% em 2007) suplanta a proporção que se verifica a nível da produção mundial (cerca de 1,5%).

Quadro I – Produção mundial de leite em 2007.

Espécie	Toneladas (milhões)	%
Vaca	541,34	83,89
Bufalo	82,50	12,78
Cabra	14,53	2,25
Ovelha	9,15	1,42
Camelo	1,48	0,23
<u>Total</u>	<u>645,33</u>	<u>100</u>

Fonte: FAO 2008

¹ **Mesófilos** – microrganismos com óptimo de crescimento 30 - 45 °C.

Quadro II – Produção portuguesa de leite em 2007.

Espécie	Toneladas(milhões)	%	% Mundo
Vaca	1,92	93,92	0,298
Ovelha	0,10	4,69	0,015
Cabra	0,03	1,39	0,004
Total	<u>2,05</u>	<u>100,00</u>	<u>0,318</u>

Fonte: FAO 2008

De acordo com uma das primeiras tentativas no nosso País para definir e caracterizar o leite de ovelha, o prNP 3547 (1987) – “Leite cru de ovelha. Definição e características”, dá-se o nome de leite cru de ovelha ao líquido segregado pelas glândulas mamárias de uma ou várias ovelhas sadias, não fatigadas, mantidas em boas condições alimentares e de higiene, obtido com asseio numa ou mais ordenhas, completas e ininterruptas, livre de substâncias estranhas, isento de colostro e que não tenha sofrido qualquer tratamento térmico.

O leite de ovelha distingue-se dos leites de vaca e de cabra, quanto ao sistema micelar, o equilíbrio salino ou comportamento na coagulação (Storry *et al.*, 1983; Ono *et al.*, 1989; Remeuf *et al.*, 1989; Pellegrini *et al.*, 1994), essencialmente relacionados com a sua composição (Quadro III).

Quadro III – Composição global de diferentes leites (%).

Leite	EST	Proteína	Caseínas	Matéria Gorda	Lactose
Vaca	13,0	3,2	2,8	3,9	4,9
Ovelha	18,4	5,5	4,5	7,2	4,7
Cabra	13,0	3,5	2,6	4,2	4,4 - 4,7

(EST: Extracto Seco Total)

Fonte: Mahaut *et al.*, 2000ab

O leite de ovelha é altamente nutritivo, contém maiores teores em vitaminas A, B e E, e em cálcio, fósforo, potássio e magnésio do que o leite de vaca. Contém ainda maior quantidade de ácidos gordos de cadeia curta e média que o leite de vaca, o que apresenta conhecidos benefícios para a saúde do consumidor. Segundo Schoenian (2006, consultado a 09/10/08), o leite de ovelha pode ser congelado sem que se alterem as suas qualidades queijeiras.

O queijo é um produto alimentar resultante da transformação do leite, numa massa semi-sólida, que convenientemente trabalhada, pode ser consumida em fresco, depois de curada ou no estado fundido (Rebelo, 1983).

Não se conhece ao certo a data do início da indústria queijeira, mas é considerada por Rebelo (1983) como “uma das maiores, mais remotas e úteis conquistas do Homem”, pois durante séculos foi a única forma de conservação dos principais constituintes do leite. Embora haja vestígios do fabrico de queijo pelo Homem pré-histórico, a referência escrita mais antiga parece ser a que Samuel fez na *Bíblia*, cerca de 3000 AC.

Como já foi referido, grande parte do leite de ovelha produzido mundialmente destina-se à produção de queijo, facto que se justifica quer pela tradição que acompanha a produção deste tipo de leite, quer pela sua especial aptidão para esse fim. A aptidão queijeira de um leite identifica a sua particular adequação para ser coagulado, por via enzimática ou ácida, para o tratamento da coalhada e para o crescimento de todos os microrganismos importantes nos processos da elaboração e maturação do queijo (Spreer, 1991).

A viscosidade do leite de ovelha é maior devido à sua riqueza em sólidos e as suas qualidades queijeiras promovem um rendimento queijeiro² duas vezes superior ao leite de vaca. Tem uma capacidade anti-bacteriana mais evidenciada que o leite de vaca devido à sua actividade imunológica característica. Sendo o leite de ovelha duas vezes mais mineralizado que o leite de vaca apresenta um maior poder tampão, o que pode ser uma vantagem para a sua conservação, visto ser mais resistente à fermentação láctica, mas, quando se tratar da sua transformação, pode apresentar limitações. A coalhada formada a partir do leite de ovelha é muito mais firme que a obtida de leite de vaca (Luquet, 1985), em sequência das diferenças de composição ao nível da riqueza em matéria coagulável, essencialmente proteína e matéria gorda, e também devido à composição e características da fracção proteica, mais precisamente a fracção caseínica, mais determinante no fabrico de queijo.

² **Rendimento queijeiro** – quantidade de queijo produzido por litro de leite

Os produtos queijeiros derivados do leite de ovelha não têm, geralmente, sabores amargos, característica que está relacionada com baixa concentração de caseína α_s em relação às caseínas totais (Luquet, 1985).

1.2. APTIDÃO TECNOLÓGICA DO LEITE – COAGULAÇÃO

De acordo com Vieira de Sá e Barbosa (1990), a coagulação é um fenómeno pelo qual a caseína se separa dos restantes constituintes do leite, dando origem, por um lado, a um corpo sólido, a que se chama primeiro coalhada e depois queijo; e, por outro lado, a um líquido, a que se chama soro, contendo este ainda em suspensão algumas substâncias sólidas. A coagulação é o fenómeno central do fabrico de queijo.

As micelas de caseína podem flocular de duas formas, por abaixamento do valor do pH, chamada de coagulação por acidificação, ou por acção enzimática, designada por coagulação enzimática.

A coagulação por acidificação é caracterizada pela obtenção de uma coalhada frágil e pouco resistente mecanicamente, com elasticidade e plasticidade praticamente nulas (Eck, 1987; Mahaut *et al.*, 2000; Alves, 2003). Devido a estas características, tem aplicação própria no que se refere ao fabrico de queijo. A coagulação enzimática é talvez a técnica de coagulação mais usada para o fabrico de queijo, dando origem a uma coalhada coesa impermeável, contráctil e maleável (Mahaut *et al.*, 2000). Ocorre em duas fases: fase enzimática ou primária e fase de coagulação ou secundária (Eck, 1987).

A fase enzimática é caracterizada pela hidrólise da caseína κ , estabilizadora das micelas de caseína, provocada pelas enzimas proteolíticas – quimosina, pepsina, proteinases de origem vegetal e de origem microbiana. Esta hidrólise ocorre na ligação Fen105 – Met106, e divide a caseína κ em paracaseína κ (1-105) e caseinomacropéptido (CMP) ou glicomacropéptido (GMP) (106-169). Após a hidrólise, o CMP (hidrófilo e ácido) é libertado para o soro, enquanto a paracaseína κ (hidrófoba³ e básica) permanece nas micelas (Dalglish, 1999).

A fase da coagulação ocorre devido às diferenças estruturais entre a caseína κ e a paracaseína κ que, não contendo propriedades estabilizadoras, permite a floculação das micelas. Com a libertação do CMP no soro, ocorre uma diminuição das forças de repulsão

³ **Hidrófoba** – Repele água e outras moléculas polares.

electrostática e do grau de hidratação responsáveis pela estabilidade micelar. Com o aumento da instabilidade ocorrem ligações intramicelares, com participação do cálcio iónico, começando assim a agregação micelar ou coagulação. As ligações intramicelares são hidrófobas, electrostáticas e salinas (Eck, 1987; Dalgleish, 1999; Mahaut *et al.*, 2000).

Apesar de serem apresentadas de forma sequencial, as fases da coagulação vão ocorrendo em simultâneo, isto é, a segunda fase pode começar sem que a primeira fase tenha ainda terminado. A coagulação tem início logo que haja uma proporção relativamente elevada de caseína κ hidrolisada (Eck, 1987; Dalgleish, 1999; Mahaut *et al.*, 2000).

A coagulação pode ser afectada por vários factores. A fase enzimática é mais susceptível à natureza e quantidade da enzima, à temperatura, ao pH e ao substrato (tipo de caseína κ), factores estes associados à actividade enzimática (McMahon e Brown, 1984; Dalgleish, 1999). A fase da coagulação é influenciada pela concentração de Ca^{2+} em solução e pela temperatura. Aparentemente o pH não tem muita influência nesta fase (Dalgleish, 1993). Afectando a estabilidade e o equilíbrio caseínico, a refrigeração é um dos factores importantes no que se refere ao comportamento do leite na coagulação e isso tem sido estudado em particular no caso do leite de vaca. Os estudos relativos ao efeito da refrigeração na coagulação do leite de ovelha são praticamente inexistentes, atribuindo-se a este tipo de leite uma maior resistência aos efeitos da refrigeração (Raynal e Remeuf, 2000). Este é um dos aspectos que serão estudados neste trabalho.

A aptidão tecnológica do leite para o fabrico de queijo pode ser avaliada pelo comportamento durante a fase de coagulação, mediante o acompanhamento de parâmetros como o início da floculação, tempo de coagulação e tempo de endurecimento (ou consolidação). O início da floculação corresponde ao intervalo de tempo compreendido entre a adição do agente coagulante e o surgimento dos primeiros flocos, correspondendo essencialmente à fase enzimática do processo de coagulação. O tempo de coagulação equivale ao tempo que medeia entre a adição de coagulante e o corte do coágulo no processo de fabrico de queijo; é um parâmetro largamente utilizado na prática queijeira e que marca o início das fases subsequentes do fabrico de queijo. Por último, o tempo de endurecimento é descrito como sendo o período de aumento de firmeza do coágulo, correspondendo ao inverso da velocidade de reorganização do gel (velocidade de agregação ou aglomeração micelar); é o tempo que separa o início da floculação do tempo de coagulação. Existem diversos tipos de métodos laboratoriais para caracterizar a coagulação: físicos (reológicos, ultrasónicos, ópticos), químicos ou térmicos (Mahaut *et al.*, 2000).

1.3. REFRIGERAÇÃO

A refrigeração tem como objectivo conservar as qualidades iniciais dos produtos alimentares, neste caso específico, do leite, até à sua posterior utilização. Não se pode esperar uma melhoria da qualidade de um leite refrigerado. Isto é, a má qualidade microbiológica não será melhorada pela refrigeração, apenas se impede o seu agravamento.

A implementação da refrigeração trouxe vantagens para o produtor de leite e para a indústria queijeira, nomeadamente a nível logístico. Para o produtor, possibilitou o espaçamento da recolha do leite, sem compromisso de coordenação com a ordenha, e permitiu poupar numa operação cara e frequentemente fonte de contaminação do leite, maximizando as levas de leite para a indústria (Alais, 1985; Ribeiro e Carvalho, consultado a 09/10/08). Ao possibilitar a melhoria da qualidade do leite, a refrigeração aumentou o preço do leite pago ao produtor. Para a indústria, a refrigeração possibilitou a ampliação dos horários de recepção do leite e a melhoria da qualidade e aumento da validade dos seus produtos (Ribeiro e Carvalho, consultado a 09/10/08). Embora para muitos produtores, a utilização de tanques de refrigeração na exploração seja factor de modernização e progresso, muitos outros não obtiveram os mesmos resultados. A causa desse fracasso reside numa deficiente limpeza e desinfecção dos tanques e a incorrecta utilização do sistema de frio (Alais, 1985).

Uma refrigeração eficaz garante a manutenção do nível de qualidade higiénica, pois limita o desenvolvimento dos microrganismos até o processamento do leite (Weatherup *et al.*, 1988). Contudo, quando a refrigeração se associa a tempos de armazenagem prolongados, surgem novos problemas higiénicos, devido à selecção de uma flora psicrotrófica que poderá passar a constituir a flora dominante (Miranda e Gripon, 1986). Devido ao seu desenvolvimento e actividade metabólica a baixas temperaturas de refrigeração, estes microrganismos virão a ter fortes implicações na qualidade dos produtos lácteos (Gripon, 1983).

Estas implicações da refrigeração podem ser importantes, sendo de referir, por exemplo, a instabilidade dos leites de consumo tratados pelo calor, de conservação longa, que motivaram inclusivamente práticas novas na grande indústria do leite de vaca, como a termização.

Ao nível da produção tradicional de queijo, com base essencialmente em leite de ovelha, a utilização da refrigeração surge bem mais recentemente com o mesmo tipo de finalidades, procurando racionalizar e rentabilizar uma actividade tecnologicamente pouco desenvolvida

sofrendo grandes pressões a nível da procura dos produtos, de grande qualidade, verificando-se, ao longo dos últimos anos, grandes modificações ao nível da estrutura produtiva, quer de leite quer de queijo (Martins e Vasconcelos, 1993; Martins *et al.*, 2000). Verificando-se que a esta evolução vem estando associada uma degradação da qualidade do produto final, sobretudo visível no queijo mais sensível, o queijo de pasta mole, mais dependente dos factores da produção animal (raça, sistema de exploração e respectivos reflexos nas características do leite) e dos factores tecnológicos, entre os quais se situa a refrigeração (Martins e Vasconcelos, 2001 e 2004, Martins *et al.*, 2007).

Dias (1998) faz igualmente referência a problemas novos derivados da introdução de novas tecnologias ao serviço da produção de queijos artesanais, nomeadamente a partir de leite cru refrigerado, como:

- Maior tempo de coagulação do leite, coalhada menos firme e mais hidratada;
- Maiores perdas de coalhada pelo soro após dessoramento, diminuindo o rendimento. Enquanto o leite normal apresenta um rendimento em queijo fresco de 16% (massa/volume), o queijo fabricado com leite refrigerado apresenta um rendimento de 12%;
- Formação prematura da casca do queijo, associada a uma produção muito menor de reima⁴. Em alguns casos extremos, verificou-se a rotura da casca de queijos com algum tempo de cura, libertando uma grande quantidade de água do seu interior;
- Textura grosseira da massa após duas e três semanas de cura, contrastando com o “amanteigado” do queijo normal. Existe, no entanto, a formação de uma camada fina entre a casca e a massa com textura amanteigada, mas de sabor extremamente amargo, ácido e aroma muito activo.

Segundo Martins e Vasconcelos (2004), estes problemas não têm uma origem única mas resultam de uma cadeia de causas e de práticas que culminam num produto de características pouco apropriadas ao tipo de maturação que vai sofrer, e ao longo da qual se associam deficiências a nível microbiano que conduzem à alteração das características típicas do queijo e frequentemente ao aparecimento de defeitos da crosta e da pasta que muitas vezes dificultam e até inviabilizam a sua comercialização.

A relação entre a utilização da refrigeração e alguns dos problemas mencionados, associada ao escasso conhecimento relativo especificamente ao efeito sobre o leite de ovelha, justifica o tema deste trabalho, abrangendo duas vertentes importantes desse efeito.

⁴ **Reima** – Substância viscosa à superfície do queijo.

1.3.1. EFEITO A NÍVEL FÍSICO-QUÍMICO

A utilização da refrigeração tem implicações tanto a nível microbiológico como a nível físico-químico. A nível físico-químico podemos evidenciar modificações nas duas fases dispersas do leite: a fase coloidal e a fase gorda, alterações estas que influenciam a aptidão tecnológica do leite (Luquet, 1985).

A fase coloidal do leite é composta por micelas constituídas, na maior parte, pelas caseínas α_s , β e κ , com cálcio ou fosfato de cálcio fortemente associados. É importante manter um equilíbrio salino entre a fase coloidal e aquosa do leite, pois, com o aumento da mineralização, as micelas engrossam e ficam menos estáveis, o que facilita o trabalho do coagulante. A coalhada obtida destas micelas é firme e de fácil manejo (Luquet, 1985).

O frio tem duas acções na fase coloidal. Por um lado, a caseína β , que apresenta uma estrutura polimérica à temperatura de 20 °C, torna-se monomérica, aumentando a sua solubilidade na fase aquosa (Creamer *et al.*, 1977; Ali *et al.*, 1980a; Ichilezyk-Leone *et al.*, 1981; Kessler, 1981; Luquet, 1985; Hsien-Yeh-Hsu *et al.*, 1986; Brule *et al.*, 1987), solubilizando-se também as caseínas κ e α_s (embora em fracções menores) (Lenoir e Schneid, 1987), resultando no aumento da sua dispersão, o que leva à diminuição do tamanho da micela (Lenoir *et al.*, 1974; Davies & Law, 1983; Walstra & Van Vliet, 1986). Por outro lado, as temperaturas inferiores a 4 °C também solubilizam o fosfato de cálcio (Lenoir *et al.*, 1974; Ali *et al.*, 1980a; Luquet, 1985), responsável pela formação de pontes estabilizadoras da estrutura quaternária das caseínas (Scott, 1986; Singh *et al.*, 1996) nos grupos fosfoserílicos (Lucey *et al.*, 1993), tendendo a separá-lo da micela, contribuindo assim para a sua dispersão (Luquet, 1985; Brule *et al.*, 1987; Lenoir *et al.*, 1987; Walstra, 1990). Com a diminuição do tamanho da micela e a solubilização do fosfato de cálcio, diminui a aptidão do leite para coagular pelo coalho (Raynal e Remeuf, 2000). O frio torna a fase coloidal mais estável (Luquet, 1985).

Como consequência da refrigeração, verifica-se assim o aumento do tempo de coagulação (McMahon e Brown, 1984a, Luquet, 1985), uma diminuição da firmeza do gel, um dessoramento mais difícil (McMahon e Brown, 1984a, Luquet, 1985; Mahieu, 1985) e maiores perdas no soro (Luquet, 1985). As alterações da forma nativa das caseínas α_{s1} e β , tornam-nas mais acessíveis à acção proteolítica do coalho (McMahon *et al.*, 1984b), podendo resultar na formação de péptidos que originem um sabor amargo (Kessler, 1981; Madrid, 1990; Macedo *et al.*, 1996).

Os efeitos da utilização do frio apresentam uma certa reversibilidade. O armazenamento do leite a 20-30 °C durante 24 h, após a refrigeração, restabelece o equilíbrio salino, no entanto, o restabelecimento da caseína β é mal conhecido, possivelmente dá-se segundo uma estrutura diferente, deixando a caseína β à superfície da micela (Luquet, 1985) e depois difundir para o interior da micela (Creamer *et al.*, 1977). Existem outras possibilidades de correcção, tais como:

- Adição de cloreto de cálcio CaCl_2 0,1 g/L a 0,2 g/L (Ali *et al.*, 1980b; Luquet, 1985);
- Manutenção do leite a 30 °C durante 2 h, antes da adição do coalho (Luquet, 1985);
- Colocação do leite na presença de uma pequena quantidade de fermento láctico durante 15 h a 10-20 °C (Luquet, 1985);
- Utilizar o material retido por ultra-filtração enriquecendo-o em cálcio e aumentando em simultâneo o teor em proteína (Ali *et al.*, 1980b; Luquet, 1985);
- Acidificação ligeira do leite (Luquet, 1985; Puhan, 1989) ou termização (Dzuree e Zall, 1985; Luquet, 1985).

Contudo, ainda não foi provado que a forma inicial da micela seja totalmente restaurada (Davies e Law, 1983).

A fase gorda é constituída por glóbulos, formados por triglicéridos parcialmente cristalizados à temperatura ambiente, rodeados por uma membrana hidrófila que garante a protecção do glóbulo e a estabilidade da emulsão (Luquet, 1985).

Na fase gorda, a diminuição da temperatura promove a cristalização dos triglicéridos, provocando uma retracção do glóbulo com deformação da membrana. Se esta diminuição for rápida, os cristais formados são mais pequenos, sendo os estragos na membrana menores. Em caso contrário, num arrefecimento lento (acima dos 20 minutos), ocorre a formação de cristais maiores, com o aumento do risco de ruptura da membrana, facilitando o aparecimento de defeitos por alterações dos triglicéridos e dos ácidos gordos. Com o frio, a hidrofília⁵ desaparece (a matéria gorda é hidrófoba), o que resulta numa tendência dos glóbulos para se aglutinarem e subirem até à superfície (Luquet, 1985). Com o frio, os cristais de gordura dos triglicéridos de menor ponto de fusão podem penetrar nas caseínas e membranas dos triglicéridos de maior ponto de fusão, libertando proteases e lipases (Mahieu, 1985; Hsien-Yeh-Hsu *et al.*, 1986; Madrid, 1990), causando defeitos no sabor e no aroma.

⁵ **Hidrofília** – propriedade física que permite á molécula ligar-se à água e outras moléculas polares.

1.3.2. EFEITO A NÍVEL DA MICROBIOLOGIA NO LEITE

A temperatura é um dos factores mais importantes para o desenvolvimento microbiano. A nível microbiológico, a refrigeração altera a microflora presente no leite, favorecendo o desenvolvimento dos microrganismos psicrótróficos em detrimento da flora mesófila (Alais, 1985; Spreer, 1991).

Segundo Alais (1985), o leite de vaca consiste numa solução neutra, fortemente tamponizada, muito rica em substâncias nutritivas e factores de crescimento, como vitaminas do grupo B, sendo por isso um excelente meio de cultura para os microrganismos. Embora seja um meio muito nutritivo, não é um meio de cultura universal, por várias razões:

- A fonte glucídica energética é somente constituída por lactose, açúcar que algumas bactérias e leveduras metabolizam menos facilmente que a glucose;
- Apesar do conteúdo em substâncias azotadas ser elevado (mais de 3%), a quantidade de aminoácidos livres e péptidos é pequena, o que constitui um factor limitante para numerosas espécies bacterianas;
- Após a ordenha, o leite contém substâncias anti-bacterianas que o protegem contra a invasão de certos germes sensíveis e que explicam, em parte, a fase de latência que se observa no início do desenvolvimento das bactérias no leite cru.

O leite cru de boa qualidade para fabrico de queijo deve conter uma flora microbiana limitada e predominantemente útil. Trata-se de um dos aspectos decisivos para a qualidade do queijo, pois o factor biológico pode tornar-se o factor que mais contribui para o aparecimento de defeitos no produto final, quer por efeito directo, quer indirectamente afectando toda a transformação tecnológica. São agentes prejudiciais todos os microrganismos de contaminação susceptíveis de causar defeito no queijo, como os produtores de gás ou agentes de proteólise intensa. No entanto, também se pode tornar indesejável a presença de elevadas concentrações de microrganismos úteis, como bactérias lácticas, que podem provocar problemas tecnológicos graves, impossibilitando a obtenção de um produto com as características desejadas (Martins, 2001).

O conteúdo microbiano do leite cru diz muito acerca da sua qualidade, está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binómio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o seu processamento ou transformação (Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08). É, em parte, devido à higiene mantida no processo da sua obtenção, ao estado das instalações de ordenha, à qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, aos utensílios não perfeitamente higienizados, armazenamento e transporte do leite; por outro lado, o estado sanitário da vaca, em especial

do úbere, é fundamental para a qualidade microbiológica do leite (Spreer, 1991; Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08). O grau de concentração microbiana do leite é proporcional à falta de rigor com que é realizada a ordenha, isto é, uma ordenha onde não sejam tomados cuidados com factores de contaminação do leite, anteriormente descritos, será um leite com um elevado nível de contaminação.

A contaminação microbiana do leite pode ocorrer durante a ordenha, a recolha, a conservação e o transporte (Rebelo, 1983; Pinto *et al.*, 2006). Os diferentes vectores de contaminação têm, por vezes, associados diferentes grupos microbianos:

- Animal
 - Quando o animal sofre de mastite ou mamite, os microrganismos passam do úbere para o leite através da ordenha. Esta é a origem mais importante para a contaminação com *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* e com estafilococos. As enterobactérias (*E. coli*, *Salmonella*), *Coxiella burneti*, os estreptococos e outros microrganismos, menos frequentes, podem também ter esta origem;
 - Através das fezes, o animal pode ser causa indirecta de contaminações do leite. Quando a recolha do leite não se faz com cuidados de higiene, microrganismos perigosos como o bacilo da tuberculose e as brucelas podem contaminar o leite;
- Meio exterior
 - Água e solo são “reservatórios” de microrganismos patogénicos⁶. É através de vectores como o pó e as gotas de água que os microrganismos podem chegar ao leite no momento da sua ordenha ou durante o seu tratamento/transformação. Este tipo de contaminação é responsável principalmente pelos microrganismos das doenças próprias do Homem (*Salmonellas*, estreptococos (grupo A), bacilo diftérico (*Corynebacterium diphtheriae*), vírus da poliomielite entre outros).
- Homem
 - O Homem é responsável por controlar os vectores de contaminação descritos anteriormente sendo também causa directa de contaminação. Principalmente, pela negligência ao nível do cuidado com a ordenha que, pode ser as mãos sujas, a expectoração, roupas, etc., durante todo o processo pelo qual passa o leite e onde se dá a intervenção directa do Homem (Alais, 1985).

⁶ **Patogénicos** – originam ou transmitem doenças.

Thomas e Thomas (1973) demonstraram que a linha de lactodutos, os tanques de recepção, na sala do leite, os tanques de transporte e o equipamento das indústrias transformadoras são a principal fonte de psicotróficos no leite cru.

As situações gravosas para a qualidade do leite, previamente descritas, são atenuadas ou mesmo evitadas se usarmos correctamente a cadeia de frio com tempos de armazenamento adequados. Segundo vários autores (Alais, 1985; Luquet, 1985; Ribeiro e Carvalho, consultado a 09/10/08) o leite deve atingir os 4 °C, como máximo, praticamente instantaneamente. O tempo em refrigeração deve ser ajustado ao nível de contaminação inicial; por exemplo, no caso de um leite de boa qualidade microbiológica, a refrigeração não deve ultrapassar os três dias (dois na exploração, mais um de transporte e armazenagem na fábrica). Se o leite for de má qualidade microbiológica, a refrigeração deverá ser efectuada por um período de tempo menor (Luquet, 1985). O tempo de conservação é inversamente proporcional à contaminação inicial e a temperatura de conservação.

É também a nível da variação induzida na componente microbiana, quer por via da contaminação quer pelo processo de conservação, que se pode também afectar a qualidade do queijo, com maior incidência a nível do queijo fabricado a partir de leite cru, uma vez que na tecnologia não se limita a presença microbiana. São as diferenças entre os produtos finais obtidos e as exigências colocadas, por exemplo, a nível da obtenção da certificação das DOP, que têm sido razão de grande preocupação e até de descrédito do uso de uma prática tão importante como a refrigeração, como foi referido por Dias (1998). Muito provavelmente, haverá, para este tipo de queijos (de leite cru), limitações à refrigeração que importa reter, o que é um dos temas importantes deste trabalho, ainda para mais porque se refere a leite de ovelha, assunto muito pouco tratado a nível da refrigeração.

A flora microbiana do leite pode ser agrupada com base na sua acção, em flora desejável e indesejável. A flora desejável é inofensiva para o consumidor e pode impedir a actividade de microrganismos indesejáveis e também dar origem a fermentações com reflexos favoráveis no gosto e aroma, quer no leite quer nos seus derivados. A flora indesejável inclui microrganismos patogénicos e pode produzir fermentações que tornam o leite impróprio para o consumo (Rebelo, 1983).

Uma das condições indispensáveis para se obter um queijo de boa qualidade é que o fabrico e a maturação do queijo ocorram de forma óptima e, para tal, é necessária a contribuição de uma flora específica de maturação (Spreer, 1991) e boas condições para que se desenvolva (Martins e Vasconcelos, 2004). Esta flora específica integra o grupo da flora desejável, com características específicas e diversidade muito relacionadas com as

condições e determinantes de fabrico e, logo, com o tipo de queijo, sem a qual os queijos tradicionais perderiam uma das suas grandes qualidades – tipicidade/variabilidade.

Esta flora, quer se desenvolva à superfície ou no interior do queijo, é causadora de diversas alterações que vão influenciar as características finais do queijo através da hidrólise de lactose, da proteólise e da lipólise (Vieira de Sá *et al.*, 1970c e 1990; Piton, 1988), por via da secreção de enzimas, de produção de aromas e da regulação da difusão dos gases (Piton, 1988).

Parte das enzimas coagulantes adicionadas, que se mantêm activas durante o processo de maturação dos queijos, bem como as enzimas produzidas pela microflora do leite cru, promovem a produção de novos péptidos que influenciam o sabor final dos queijos (Pires *et al.*, 1997). Nos queijos curados com forte contribuição da flora microbiana de superfície, como os queijos tradicionais portugueses mais característicos, a influência da reima nas características finais depende de diversos factores relacionados com a qualidade da matéria-prima e o fabrico (Martins e Vasconcelos, 2004), sendo igualmente afectada pela tipologia do queijo, pelo tamanho e, principalmente, pela relação superfície/volume (Reps, 1993).

As características do queijo resultam assim de um conjunto de acções físicas, químicas e bioquímicas, que se exercem sobre o leite e os seus componentes, por via de diversos factores de transformação e agentes químicos e biológicos, nativos do leite, adquiridos ao longo do processo de fabrico. As características do queijo, tais como consistência da pasta, sabores, odores, cores, etc., constituem um dos aspectos mais importantes da sua respectiva qualidade, podendo, para alguns produtos, ser mesmo o aspecto mais importante da sua qualidade (Martins e Vasconcelos, 2004).

O leite, além da flora desejável para competir com o desenvolvimento da flora indesejável, contém ainda várias proteínas não imunológicas que têm propriedades antimicrobianas. As quatro proteínas mais comuns e estudadas são a lactoperoxidase, a lactoferrina, a lisozima, e a xantina oxidase. Estas proteínas estão envolvidas num sistema complexo que inactiva os microrganismos. A lactoperoxidase forma um sistema antimicrobiano com peróxido de hidrogénio e tiocianato. A lactoferrina é uma proteína que se liga ao ião Fe^{3+} e ao anião carbonato. A lisozima é uma proteína que pode ter um efeito enzimático directo/indirecto ou um efeito não enzimático sobre os microrganismos. A xantina oxidase está envolvida na produção de peróxido de hidrogénio, que tanto pode ser usado pelo sistema da lactoperoxidase ou directamente como um agente antimicrobiano (Hui, 1993).

A utilização da refrigeração em condições deficientes pode tornar-se uma fonte potencial de problemas para o fabrico do queijo, pois é susceptível de alterar completamente o equilíbrio da flora microbiana do leite, favorecendo o desenvolvimento dos psicotróficos, agentes de graves problemas na evolução e na qualidade do queijo, os quais apenas têm sido evidentes nos últimos anos, sendo inesperados e até desconhecidos para a grande maioria dos agentes transformadores, sobretudo no sector mais tradicional (Martins e Vasconcelos, 2004).

A deterioração microbiológica do leite e seus derivados é dependente da qualidade do leite cru usado na produção e da contaminação inicial e durante o processamento. A congelação e a refrigeração têm sido extensivamente utilizados para diminuir o desenvolvimento dos psicotróficos e parar o desenvolvimento dos mesófilos e termófilos⁷ (Hui, 1993).

A flora psicotrófica não constitui um grupo taxonómico, pois inclui bactérias, fungos e leveduras (são capazes de se desenvolver sobre praticamente todos os substratos, mesmo asfalto e tijolo), com tempo de geração⁸ curto, entre 0 °C e 7 °C, e uma temperatura mínima até -10 °C (Chandler e McMeekin, 1985; Sørhaug, 1992; Sørhaug e Stepaniak, 1997). É sensível ao cloro (Luquet, 1985) e, embora a maioria seja inactivada pela pasteurização, existem psicotróficos termorresistentes e psicotróficos formadores de esporos que são responsáveis por defeitos na textura e no sabor dos produtos leiteiros de longa duração (Hui, 1993). Os psicotróficos produzem enzimas termorresistentes (Griffiths *et al.*, 1981; Patel *et al.*, 1983; Rebelo, 1983; Alais, 1985; Luquet, 1985; Vieira de Sá e Barbosa, 1990; Hui, 1993); 80 % dos psicotróficos produzem enzimas lipolíticas e 60 % têm actividade simultaneamente lipolítica e proteolítica (Luquet, 1985). Estas enzimas estão relacionadas com perdas de qualidade e redução da validade do leite UHT e de outros produtos lácteos (Speck e Adams, 1976; Law *et al.*, 1977; Fox, 1981; Cousin, 1982; Terada *et al.*, 1982; Griffiths *et al.*, 1987; Griffiths *et al.*, 1988; Champagne *et al.*, 1994; Sørhaug e Stepaniak, 1997; Fajardo-Lira e Nielsen, 1998; Chen *et al.*, 2003).

De entre os psicotróficos, tanto das gram-negativas como das gram-positivas, predominam as *Pseudomonas* (Cousin, 1982; Alais, 1985; Carven e Macauley, 1992; Ternstrom *et al.*, 1993; Shah, 1994; Eneroth *et al.*, 1998; Eneroth *et al.*, 2000a; Eneroth *et al.*, 2000b; Wiedmann *et al.*, 2000; Dogan e Boor, 2003; Gunasekera *et al.*, 2003). Também se

⁷ **Termófilos** - Bactérias que têm temperatura óptima de multiplicação entre 45 °C e 65 °C, mínima de 35 °C e 45 °C, e máxima entre 60 °C e 90 °C.

⁸ **Tempo de geração** – tempo em que ocorre a duplicação da população (Alais, 1985).

encontram outras espécies de ambas, gram negativas (*Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, e *Flavobacterium*) e gram positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus Streptococcus*, *Staphylococcus*, e *Lactobacillus*) (Cousin, 1982; Alais, 1985; Sorhaug e Stepaniak, 1997; Munsch-Alatossava e Alatossava, 2006).

O frio tem pouca influência nos tempos de geração das *Pseudomonas*, sendo as *Pseudomonas fluorescens* as que se desenvolvem mais rapidamente (Luquet, 1985; Sorhaug e Stepaniak, 1997). Segundo Hui (1993), *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens* são conhecidos como agentes de deterioração do leite e seus derivados durante o armazenamento em refrigeração e, na presença de ar tempo de geração é ainda mais reduzido. Kohlmann (1991) observou que as *P. fragi* e a *P. fluorescens*, com um nível inicial de 10^5 UFC/ml, aos dez dias a 7 °C apresentaram actividade proteolítica enquanto que outros psicotróficos com contaminações iniciais iguais, apresentaram actividade proteolítica mais tarde.

As proteases produzidas pelos psicotróficos no leite degradam, selectivamente, as caseínas (Hui, 1993), caseína α_{s1} , β e κ (McPhee e Griffiths, 2002), mas também podem atacar as proteínas do soro (Skean e Overcast, 1960). A caseína κ é a primeira a ser degradada (Adams *et al.*, 1975; Fairbairn e Law, 1986) o que tem implicações na estabilidade do leite e no fabrico de queijo, uma vez que a caseína κ tem um papel fundamental na estabilização das micelas e na coagulação do leite (Webb e Johnson, 1965).

O tamanho da micela de caseína vai diminuindo com o aumento do desenvolvimento das bactérias psicotróficas (para populações superiores a 10^8 UFC/mL). A degradação da caseína durante o armazenamento do leite pode ter um efeito determinante na qualidade final dos produtos lácteos (Hui, 1993). Para uma proteólise visível não é necessária uma população de psicotróficos elevada. Adams *et al.* (1975) observaram um decréscimo de 10 a 20 % de caseína κ ao fim de dois dias a 5 °C, resultante de um crescimento de uma colónia isolada até 10 000 UFC/mL. De acordo com Fox (1982) e Kumaresan *et al.* (2007), as proteases do leite têm sido implicadas em vários processos de transformação do leite: gelificação de leite UHT, formação de aminoácidos durante a maturação de queijo, desenvolvimento de sabores amargos em leites e derivados e diminuição do rendimento queijeiro.

Ultimamente foram publicados diversos estudos sobre o decréscimo do rendimento na produção de queijo devido à proteólise que, resulta em perda de caseína com o soro. A duração do armazenamento do leite a baixas temperaturas, as contagens de psicotróficos

superiores a 10^6 UFC/mL de leite, a temperatura de armazenamento, e o tipo de psicotróficos são factores que afectam o rendimento dos diversos tipos de queijo, curado e não curado (Hui, 1993). Pinto *et al.* (2006) referem mesmo que é imprudente utilizar leite cru com contagem de psicotróficos superior a 5×10^6 UFC/mL.

As pseudomonas são uma preocupação importante em relação à degradação lipídica (Shah, 1994). Segundo Fox (1989), as lipases produzidas pelos psicotróficos são mais importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos do que as proteases, pois as proteases são solúveis em água e são perdidas durante o dessoramento, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa de queijo, para além de que muitos dos metabolitos que se formam com origem nas reacções de lipólise e evoluções subsequentes revelam muito mais impacto no sabor e aroma do que nos resultantes da proteólise, mais associados à evolução da consistência e textura.

A maior parte dos estudos sobre os problemas nos produtos lácteos de longa duração, identificam uma relação com a refrigeração, mas os efeitos desta nos produtos à base de leite cru poderão ser ainda mais graves.

No primeiro caso, trata-se fundamentalmente de questões relacionadas com o rendimento da transformação ou com a estabilidade dos produtos, mas em queijos à base de leite cru, haverá que contar também com a influência microbiana directa, com maior ou menor incidência dependendo do tipo de produto.

O estado micelar da caseína e o equilíbrio salino-proteico, na sua relação com a acidificação por via da actividade microbiana, bem como o efeito directo da acidificação no fabrico, e ainda a susceptibilidade da matéria gorda a alterações com importância organoléptica, são aspectos relevantes a ter em conta, no fabrico de queijos. A presença de microrganismos, quer devida a uma contaminação inicial elevada, quer por deficiente conservação do leite, são os aspectos mais preocupantes a nível do sector da produção de leite de pequenos ruminantes, podendo dizer-se que a qualidade microbiológica do leite é genericamente, senão muito má, pelo menos fortemente limitativa da obtenção de queijo de qualidade (Martins e Vasconcelos, 2001).

Acresce ainda que nem sempre são utilizadas as melhores condições de refrigeração tendo em vista a problemática complexa da conservação do leite.

Segundo o regulamento em vigor (CE n° 1662/2006), genericamente, o leite deve ser arrefecido a uma temperatura não superior a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ imediatamente a seguir à ordenha, no caso de uma recolha diária, ou não superior a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ no caso de uma recolha não diária.

Durante o transporte, a temperatura à chegada ao estabelecimento de destino, não deve ser superior a 10 °C. Refere ainda que estas temperaturas podem não ser respeitadas no caso de o leite não ter uma contagem de microrganismos totais a 30 °C igual ou inferior a 500 000 UFC/ml e for transformado nas duas horas que se seguem à ordenha, ou for necessária uma temperatura mais elevada por razões tecnológicas ligadas ao fabrico. Segundo a bibliografia consultada, os 6 °C referidos no regulamento podem não ser suficientes para conservar um leite cru em condições microbiológicas para a sua posterior transformação, mesmo com contaminações inferiores a 500 000 UFC/ml, especialmente quando se consideram fabricos de queijo a partir de leite cru.

Gonzalez *et al.* (1995) procederam à avaliação da qualidade microbiológica do leite de ovelha em tanques de refrigeração em queijarias da zona de produção do queijo de Manchego. Os resultados em termos de flora psicrótrófica foram inferiores a 5×10^5 UFC/mL para a maioria das amostras (73,18 %). Para as restantes (10,06 %, 12,85 % e 3,91 %) amostras os valores rondaram os $5 \times 10^5 - 10^6$, $10^6 - 10^7$ e $> 10^7$ UFC/mL, respectivamente.

Normalmente, é a partir de um milhão de bactérias psicrótróficas por mililitro de leite que os riscos de alteração são maiores. Este número é atingido ao fim de três dias, após a ordenha, a 4 °C, para um leite de qualidade média (Luquet, 1985). Em produtos finais com contagens microbianas dentro dos limites legais, podem também ocorrer transformações de origem microbiana (Ravanis e Lewis, 1995).

De acordo com Vieira e Sá e Barbosa (1990), é principalmente durante a conservação do leite em tanques refrigerados, acima de 4 °C, e quando os períodos de armazenamento são longos (acima de 36 a 48 horas), que ocorre o desenvolvimento das bactérias psicrótróficas. Se a isto se juntar uma ordenha sem a qualidade higiénica recomendada, este leite ficará desde logo responsável pela má qualidade do queijo, manteiga e outros derivados em cujo fabrico for usado. A chamada de atenção para estes aspectos é tanto mais importante quanto é certo que muitos produtores acreditem que a preservação do leite pelo frio é indefinida, ou quase, e que a temperatura de arrefecimento a 7 °C ou 10 °C é mais que suficiente para o preservar de todos os riscos, o que não é verdade.

Os riscos que advêm da actividade metabólica dos microrganismos psicrótróficos poderão ser controlados limitando a contaminação inicial, recorrendo a práticas adequadas de higiene no ciclo de produção e transformação do leite, podendo-se conseguir níveis inferiores a 10^3 UFC/mL. A aplicação de frio nas duas horas subsequentes à ordenha, a temperaturas entre 3 °C e 4 °C por períodos de conservação que não excedam as 48 h,

também limitam a elevação dos níveis de contaminação. Estas práticas permitirão uma qualidade microbiológica de níveis inferiores a 5×10^4 UFC/mL (Lenoir, 1980).

Existem vários factores a condicionar a proporção de psicotróficos no leite refrigerado, como o nível de contaminação e a composição da flora contaminante inicial, a temperatura, a duração da refrigeração (Feuillat *et al.*, 1976; Bloque *et al.*, 1980, Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007) e, com menor influência, os sistemas de inibição natural do leite (Zall, 1990). A relação psicotróficos/flora mesófila total de um leite antes da refrigeração pode variar entre limites tão amplos como de 3 a 90% (Feuillat *et al.*, 1976), 1 a 87% (Pla *et al.*, 1992) ou, em certos casos, ultrapassar mesmo o valor da flora total (Nuñez *et al.*, 1984; Pla *et al.*, 1992). A variação destes níveis está dependente do grau de higiene conseguido no momento da ordenha; segundo Cousin (1982), menos de 10 % da microflora total são psicotróficos no caso de ordenhas sob boas condições sanitárias, caso contrário podem exceder os 75 %.

A temperatura é, sem dúvida, o factor mais importante pois, tem um efeito directo sobre a duração da fase de latência e o tempo de geração para cada microrganismo (Pla *et al.*, 1992). Dousset *et al.* (1988) observaram que os leites com níveis de psicotróficos de $4,5 \times 10^4$ UFC/mL iniciais atingiram níveis de 10^6 UFC/mL em 48 h a 8 °C e apenas 8×10^4 UFC/mL no mesmo período de tempo a 3 °C

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

1.4.OBJECTIVOS DO PRESENTE ESTUDO

No presente trabalho será estudado o efeito da refrigeração nas características tecnológicas do leite de ovelha, quer sobre a evolução da flora microbiana, quer sobre o impacto nas características físico-químicas do leite que condicionam a sua aptidão à coagulação e, por essa via, o respectivo comportamento no decurso das fases tecnológicas e a qualidade do produto final, constituindo-se, assim, como duas das componentes essenciais do valor tecnológico do leite cru para o fabrico de queijo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. BREVE DESCRIÇÃO DA QUEIJARIA

Este trabalho foi efectuado em colaboração com a empresa Flor de Cardo S. A., a qual cedeu os lotes de leite utilizados nos ensaios efectuados.

Criada em 2003, a Flor de Cardo S. A. é uma jovem sociedade que se dedica à produção e comercialização de queijos tradicionais.

Flor de Cardo



Baseada numa antiga queijaria, na zona de produção do Queijo de Azeitão DOP, a Flor de Cardo criou os produtos da gama Divinus resultantes de uma estratégia que tem como objectivo principal a consolidação da qualidade e tipicidade regional em paralelo com a modernização das técnicas de produção.

No respeito do legado de gerações anteriores, a Flor de Cardo alia o essencial das tecnologias tradicionais com modernos equipamentos, continuando a desvendar os segredos que a "arte queijeira" do nosso país nos legou (www.arcolsa.pt, consultado a 20/10/08).

2.2. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.

O leite, cedido pela queijaria Flor de Cardo, foi recolhido no tanque de refrigeração da queijaria. O período da recolha das amostras decorreu de Janeiro a Maio às segundas-feiras de manhã, em recipiente previamente esterilizado. As amostras foram transportadas até ao laboratório sob refrigeração (em caixas isotérmicas). O tempo entre a recolha das amostras e as respectivas análises iniciais nunca foi superior a 8 h.

Chegada ao laboratório a amostra de leite foi dividida em duas sub-amostras de 1L cada, uma para cada temperatura de refrigeração: 4 ± 1 °C e 8 ± 1 °C. Reservou-se ainda cerca de 200 mL para as análises físico-químicas e 10 mL para as análises microbiológicas a efectuar antes da refrigeração, para caracterização inicial do leite.

Para cada uma das temperaturas, os ensaios de refrigeração decorreram durante sete dias, sendo efectuadas as análises de avaliação da aptidão à coagulação do leite nos dias zero, um, dois, três e sete, respectivamente, e análises microbiológicas nos dias zero, um, dois e três, respectivamente.

2.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

No dia da recolha (dia zero), a amostra de 200 mL, foi colocada em banho-maria a 37 °C, para homogeneização. Parte desta amostra foi colocada a 32 °C para a avaliação da aptidão para a coagulação, mais à frente descrita, e outra parte da amostra foi colocada a 20 °C, temperatura de trabalho em laboratório. Após estabilização, foram efectuadas as seguintes análises físico-químicas:

- pH (20 °C) – por potenciometria (potenciómetro 713 pH Meter Metrohm, Herisau, Swiss);
- Acidez – NP - 470 (IPQ, 1983b);
- Matéria Gorda (MG) – NP - 469 (IPQ, 1983a);
- Proteína Bruta (PB) – NP - 1986 (IPQ, 1991);
- Resíduo Seco e Resíduo Seco Isento de Matéria Gorda – NP - 475 (IPQ, 1983d);
- Densidade (20 °C) – NP - 474 (IPQ, 1983c).

Nos últimos ensaios, foi também efectuado o teste da lactofermentação (Chavannes e Demont, 1945), que consistia em colocar dois tubos de ensaio, com cerca de 10 mL de leite cada, a 30 °C durante 24 h \pm 1 h, sendo depois registada a existência ou ausência de alterações ocorridas no tubo: coagulação, proteólise ou produção de gás. O teste da lactofermentação foi repetido todos os dias, para as duas temperaturas de refrigeração, sempre em duplicado.

Ao dia sete foi tirada uma foto-resumo (câmara digital), relativo ao ensaio que terminou contendo um tubo de ensaio referente a cada dia. Os tubos foram colocados por ordem de tempo e temperatura de refrigeração. A foto foi tirada sem flash e com os tubos sob um fundo preto, posteriormente foi trabalhada digitalmente recorrendo a um software de edição de imagens e fotografias (paint.NET, v.3.05).

A edição das fotos consistiu em diminuir o nível de entrada da cor branca e aumentar o nível de entrada do preto, depois usar o contraste e o brilho para obter uma melhor definição das alterações, estas variações variaram consoante a foto, tentando se melhorar a distinção das alterações, permitindo o realce das alterações que ocorreram dentro dos tubos (Figuras 1 e 2), nomeadamente a produção de gás (presença de sulcos ao longo do coágulo) e proteólise (aparecimento de zonas de digestão do coágulo), pois são as alterações visíveis.

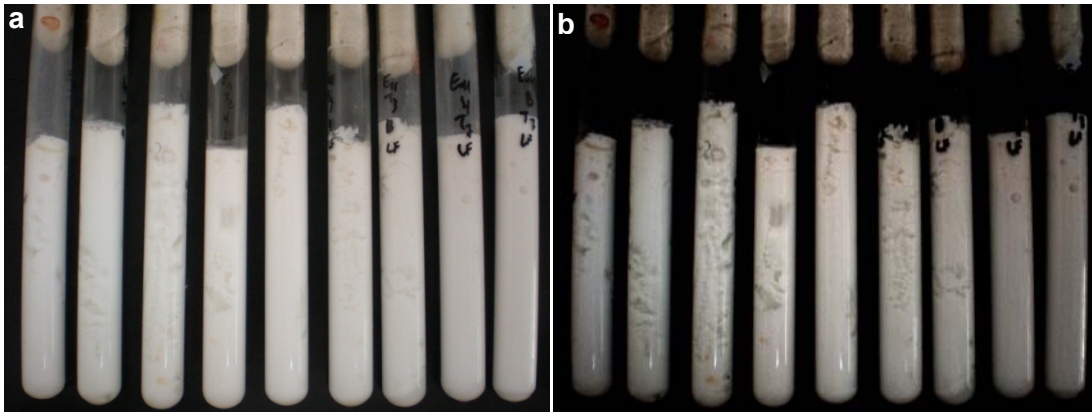


Figura 1 – Foto-resumo para exemplo de resultados do teste da lactofermentação, original (a) e editada (b).



Figura 2 – Exemplo de produção de gás (a) e de proteólise (b).

Foi também efectuada a avaliação da aptidão para a coagulação, como factor representativo da aptidão do leite para o fabrico de queijo, a qual foi efectuada com o Optigraph[®], segundo metodologia desenvolvida no exNTLD/DTPA do L-INIA, INRB, IP (Alves, 2003; Alves *et al.*, 2004).

O Optigraph® foi desenvolvido (1999) pelo INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Grignon e pela empresa Ysebaert, com os objectivos de acompanhar a coagulação do leite em laboratórios de indústrias de lacticínios e também de substituir um outro equipamento, o Formagraph®, que, ao contrário do Optigraph®, que se baseia num método óptico, se baseava num método reológico, com os inconvenientes daí inerentes, como a destruição das amostras.

O Optigraph® é um sistema (*hardware* e *software*) que caracteriza a aptidão tecnológica do leite para a coagulação. Calcula em tempo real todos os parâmetros necessários para o correcto acompanhamento do fabrico do queijo: tempo de coagulação e evolução da firmeza do coágulo através de determinações feitas ao longo do tempo.

O Optigraph® mede a atenuação do sinal óptico no infra-vermelho próximo, uma vez que, ao longo da coagulação, a luz emitida que vai atravessar o leite é progressivamente atenuada, devido às alterações na estrutura da micela da caseína (Ysebaert, 2000). O resultado de cada ensaio de coagulação vem expresso graficamente em “optigramas” (Figura 3), dos quais se extraem vários indicadores.

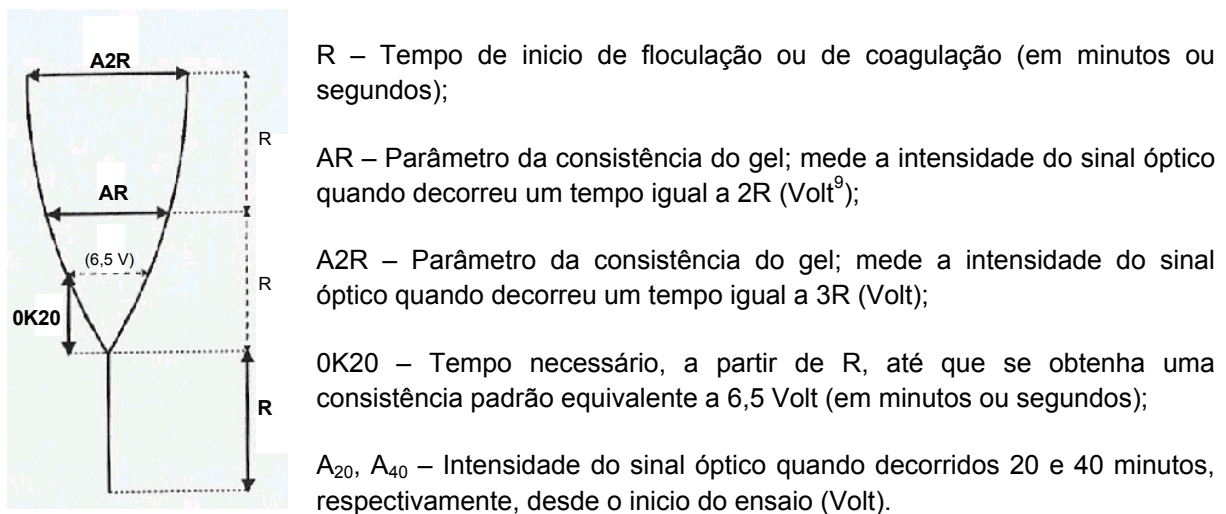


Figura 3 – Representação gráfica de alguns parâmetros avaliados através do Optigraph (adaptado de Mahaut *et al.* (2000), por Martins *et al.* (2007)).

O Optigraph® permite obter outros dados que aqui não estão explicitados, como por exemplo, A₆₀, os quais serão mais úteis em coagulações que ocorram mais tardiamente. O suporte de amostras tem capacidade máxima para 10 amostras de leite, podendo o

⁹ Volt – (símbolo: **V**) é a Unidade SI de tensão eléctrica (diferença de potencial eléctrico), a qual denomina o potencial de transmissão de energia, em Joules, por carga eléctrica, em Coulombs, entre dois pontos distintos no espaço.

aparelho, no entanto, funcionar sem que todas as células estejam ocupadas. O volume de leite a utilizar é de 10 mL por célula, enquanto que o de coagulante pode ser arbitrado pelo operador, sendo usualmente de 1 mL. A temperatura a que decorre o ensaio pode variar entre 24 e 45 °C.

Antes de cada ensaio, o Optigraph® calibra cada célula cheia e seleccionada individualmente, para um sinal inicial padrão, que, para leite de ovelha, está definido pelo laboratório em 7 Volt (Alves, 2003), após colocação a uma temperatura constante, que neste caso foi estabelecido em 32 °C, temperatura à qual vai decorrer a coagulação do leite. A duração dos ensaios foi fixada em 60 minutos para a utilização do coalho *standard* (Extracto de cuajo em polvo *Granday*® 6000), de forma a obter, em boas condições, todos os parâmetros de coagulação requeridos. Quando se utilizou o extracto de flor de cardo como coagulante, a duração dos ensaios foi de 120 minutos, obtendo-se dados de coagulação em situação próxima das condições reais de fabrico tradicional de queijo de ovelha.

Previamente, as amostras de leite foram colocadas a 32 °C, em banho-maria, durante pelos menos 1 h, para equilíbrio físico-químico.

Assim, em cada célula foram usados 10 mL de leite e 1 mL de solução de coagulante. Os coagulantes usados foram preparados da seguinte maneira:

- Coalho Standard: solução de 0,08 % (m/v) de coalho *standard* (0,04 g de coalho em 50 mL de água destilada), contendo 96 ± 2 % de quimosina, para obtenção de resultados padrão, comparáveis com a bibliografia e com outros obtidos no laboratório;
- Extracto de flor de cardo: preparado macerando em almofariz 4 g de flor de cardo com solução de cloreto de sódio (5 %, m/v), em extracções sucessivas, até preencher, após filtração em filtro Whatman nº40, 100 mL de volume final. Esta preparação em laboratório, pretendeu simular a coagulação real ocorrida na queijaria, a qual utiliza uma concentração equivalente a 0,4 g flor/L leite.

Nos dias um, dois, três e sete respectivamente, retiraram-se 150 mL de leite de cada uma das temperaturas de refrigeração para análises físico-químicas, as determinações de pH e de acidez, e também para avaliar a aptidão à coagulação, repetindo os métodos anteriormente descritos.

2.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas descritas a seguir foram efectuadas em amostras de leite, antes da refrigeração, e após um, dois e três dias de refrigeração, em cada das duas temperaturas (4 e 8 °C, respectivamente).

Contagem de mesófilos a 30 °C – esta contagem foi feita de acordo com a norma ISO/DIS 6610 (ISO/DIS, 1983), usando o meio de cultura PCA (Plate Count Agar), preparado da seguinte forma:

- dissolver 11,25 g de meio desidratado em 500 mL de água destilada; autoclavar a 121 °C durante 15 minutos; guardar à temperatura ambiente até à sua utilização final.

Contagem de psicrotóxicos a 21 °C – esta contagem foi feita de acordo com a norma ISO/DIS 8552 (ISO/DIS, 1986), usando o meio de cultura PCA adicionando 1 g de leite magro desidratado por litro.

Estas contagens foram realizadas em triplicado.

2.5. REGISTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos os resultados e observações foram registados num caderno semanal, para posterior análise (exemplo em anexo).

A análise de variância (ANOVA) dos resultados das contagens de UFC e dos resultados obtidos da aptidão para a coagulação do leite foi realizada com recurso ao programa *Statistica™*, versão 5, da Statsoft, EUA, utilizando o teste de Scheffé (Danzart, 1986), para comparação entre grupos. Os factores utilizados foram o tempo e a temperatura de refrigeração. Em todas as análises de variância foram considerados como valores significativos, aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 95 % ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPOSIÇÃO DO LEITE.

No início de cada ensaio, foi efectuada a caracterização do leite utilizado. O Quadro IV resume as médias encontradas para os parâmetros avaliados, assim como alguns parâmetros estatísticos relativos aos mesmos. Os valores obtidos estão de acordo com a bibliografia consultada no que se refere às principais características do leite de ovelha, embora seja comum encontrar uma grande variação (Martins, 1989). De referir, no entanto, que os teores em proteína, importantes relativamente ao fabrico de queijo, designadamente para o rendimento do fabrico, são baixos para leite de ovelha. Um valor médio de 4,77% (m/m) está muito mais próximo dos valores que se obtêm para raças de produção elevada, como a Assaf (Marques de Almeida, 2007) do que de raças nacionais, como a Saloia, proporcionando certamente rendimentos queijeiros inferiores (Martins, 1989; Martins *et al.*, 2007).

Quadro IV – Composição média do leite usado neste estudo.

	Média	Desv. Pad.	Máx.	Mín.	N
pH	6,62	0,06	6,73	6,52	14
Acidez (mL NaOH N/L leite)	25,2	3,3	30,0	16,5	14
MG (% m/v)	7,2	0,9	8,8	4,8	14
Azoto Total (% m/m)	0,747	0,038	0,819	0,646	14
PB (% m/m)	4,77	0,24	5,23	4,12	14
Resíduo Seco (% m/m)	17,63	0,91	18,73	15,21	14
Res Seco Isento de MG (% m/m)	10,70	0,35	11,27	9,56	14
Densidade (20°C)	1,0345	0,0011	1,0362	1,0320	14
Contagem de psicotróficos					
(21 °C) (UFC/mL)	$6,28 \times 10^5$	$1,31 \times 10^6$	$5,80 \times 10^6$	$5,40 \times 10^3$	14
Contagem de mesófilos totais					
(30 °C) (UFC/mL)	$1,04 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$	$8,60 \times 10^6$	$1,70 \times 10^4$	14

A variabilidade associada às médias referidas, aqui representada pelo desvio-padrão, é importante, pois pode ter, no caso de alguns parâmetros da coagulação, implicações na interpretação dos resultados obtidos, as quais serão referidas mais à frente.

No que se refere à contagem de microrganismos mesófilos totais, deve ser referido que a média obtida no início dos ensaios excede o valor estabelecido para o leite utilizado no fabrico de queijo, na produção (máx. 500 000 UFC/mL), o que não abona em favor da qualidade do leite, facto nada surpreendente para o que é comum no sector do leite de pequenos ruminantes (Martins e Vasconcelos, 2004). Deve notar-se ainda que o nível médio de microrganismos psicrótróficos no leite no início dos ensaios se situa a um *log* da contagem total de mesófilos, o que, se considerarmos os eventuais efeitos negativos deste tipo de microrganismos, pode significar problemas de qualidade do produto final.

Podemos, no entanto, notar que, para os dois parâmetros microbianos, a variabilidade foi acentuada o que, sendo também comum, indica a necessidade de, no sector da produção de leite, serem adoptadas, de forma sistemática, práticas que possibilitem a obtenção de leite de boa qualidade microbiana de forma continuada, aumentando a probabilidade de êxito no fabrico de queijo de leite cru.

A variabilidade nas características do leite, sobretudo microbiológicas, é um factor importante na heterogeneidade encontrada no queijo, a qual pode ser potenciada pela variabilidade físico-química (Martins e Vasconcelos, 2004; Martins *et al.*, 2007).

3.1. EFEITO DA REFRIGERAÇÃO NA APTIDÃO DO LEITE PARA A COAGULAÇÃO.

O efeito da refrigeração foi avaliado mediante dois tipos de ensaio. O primeiro, é um processo padrão, em rotina no laboratório do Núcleo de Leite e Lacticínios do L-INIA, INRB IP, o qual, como se descreveu em 2.4, utiliza quimosina como coagulante, para um tempo de ensaio de 60 minutos, intervalo em que devem estar contidos uma série de parâmetros que permitam avaliar a evolução da firmeza do coágulo após o início da floculação ou agregação micelar. Nestas condições, o início da agregação micelar, R, deve ocorrer num período não inferior a 5-6 minutos, que não permitiria a identificação da coagulação por parte do equipamento, e não superior a 20 minutos, o que não permitiria obter, alguns parâmetros, como, por exemplo, o A2R.

A vantagem de usar este processo reside no facto de, sendo um processo padrão, permitir uma avaliação comparativa entre ensaios ou entre algumas condições de ensaios. No entanto, dado que as condições padrão de ensaio significam uma aproximação a um fabrico de queijo que se distancia do fabrico tradicional de queijo de leite cru de ovelha, como o queijo de Azeitão, Serra da Estrela ou Serpa, optou-se por realizar também uma linha de ensaios contemplando condições de fabrico próximas das tecnologias tradicionais destes queijos, simulando a fase de coagulação do fabrico de queijo de Azeitão (Vasconcelos, 1990), constituindo uma relação enzima/substrato mais próxima da utilização real do coagulante e do fabrico, uma vez que esta relação é também um importante factor de condicionamento da coagulação (Alves, 2003).

Assim, foi também utilizado como coagulante o extracto de cardo, numa proporção próxima da habitualmente utilizada nessa tecnologia, equivalente a 0,4g flor de cardo/L de leite, proporcionando reacções enzimáticas menos intensas que no método padrão, obtendo-se valores de R mais elevados e permitindo observar os valores de firmeza do gel até aos 120 minutos, englobando assim os tempos totais de coagulação utilizados nos fabricos, entre os 40 e os 80 minutos (Vasconcelos, 1990; Peixeiro, 2005), e podendo estudar os eventuais efeitos da refrigeração em condições mais próximas das reais.

3.1.1. Coagulação com coalho standard (quimosina).

Como se observa no Quadro V, o pH do leite foi significativamente influenciado ($P < 0,01$) pelos factores em estudo, tempo e temperatura de refrigeração, bem como pela sua interacção. De facto, estes são factores conhecidos como decisivos no crescimento e metabolismo microbiano, os quais, no leite, têm como consequência, na maior parte das situações, a diminuição do pH, incluindo por efeito de microrganismos psicrotóxicos, nomeadamente de tipo láctico (Nuñez *et al.*, 1981). Este parâmetro é um importante factor da actividade enzimática e, portanto, o efeito do tempo e da temperatura de conservação foi também sensível ($P < 0,05$) ao nível do tempo de início da floculação (R), o que não aconteceu com a interacção entre os dois factores.

Relativamente aos parâmetros de consistência do gel, mais dependentes das características físico-químicas do leite do que da actividade enzimática, os factores em estudo revelaram um efeito não significativo (Quadro V). A única excepção foi a consistência ao fim de 20 minutos de ensaio (A_{20}), que foi influenciada significativamente ($P < 0,05$) sobretudo pelo tempo de refrigeração.

Quadro V – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados.

	pH	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20
Tempo (dias)	**	*	ns	ns	*	ns	ns
Temperatura (°C)	**	*	ns	ns	ns	ns	ns
Tempo * Temperatura	**	ns	ns	ns	*	ns	ns

**→ Muito significativo (p <0,01); * → significativo (p <0,05); ns → não significativo

Isto significa que, nas condições dos ensaios, a refrigeração não revelou efeito significativo nas características do coágulo, afectando apenas a primeira fase de coagulação, a fase enzimática, muito por efeito da variação do pH, as quais estarão certamente na base no efeito no A₂₀, dado que é o parâmetro de consistência mais próximo do início da agregação micelar (R).

Assim, as diferenças no parâmetro R podem não resultar do efeito directo da refrigeração, pois estão muito relacionadas com os níveis de pH, facto referido desde há muito. White e Davies (1958), por exemplo, notaram que o tempo necessário para o leite coagular com coalho reduziu com a diminuição do pH de 6,7 para 5,5. No caso do A₂₀, as diferenças verificadas também podem não ser directamente devidas ao tempo de refrigeração, pois é um parâmetro muito dependente do R, sendo também dependente, como toda a fase de agregação micelar, de factores inerentes ao leite e às condições de ensaio (teor e tipo de proteína/caseína, proporção de Ca⁺⁺, pH, temperatura), constituindo um fenómeno extremamente complexo (Dalglish, 1999).

Pela observação do Quadro VI, pode notar-se que, culminando a tendência decrescente do pH ao longo do tempo de refrigeração, menos acentuada a 4 °C, as diferenças tornaram-se significativas a partir dos sete dias, a 4 °C, e a partir dos três dias, para os 8 °C (Figura 4), denotando médias inferiores aos valores admitidos para alteração ainda aceitável no leite, próximo de 6,50-6,55. De la Fuente *et al.* (1997) e Raynal e Remeuf (2000) também não encontraram variações significativas no pH de leite de ovelha refrigerado durante dois dias a 4 °C. Podemos verificar que o pH do leite refrigerado a 4 °C, aos sete dias, é igual ao pH do leite refrigerado a 8 °C, aos três dias. Estas diferenças representam bem a necessidade da refrigeração, a temperatura adequada, para conservar a qualidade do leite.

Quadro VI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – R e 0k20.

Tempo (dias)	pH				R				0K20			
	4 °C		8 °C		4 °C		8 °C		4 °C		8 °C	
0	6,62	aA	6,62	aA	802	aA	802	aA	460	aA	460	aA
1	6,65	aA	6,64	aA	805	aA	805	aA	454	aA	463	aA
2	6,63	aA	6,58	abA	816	aA	789	aA	462	aA	459	aA
3	6,61	aA	6,49	bB	799	aA	722	aA	452	aA	438	aA
7	6,49	bA	5,75	cB	730	a	-	-	444	a	-	-

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias ($P < 0,05$)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias ($P < 0,05$)

Pelo contrário, o tempo de refrigeração não teve efeito significativo em nenhum dos parâmetros da coagulação ao longo dos dias de refrigeração (Quadros VI e VII); entre as duas temperaturas também não apresentou diferenças significativas. No entanto, deve referir-se que não se apresentam resultados para os sete dias de conservação a 8 °C uma vez que o leite se apresentou já coagulado ou em condições de coagulação extremamente rápida, não reconhecida pelo Optigraph, com se pode deduzir dos valores de pH obtidos. Cousin e Marth (1977) também não puderam medir o pH ao fim de oito dias de refrigeração, em leite de vaca cru refrigerado a 4 °C, pois já tinha coagulado.

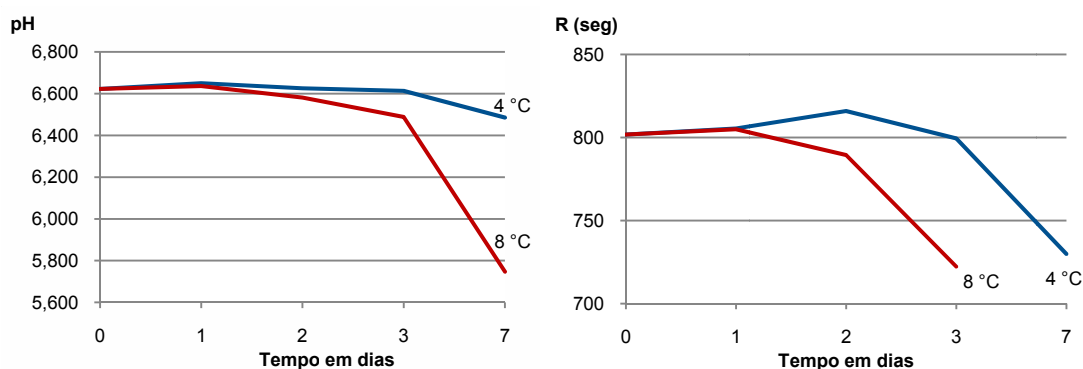


Figura 4 – Evolução do pH e do R ao longo do tempo de refrigeração para as duas temperaturas.

No entanto, apesar de não se registarem diferenças estatisticamente evidentes, houve uma variação no R ao longo da refrigeração. Os valores diminuem a partir do segundo dia e as diferenças entre temperaturas de refrigeração vão aumentando, evolução que está intimamente relacionada com a evolução do pH, como se referiu anteriormente (Figura 4). Estas diferenças podem condicionar a interpretação de outros parâmetros da coagulação sobre os quais têm efeito directo, como, por exemplo, o A_{20} (Quadro VII, Figura 5), pois se a coagulação começar perto dos 20 minutos o valor de A_{20} será menor que numa coagulação

que comece mais cedo, efeito que se atenua com o tempo, como se poderá observar a partir do A_{40} .

QUADRO VII – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – A_{20} e A_{40} .

Tempo (dias)	A_{20}				A_{40}			
	4 °C		8 °C		4 °C		8 °C	
0	4,43	aA	4,43	aA	10,75	aA	10,75	aA
1	4,68	aA	4,33	aA	10,84	aA	10,61	aA
2	4,35	aA	4,47	aA	10,87	aA	10,69	aA
3	4,54	aA	5,33	aA	10,58	aA	11,21	aA
7	5,23	a	-	-	11,37	a	-	-

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias ($P < 0,05$)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias ($P < 0,05$)

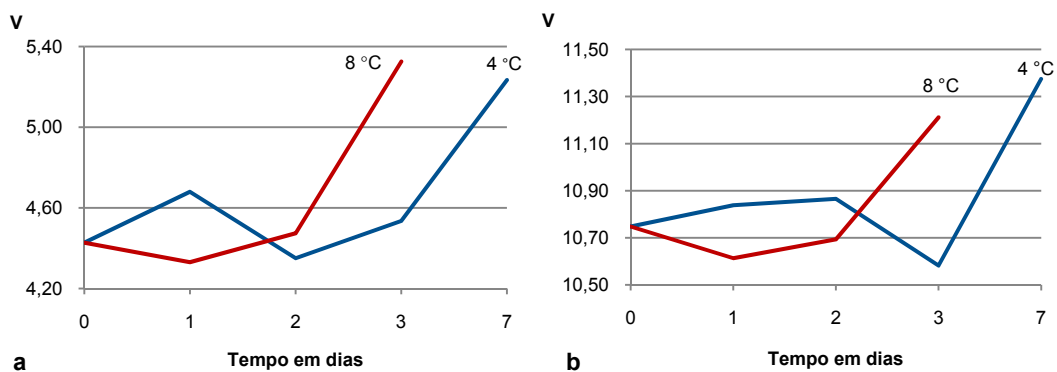


Figura 5 – Evolução de A_{20} (a) e A_{40} (b) durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.

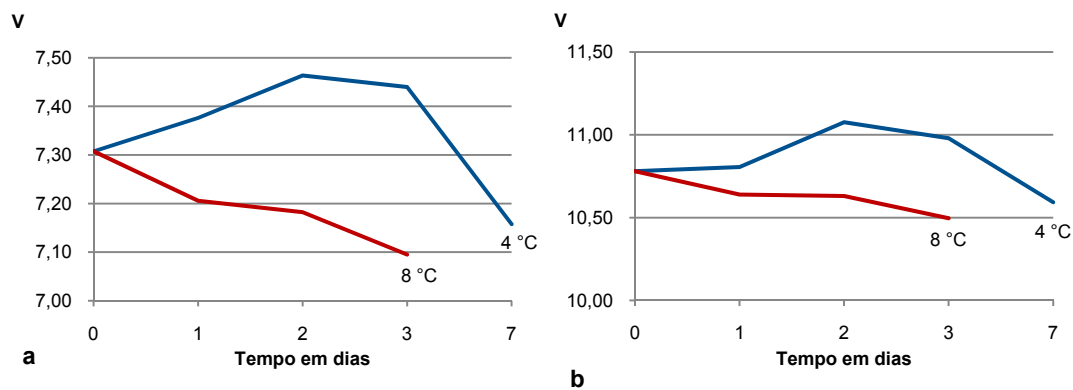
A evolução do AR e do A_{2R} (Quadro VIII e Figura 6) não revela diferenças estatisticamente significativas em função do tempo e da temperatura de refrigeração, embora a tendência seja de diminuição da consistência com o tempo de refrigeração, quando esta se efectuou a 8 °C, mantendo-se estabilizada para os 4 °C. Apesar da coagulação do leite refrigerado a 8 °C começar mais cedo (R inferior), não foram obtidas coalhadas mais consistentes em relação às coalhadas obtidas a partir do leite refrigerado a 4 °C.

Quadro VIII – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação – AR e A2R.

Tempo (dias)	AR		A2R					
	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C				
0	7,31	aA	7,31	aA	10,78	aA	10,78	aA
1	7,38	aA	7,21	aA	10,81	aA	10,64	aA
2	7,46	aA	7,18	aA	11,08	aA	10,63	aA
3	7,44	aA	7,09	aA	10,98	aA	10,50	aA
7	7,16	a	-	-	10,59	a	-	-

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

**FIGURA 6** – Evolução do AR (a) e do A2R (b) durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.

Um dos efeitos identificados na bibliografia referentes ao uso da refrigeração, que é a formação de coalhadas menos consistentes, não é, aqui, imediatamente identificado, uma vez que as consistências inferiores, padronizadas aos valores de R, se verificam para a refrigeração a 8 °C. A consistência da coalhada obtida pelo leite refrigerado a 4 °C passa de 7,31 e 10,78 para 7,44 e 10,98, respectivamente para os parâmetros AR e A2R, isto é, sobe ligeiramente ao fim dos três dias. O mesmo não acontece para o leite refrigerado a 8 °C, pois a consistência desce, em média, respectivamente 0,21 e 0,28 Volt.

No entanto, ao fim de 40 minutos de ensaio, a consistência da coalhada (A_{40}) diminuiu para o leite refrigerado durante três dias a 4 °C, o que significa que, na situação em que o pH teve menor influência na coagulação (conservação a 4 °C), a agregação micelar foi mais lenta para maior tempo de refrigeração, facto também indicado pelo parâmetro 0K20 (Quadro VI, Figura 7), o que pode indicar diminuição da aptidão do leite à coagulação, a qual não se revelou, no entanto, significativa. De la Fuente *et al.* (1997) não observaram mudanças na firmeza da coalhada obtida medida pelo Formagraph, mas uma diminuição na

velocidade de agregação micelar de 25 % para leite de ovelha refrigerado dois dias a 3 °C. Na realidade a diferença obtida foi pequena e poderá ser eventualmente recuperada no fabrico, por controlo das condições a utilizar. Infelizmente, diferenças destas ou até superiores não são, normalmente, corrigidas pelo fabrico pois não é efectuado qualquer controlo a não ser do tempo estipulado para a coagulação.

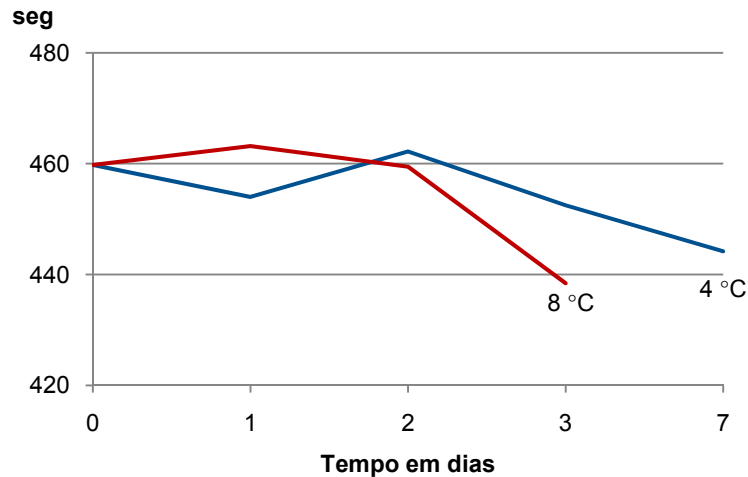


FIGURA 7 – Evolução de 0k20 durante o tempo de refrigeração para as duas temperaturas.

Estas diferenças na consistência da coalhada parecem, assim, estar muito relacionadas com o pH, o qual é reflexo da evolução da flora microbiana; a 8 °C existe um maior crescimento de microrganismos, nomeadamente psicrotróficos (será demonstrada mais á frente), que produzem enzimas proteolíticas que podem digerir a rede proteica formada durante a coagulação, podendo contribuir para diminuir a sua consistência e a respectiva resistência ao trabalho mecânico, durante o dessoramento e prensagem.

Em resumo, podemos dizer que a refrigeração não afectou significativamente a aptidão do leite de ovelha em estudo para a coagulação, o que também está em concordância com a escassa bibliografia disponível consultada, que refere que o leite de ovelha parece não ser afectado pelo frio, pelo menos com o impacto que se verifica para o leite de vaca. De facto, Raynal e Remeuf (2000) referem que o leite de ovelha mostra grande estabilidade a nível micelar ao fim de 48h de refrigeração a 4 °C e, como reflexo disso, as propriedades tecnológicas não se alteram substancialmente.

3.1.2. Coagulação com extracto de cardo.

Como referimos, recorreu-se à utilização do extracto de cardo para aproximar as condições de ensaio às condições de fabrico na queijaria, o que tem a vantagem de se poder estudar o tema da aptidão tecnológica a partir de relações enzima/substrato mais consentâneas com a utilização real do leite de ovelha na maior parte das tecnologias tradicionais de fabrico de queijo.

QUADRO IX – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados – pH, R, AR, A2R e 0K20.

	pH	R	AR	A2R	0K20
Tempo (dias)	**	**	ns	ns	**
Temperatura (°C)	**	**	ns	ns	ns
Tempo * Temperatura	**	*	ns	ns	ns

** → Muito significativo ($p < 0,01$); * → significativo ($p < 0,05$); ns → não significativo

Como podemos verificar no Quadro IX, ocorreram algumas diferenças a nível da influência dos factores em estudo (tempo e temperatura de refrigeração). Os efeitos a nível do pH foram idênticos, altamente significativos para os dois factores e sua interacção ($P < 0,01$). O tempo de refrigeração passou a afectar muito significativamente ($P < 0,01$) o início da floculação (R) e a velocidade de agregação micelar (0K20), continuando a não afectar significativamente os parâmetros de consistência dependentes de R (AR e A2R). A temperatura de refrigeração passou também a afectar muito significativamente ($P < 0,01$) o R. A conjugação dos dois factores apenas influencia significativamente o R ($P < 0,05$).

A coagulação teve um início muito mais tardio quando comparada com a dos ensaios anteriores, com quimosina, devido ao coagulante e à proporção utilizada (a força coagulante é menor em consequência da sua concentração), o que parece destacar os efeitos do tempo e da temperatura de refrigeração.

O *software* do Optigraph permite a visualização de outros parâmetros da coagulação. Como o começo tardio da agregação micelar tornou os parâmetros de consistência A_{20} e A_{40} insuficientes para analisar com maior rigor a evolução da coagulação, acrescentámos à análise os parâmetros A_{30} , A_{40} , A_{50} , A_{60} e A_{90} , os quais nos pareceram mais adequados para completar a análise destes ensaios de coagulação.

Quadro X – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados – A₂₀, A₃₀, A₄₀, A₅₀, A₆₀ E A₉₀.

	A ₂₀	A ₃₀	A ₄₀	A ₅₀	A ₆₀	A ₉₀
Tempo (dias)	**	**	**	**	**	ns
Temperatura (°C)	**	**	**	*	ns	ns
Tempo * Temperatura	**	**	ns	ns	ns	ns

**→ Muito significativo (p <0,01); * → significativo (p <0,05); ns → não significativo.

No Quadro X estão apresentados os níveis de significância para a influência dos factores em estudo nos parâmetros de consistência em função do tempo de ensaio de coagulação. Podemos observar que o tempo de refrigeração tem um efeito muito significativo (P <0,01) para o A₂₀, A₃₀, A₄₀, A₅₀ e A₆₀, tendo apenas a temperatura de refrigeração um efeito muito significativo (P <0,01) para o A₂₀, A₃₀ e A₄₀ e significativo (P <0,05) para o A₅₀. A interacção dos dois factores demonstra um efeito muito significativo (P <0,01) para o A₂₀ e o A₃₀. Ou seja, praticamente em todas as situações, a influência dos factores faz-se sentir sobretudo na fase enzimática da coagulação, mas esse efeito estende-se para a fase de agregação micelar em função do tempo de fabrico. Nuns casos, mais cedo, e noutros, mais tarde, a refrigeração afecta a evolução da consistência do gel mas a tendência é para que não existam diferenças significativas para o final dos ensaios, Se considerarmos que a coagulação nos fabricos tradicionais decorre por um tempo global de 50-70 minutos, vemos que o tempo de refrigeração, factor para o qual é mais sensível a variação do pH, é um factor importante. A temperatura também o é mas o seu efeito quase que se esbate para o final da coagulação. A interacção revela um efeito menor provavelmente porque a temperaturas diferentes o efeito do tempo será também diferente, certamente mais significativo a 8 °C do que a 4 °C.

Quadro XI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – R e 0K20.

Tempo (dias)	pH				R				0K20			
	4 °C		8 °C		4 °C		8 °C		4 °C		8 °C	
0	6,62	aA	6,62	aA	1548	aA	1548	aA	653	aA	653	aA
1	6,65	aA	6,64	aA	1528	aA	1503	aA	645	aA	643	aA
2	6,63	aA	6,58	abA	1521	aA	1406	aA	631	aA	612	aA
3	6,61	aA	6,49	bB	1460	abA	1161	abA	617	aA	551	aA
7	6,49	bA	5,75	cB	1098	bA	838	bA	546	aA	498	aA

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Estas considerações estão patentes no Quadro XI, onde temos uma descrição mais pormenorizada dos efeitos dos factores ao longo do tempo sobre os parâmetros em estudo. O pH é referido na bibliografia como um factor com muita influência no início da coagulação (R), a qual podemos confirmar ao observar no Quadro referido. Podemos confirmar que, ao 3º dia, o pH começa a variar de forma significativa ($P < 0,05$), o mesmo acontecendo para o R. Ao observar a Figura 8 pode verificar-se a relação entre o efeito sobre o pH e sobre o R, notando-se que, a 8 °C, o pH de 6,50, se atinge entre os dois e três dias de refrigeração. O parâmetro 0K20, talvez o que poderia indicar eventuais efeitos da refrigeração, não sofre efeitos significativos ao longo da refrigeração, embora decresça um pouco, como se pode verificar na Figura 9.

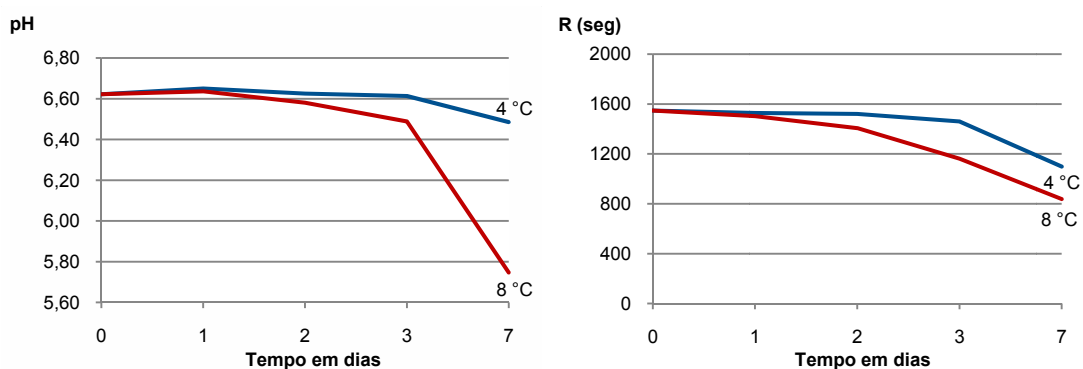


Figura 8 – Evolução do pH e do R durante a refrigeração para as duas temperaturas.

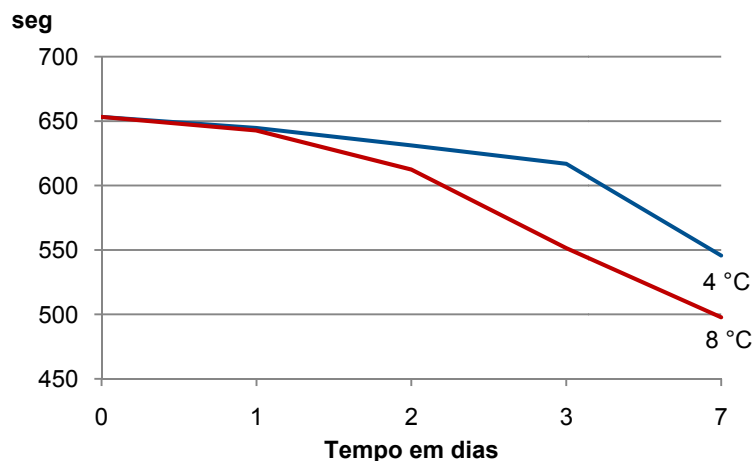


Figura 9 – Evolução do 0k20 durante a refrigeração para as duas temperaturas.

A 4 °C, para qualquer dos tempos de refrigeração, o início da coagulação é mais lento do que a 8 °C, e a taxa de agregação micelar é também menor, o que significa uma coagulação mais lenta, e que faz com que a consistência do gel incorporando o efeito do início da floculação (AR e A2R) seja superior, uma vez que é medida mais tarde. De facto, através do

Quadro XII podemos observar que os valores de AR e de A2R não sofrem efeitos significativos ao longo da refrigeração, embora possamos verificar a ocorrência de uma diferença na consistência da coalhada no leite com sete dias de refrigeração, sendo a que foi obtida pela coagulação do leite refrigerado a 8 °C menor, o que se torna mais facilmente observável na Figura 10.

QUADRO XII – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – AR e A2R.

Tempo (dias)	AR		A2R	
	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C
0	8,58 aA	8,58 aA	12,60 aA	12,60 aA
1	8,67 aA	8,43 aA	12,96 aA	12,60 aA
2	8,73 aA	8,37 aA	13,14 aA	12,73 aA
3	8,51 aA	8,16 aA	12,98 aA	12,65 aA
7	7,95 aA	7,63 aA	12,25 aA	11,18 aA

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

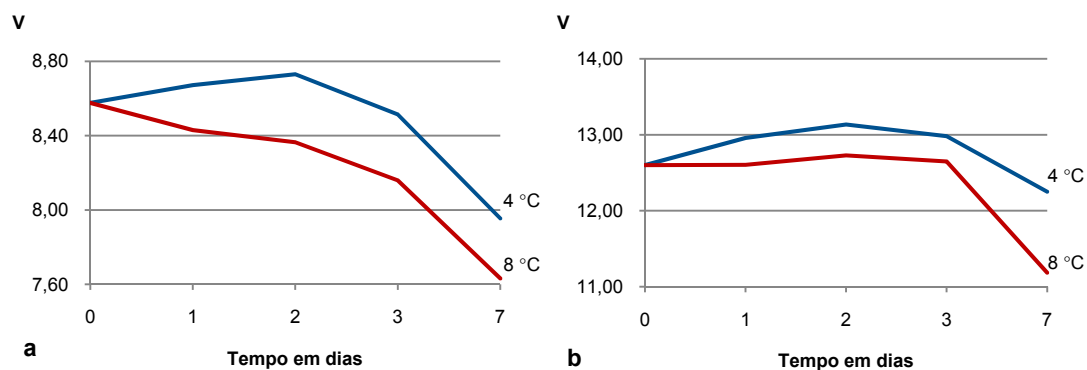


FIGURA 10 – Evolução de AR (a) e A2R (b) ao longo do tempo de refrigeração para as duas temperaturas.

Nestas novas condições de ensaio, o início da floculação verifica-se entre os 20 e os 30 minutos (Quadro XIII), tal como nas tecnologias tradicionais, excepto quando os valores de pH são acentuadamente baixos (Quadro XI), mesmo inferiores ao aceitável para o leite de fabrico. Como se pode ver no Quadro XIII, as médias do A_{20} são 0 em praticamente todos os tempos de refrigeração, o que pode ter influenciado os níveis de significância.

QUADRO XIII – Efeito do tempo de refrigeração e da refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – A₂₀, A₃₀ e A₄₀.

Tempo (dias)	A ₂₀		A ₃₀		A ₄₀							
	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C						
0	0,00	bA	0,00	bA	1,83	bA	1,83	cA	5,39	bA	5,39	bA
1	0,00	bA	0,00	bA	2,00	bA	2,16	bcA	5,59	bA	5,62	bA
2	0,00	bA	0,00	bA	2,07	bA	3,01	bcA	5,69	abA	6,46	bA
3	0,00	bA	1,21	bA	2,52	bA	5,46	bA	6,11	abA	8,80	abA
7	2,27	aA	6,04	aB	6,54	aA	10,29	aB	9,16	aA	10,72	aA

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Com a observação dos Quadros XIII e XIV também se pode verificar que as diferenças na consistência da coalhada ao longo do tempo de refrigeração se vão atenuando ao longo da coagulação, deixando de ser significativas a partir do A₅₀, de igual modo, as diferenças significativas em função da temperatura de refrigeração verificadas para A₂₀ e A₃₀ para os sete dias de refrigeração deixam de existir. Note-se que apesar das diferenças apontadas não serem significativas não significa que sejam inexistentes, pois ao observar os Quadros verifica-se que estas existem apenas são mais pequenas (Figura 11).

QUADRO XIV – Efeito do tempo e da temperatura refrigeração nos parâmetros da aptidão do leite para a coagulação com extracto de cardo – A₅₀, A₆₀ e A₉₀.

Tempo (dias)	A ₅₀		A ₆₀		A ₉₀							
	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C						
0	8,11	aA	8,11	aA	10,24	aA	10,24	aA	13,96	aA	13,96	aA
1	8,35	aA	8,04	aA	10,49	aA	10,37	aA	14,13	aA	13,98	aA
2	8,50	aA	9,10	aA	10,68	aA	11,11	aA	14,33	aA	14,86	aA
3	9,16	aA	11,26	aA	10,96	aA	13,12	aA	14,45	aA	15,64	aA
7	11,19	aA	12,27	aA	12,36	aA	12,73	aA	14,47	aA	14,68	aA

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

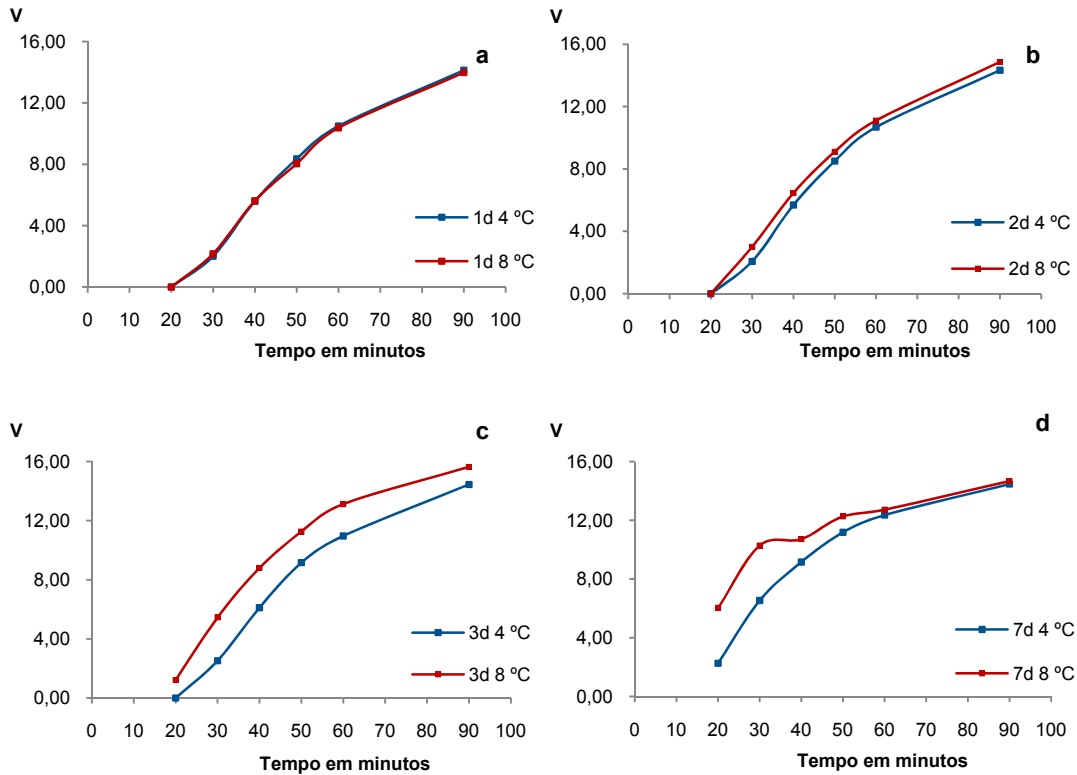


FIGURA 11 – Evolução da consistência do gel durante a coagulação de leite com 1, 2, 3 e 7 dias de refrigeração, para as duas temperaturas de refrigeração, a, b, c e d respectivamente.

As diferenças entre as duas temperaturas ao 7.º dia vão diminuindo ao longo da coagulação: 3,77; 3,75; 1,56; 1,08; 0,37; 0,21; aos 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos respectivamente. Tal fenómeno pode ser facilmente visualizado na Figura 11(d).

3.2. EFEITO DA REFRIGERAÇÃO NA EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA.

O outro factor relevante para o fabrico de queijo com leite cru é, como referimos, a população microbiana do leite, factor este que pretende valorizar em termos de especificidade do produto final. Uma concentração elevada de microrganismos, devida a uma deficiente condução do processo de obtenção do leite, quer devida a uma incorrecta conservação do leite, pode tornar-se muito prejudicial para o queijo.

Neste trabalho foi igualmente estudado o efeito das condições de conservação do leite de ovelha na evolução da população microbiana, através da evolução da população microbiana mesófila, bem como no desenvolvimento da população psicrótrfica. Este ultimo grupo de

microrganismos é susceptível de criar grandes problemas ao nível da produção de queijo de leite cru.

Como podemos ver no Quadro XV o tempo de refrigeração e a temperatura revelaram ambos um efeito muito significativo ($P < 0,01$), já esperado, na evolução tanto da população psicotrófica como da mesófila. A interacção dos dois factores apenas tem efeito muito significativo ($P < 0,01$) para a evolução da população psicotrófica, sendo apenas significativo ($P < 0,05$) para a evolução da flora mesófila.

Como é referido na bibliografia, as baixas temperaturas de armazenamento do leite têm grande influência na evolução da flora microbiana do leite, limitando o seu crescimento, criando, no entanto, condições adequadas ao desenvolvimento da flora psicotrófica. Também é referido que a evolução da flora mesófila acidificante tem efeito no pH do leite, tal como podemos verificar no Quadro XV.

Quadro XV – Nível de significância dos diferentes factores em estudo nos parâmetros avaliados.

	pH	Log UFC/mL (21 °C)	Log UFC/mL (30 °C)
Tempo (dias)	**	**	**
Temperatura (°C)	**	**	**
Tempo * Temperatura	**	**	*

**→ Muito significativo ($p < 0,01$); * → significativo ($p < 0,05$); ns → não significativo

No Quadro XVI estão representadas as mudanças ocorridas na evolução da flora microbiana durante o tempo e temperatura de refrigeração. Verifica-se que, a 8 °C, ambas as populações microbianas (mesófila e psicotrófica) aumentaram 2 ciclos logarítmicos em três dias de refrigeração, aumento este que se torna significativo ao segundo dia, enquanto a 4 °C, como seria de esperar, esse aumento é menor, sendo significativo ao terceiro dia. Kumaresan *et al.* (2007) observaram que, em leite cru de vaca, refrigerado a 2 °C, o crescimento dos psicotróficos apenas foi significativo do 5º dia para o 7º dia. Contudo, a refrigeração a 4 °C e a 7 °C proporcionou crescimentos altamente significativos ($P < 0,01$) entre os dias zero, três, cinco e sete.

Quadro XVI – Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no pH e nas contagens de psicrotróficos a 21 °C e de mesófilos totais a 30 °C.

Tempo (dias)	pH		Log UFC/mL (21 °C)				Log UFC/mL (30 °C)					
	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C	4 °C	8 °C				
0	6,62	aA	6,62	aA	5,14	cA	5,14	bA	5,45	bA	5,45	bA
1	6,65	aA	6,64	aA	5,26	bcA	5,61	bA	5,36	bA	5,83	bA
2	6,63	aA	6,58	abA	6,00	abA	6,78	aA	6,00	abA	6,81	aB
3	6,61	aA	6,49	bB	6,25	aA	7,38	aB	6,47	aA	7,33	aB
7	6,49	bA	5,75	cB								

Na mesma coluna, minúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Na mesma linha, para cada parâmetro, maiúsculas diferentes apontam diferenças significativas entre médias (P <0,05)

Ainda no Quadro XVI, podemos verificar que, ao 3º dia, a temperatura de refrigeração teve um efeito significativo na população de psicrotróficos, enquanto nos mesófilos esse efeito foi significativo desde o 2º dia de refrigeração. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Kumaresan *et al* (2007), que obtiveram nas contagens microbianas em leite cru de vaca, diferenças significativas, ao 3º dia para a refrigeração a 2 °C, 4 °C e 7 °C.

Um aspecto que parece relevante é a proximidade entre os níveis das populações mesófila e psicrotrófica no início de ensaio (zero dias), os quais, como já se referiu são elevados, um pouco superiores aos níveis regulamentares exigidos para leite destinada à produção deste tipo de queijo. Kumaresan *et al.* (2007) obtiveram contagens de psicrotróficos (*log*) de $3,66 \pm 0,05$, $4,96 \pm 0,06$ e $5,03 \pm 0,11$ para leite de vaca recolhido no local de produção, num entreposto de recolha e na indústria, respectivamente.

Estes resultados reflectem alguma falta de qualidade do leite, sobretudo no que se refere ao nível de psicrotróficos, embora a metodologia analítica adoptada neste trabalho utilize a temperatura de 21 °C para a contagem destes microrganismos, próxima dos 30 °C da contagem de mesófilos. Trata-se de uma opção que permite maior rapidez na obtenção dos resultados (24 h) em comparação com os dez dias de incubação a 6,5 °C do processo de referência. De acordo com Pereira *et al.* (2008) o ensaio a 21 °C permite obter a melhor correlação com os resultados obtidos através do método de referência.

De qualquer forma, a proporção elevada de psicrotróficos em relação aos mesófilos é uma situação potencialmente pouco favorável para a utilização do leite cru, quando se perspectiva uma conservação sob refrigeração. Com efeito, sob condições deficientes de refrigeração, os problemas têm tendência a agudizar-se, pois, como se pode observar na Figura 12, o efeito da temperatura de refrigeração é maior na evolução dos psicrotróficos do que para os mesófilos; a diferença entre as temperaturas para a evolução dos níveis entre

ambos os grupos é maior para o grupo de microrganismos que tem a capacidade de se desenvolver a temperaturas baixas.

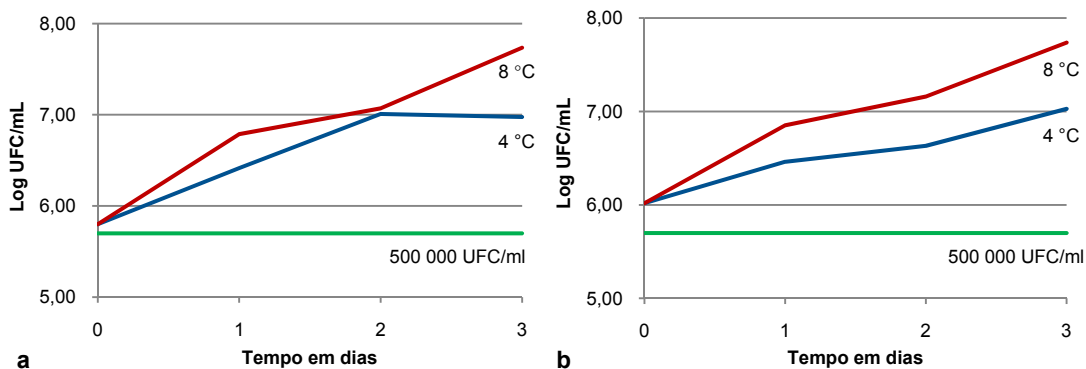


Figura 12 – Evolução da população mesófila (a) e da população psicotrófica (b) ao longo do tempo de refrigeração, para as duas temperaturas.

As diferenças nos crescimentos obtidos parecem, assim, uma boa razão para considerar 4 °C uma temperatura adequada de refrigeração. Os mesófilos registaram aumentos de 10 e 52 vezes, e os psicotróficos aumentaram 15 e 87 vezes, para 4 °C e 8 °C, respectivamente. Nuñez *et al.* (1981) obteve crescimentos de 81 vezes para os mesófilos totais e de 41 vezes para o psicotróficos, em leite de ovelha refrigerado a 4 °C. As diferenças verificadas entre os nossos valores e os valores de Nuñez *et al.* (1981), podem ser explicadas pela evolução das condições de ordenha, onde estão incluídos diversos aspectos, como a localização e a estação do ano em que são recolhidas as amostras, que segundo Silva *et al.* (2003), têm efeito significativo nos níveis microbianos iniciais e, por isso, na evolução que revelam ao longo da conservação.

A Figura 12 permite, também, verificar que a refrigeração a 4 °C é mais indicada para a conservação do leite, mantendo, um nível semelhante de contagens microbianas, mesmo no caso de leites com teores microbianos iniciais elevados. Para ambas as temperaturas, três dias de refrigeração conduzem a contagens microbianas muito elevadas, embora à temperatura de 4 °C, a contagem de mesófilos esteja apenas ligeiramente acima do que é, de certo modo, comum acontecer em leite de ovelha no fabrico de queijo.

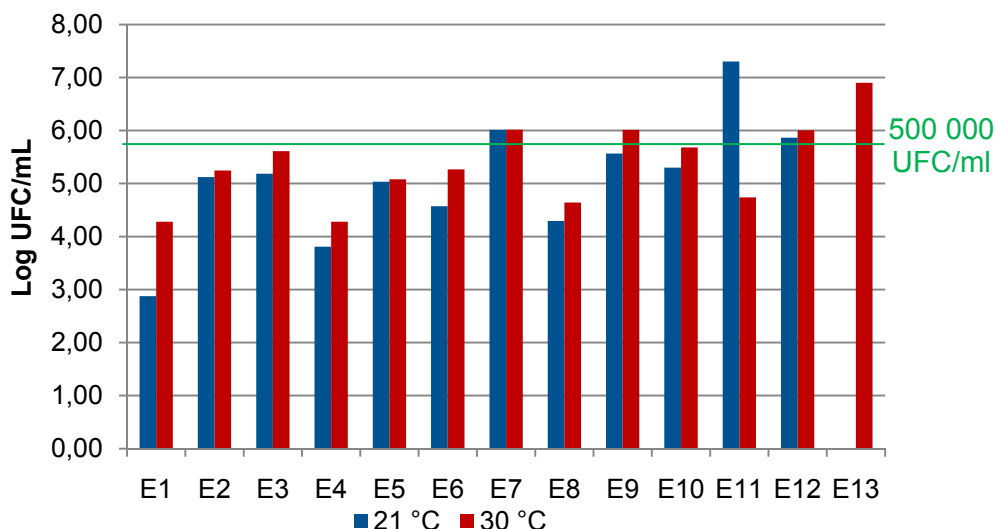


Figura 13 – Contagens iniciais de psicrotróficos e mesófilos, ao longo do estudo (E – ensaio).

Como é possível ver na Figura 13 poucos foram os ensaios que tiveram contagens iniciais de mesófilos acima do permitido pela regulamentação em vigor para o leite cru de ovelha, na produção, destinado ao fabrico de queijo, sem sofrer qualquer processamento térmico, embora estes valores permitidos por lei, no caso de alguns tipos de queijo possam mostrar-se mesmo assim problemáticos para o seu fabrico, pois o que conta na realidade é a flora microbiana na altura do fabrico, na queijaria. No Quadro XVII e nos gráficos no anexo IV, está bem representado que ao longo do tempo de refrigeração, mesmo quando temos contaminações baixas, estas tendem a subir e a passar mesmo os 500 000 UFC/mL. Podemos verificar que, ao 2º dia de refrigeração, mais de 80 % das amostras de leite refrigerado a 8 °C já tinham passado o limite referido, tanto de mesófilos como psicrotróficos. Por outro lado, para os leites refrigerados a 4 °C, nem ao 3º dia 80 % das amostras tinham chegado a esse limite.

Quadro XVII – Quadro-resumo do nº de ensaios que ultrapassam as 500 000 UFC/mL e respectivas percentagens.

Dias	Nº de ensaios				% de ensaios			
	4 °C		8 °C		4 °C		8 °C	
	21 °C	30 °C	21 °C	30 °C	21 °C	30 °C	21 °C	30 °C
0	3	4	3	4	23,1	30,8	23,1	30,8
1	2	6	4	7	15,4	46,2	30,8	53,8
2	6	8	11	11	46,2	61,5	84,6	84,6
3	8	9	13	13	61,5	69,2	100,0	100,0

No sentido de avaliar o significado tecnológico dos níveis microbianos no início dos ensaios e ao longo da refrigeração, foi utilizado o teste da lactofermentação, um teste indirecto e algo subjectivo, embora simples, pouco dispendioso e exigente em material e equipamento, que se baseia nas modificações que o leite sofre quando colocado a uma temperatura favorável aos microrganismos (35 °C). Ao fim de 24h, a observação do estado do leite permite um conjunto útil de indicações que podem ser interpretadas em função das situações.

Este teste foi desenvolvido há muito tempo, essencialmente para aferir da influência do tipo de flora microbiana, quer na avaliação da aptidão do leite para o fabrico de queijo por via da fermentação láctica, baseando-se na actividade acidificante da flora láctica naturalmente presente no leite, quer para detectar o eventual efeito da presença no leite de bactérias produtoras de gás e susceptíveis de criarem problemas de opado em queijo, quer ainda para testar a qualidade microbiológica de soluções enzimáticas coagulantes em fabricos baseados em coagulações enzimáticas ou mistas (Chavannes e Demont, 1945).

No caso do fabrico de Queijo de Azeitão e semelhantes, em que a actividade microbiana acidificante é importante para a qualidade do queijo no decurso da maturação (Vasconcelos, 1990) e que a presença de contaminantes mesófilos produtores de gás pode afectar essa mesma qualidade, esta prova simples é de extrema utilidade uma vez que permite avaliar, em conjunto com a prova de redução do azul de metileno, o tipo de flora microbiana dominante.

No presente trabalho, a utilização da prova da lactofermentação resumida aos últimos cinco ensaios de conservação, teve como finalidade, como se referiu, qualificar tipos de flora microbiana dominantes, no sentido de discernir se os dois grupos de microrganismos avaliados se sobrepunham ou se referiam a populações distintas de microrganismos.

Os resultados, resumidos no Quadro XVIII, com origem nos dados recolhidos na prova da lactofermentação (imagens no anexo III) indicam a existência de amostras de leite (E8) que não coagularam ao fim de 24 h a 35 °C, e que mantiveram esse padrão ao longo dos ensaios de refrigeração. Apenas ao fim de sete dias a 8 °C, a acidificação conduziu à coagulação do leite, o que sugere uma deficiência de flora microbiana acidificante no leite de origem, onde se incluem as bactérias lácticas, benéficas para o fabrico de queijo; ou seja, os níveis elevados de microrganismos mesófilos são susceptíveis de incluírem uma grande proporção de microrganismos psicrótrópicos.

Quadro XVIII – resumo dos resultados do teste de lactofermentação.

Tempo (dias)	Temperatura de refrigeração											
	4 °C						8 °C					
	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E8	E9	E10	E11	E12	E13
0	nc	nc	Cg	Cgp	Cgp	Cgp	nc	nc	Cg	Cgp	Cgp	Cgp
1	nc	C	Cg	CGp	CGp	Cgp	nc	Cg	Cg	CP	CGp	Cgp
2	nc	CGp	Cgp	CGp	CGp	Cgp	nc	Cg	Cgp	CgP	CGp	nc
3	nc	CGp	Cgp	CP	Cgp	nc	nc	Cg	Cgp	CP	Cgp	nc
7	nc	nc	nc	nc	CP	nc	CP	CP	Cgp	nc	CGP	nc

Legenda: nc – Não coagulado; C – coagulado; g – ligeira produção de gás; p – proteólise; G – produção de gás; P – proteólise intensa.

O padrão mais frequente, cujo exemplo se mostra na Figura 14, corresponde a leite que coagula em 24 h e que, mais a 8 °C do que a 4 °C, mostra contaminação e crescimento de flora microbiana produtora de gás, eventualmente coliformes, e proteolítica, o que poderá estar associado à presença abundante de psicrotróficos, não coagulando em 24 h ao fim de sete dias de conservação a 4 °C. De acordo com Bramley e Mckinnon (1990), a ausência de coágulo na prova de lactofermentação é indicativa de presença de resíduos de substâncias antimicrobianas ou da presença de um número baixo de células microbianas.

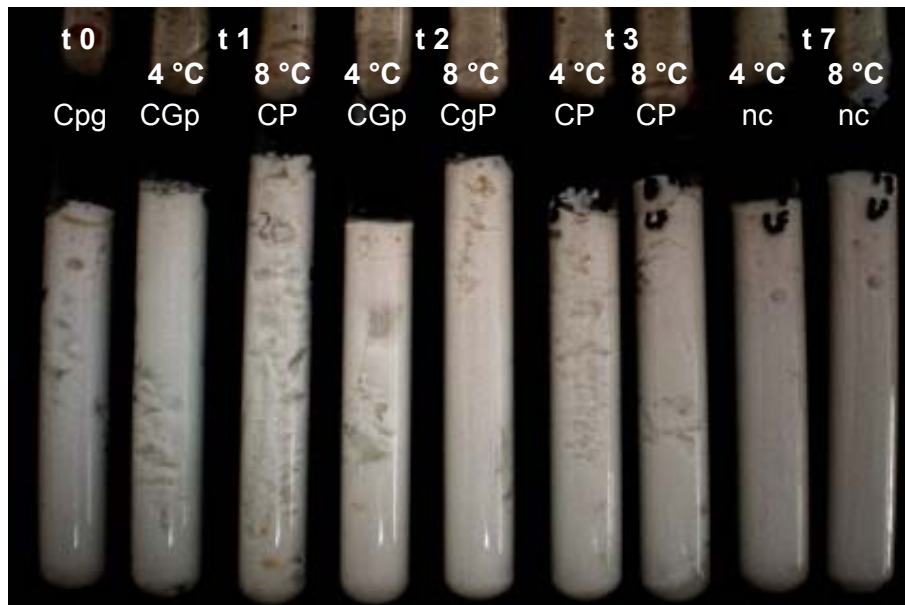


Figura 14 – Exemplo de um teste de lactofermentação.
(t0 a t7 – tempo de refrigeração em dias)

O Quadro XVIII mostra ainda que a refrigeração prolongada, sobretudo a 4 °C, é susceptível de alterar o tipo de flora microbiana dominante, no sentido do enriquecimento em flora não acidificante. Aos sete dias de refrigeração a 4 °C, o leite não coagulou na prova da lactofermentação, o que pressupõe inactivação deste tipo de flora. A 8 °C, a não coagulação não foi tão frequente, mas o acentuar da proteólise do leite foi uma nota importante nalguns ensaios.

Em suma, observou-se a diminuição do pH ao longo da refrigeração, devido à evolução da flora microbiana acidificante mesófila e, segundo Nuñez *et al.* (1981), também devido a bactérias lácticas psicrótrólicas. Essa diminuição foi mais acentuada a 8 °C do que a 4 °C, demonstrando que é possível refrigerar o leite a 4 °C até três dias sem alterações significativas; em contrapartida, ao fim de três dias a 8 °C, o valor de pH é inferior ao valor de 6,5, recomendado pela bibliografia para o fabrico de queijo.

O início da coagulação diminuiu, isto é, a coagulação ocorreu mais cedo, o que é, de certo modo, contrário ao que é referido pela bibliografia, visto que o frio tende a diminuir o tamanho da micela e a solubilizar o cálcio, tornado as micelas mais estáveis, o que dificulta a coagulação. Segundo Hui (1993), uma população superior a 10^8 UFC/ml de psicrótrólicas pode contribuir também para diminuir o tamanho da micela pela proteólise que se pode registar selectivamente ao nível das caseínas α e β , deixando a caseína κ mais vulnerável ao coalho (Knaut e Bruderer, 1965; Yanagiva *et al.*, 1973; DeBeukelar, 1975; Cousin, 1976; Cousin e Marth, 1976; Hui, 1993). Como anteriormente constatado por outros autores, e como já referimos, neste trabalho a evolução do pH terá eventualmente contrariado os efeitos negativos da refrigeração a nível do comportamento do leite face à coagulação.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, parece ser possível concluir que a refrigeração prolongada do leite, sobretudo a temperaturas pouco adequadas a esse processo de conservação, conduz a uma depreciação acentuada das condições microbiológicas para utilização do leite de ovelha cru para o fabrico de queijo, o qual já apresenta, em regra, condições difíceis quanto aos aspectos higiénicos. Desde que as contaminações do leite sejam minimamente prevenidas, a conservação sob refrigeração correcta permite dispor de matéria-prima pouco alterada microbiologicamente.

Um dos efeitos mais importantes da conservação do leite refere-se à evolução do pH, a qual, para além dos dois dias de conservação, e sobretudo a temperaturas pouco adequadas, como os 8 °C nos nossos ensaios, conduz a uma diminuição significativa do nível de pH, prejudicando o fabrico de queijo, quer pela via microbiana, quer pela via físico-química. Ao fim de sete dias a 8 °C, o leite apresenta-se mesmo coagulado ou com um nível de pH que dificulta o controlo da coagulação, afectando as fases posteriores do fabrico.

A aptidão à coagulação do leite de ovelha é, assim, afectada pelas condições mais desfavoráveis de conservação mas, até aos três dias de conservação, o leite de ovelha parece não sofrer alterações na sua estrutura proteica, ao contrário do que é referido generalizadamente para o leite de vaca, pelo menos a ponto de afectar significativamente o seu comportamento no que se refere à agregação micelar e, portanto, a nível das características da coalhada, embora esse efeito tenha sido detectado ligeiramente em condições de ensaio próximas das condições reais de fabrico, a partir dos dois dias de refrigeração. De facto, o leite conservado a 4 °C mostrou coalhadas menos consistentes do que quando a conservação se efectuou a 8 °C.

O maior efeito da refrigeração a nível da coagulação foi na fase enzimática e decorreu essencialmente da evolução do pH com a refrigeração. Não é uma surpresa, mas é importante a nível do controlo do processo de fabrico e deveria ser levado em conta nas queijarias; regra geral, a duração da fase enzimática da coagulação, que pode ser um excelente indicador do decurso da mesma e da projecção à fase adequada ao corte da coalhada, não é considerada.

Como já foi realizado em estudos sobre o leite de vaca, seria interessante realizar estudos mais aprofundados sobre o efeito da refrigeração sobre o leite de ovelha, procurar descobrir se temperaturas ainda mais baixas que os 4 °C seriam mais adequadas à conservação do leite, qual o efeito dos psicrotróficos sobre a fracção proteica no leite de ovelha, visto ser a que tem mais importância no fabrico de queijo, sendo esta bastante diferente da fracção proteica do leite de vaca, tanto a nível da composição como a nível organizacional das caseínas e não existirem estudos actuais sobre a matéria.

Em ordem a auxiliar o fabrico tradicional de queijo a partir de leite cru de ovelha, encontrar possíveis formas de contrariar os efeitos da refrigeração, seja a nível das etapas de fabrico, seja a nível das condições de conservação da matéria-prima, o leite de ovelha.

6. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L.** (1975) Effect of Psychrotrophic Bacteria from Raw Milk on Milk Proteins and Stability of Milk Proteins to Ultrahigh Temperature Treatment. *Journal of Dairy Science*. **59**, No. 5.
- ALAIS, C.** (1985) *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Versão espanhola por Don António Lacasa Godina. Editorial Reverte, S.A., Barcelona.
- ALI, A. E.; ANDREWS, A. T.; CHEESEMAN, G. C.** (1980a) Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. *Journal of Dairy Research*, **47**, 371-382. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- ALI, A. E.; ANDREWS, A. T.; CHEESEMAN, G. C.** (1980b) Factors influencing casein distribution in cold-stored milk and their effects on cheese-making parameters. *Journal of Dairy Research*, **47**, 383-391. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- ALVES, S. M. P.** (2003) *Efeito de alguns factores tecnológicos na coagulação do leite com extractos de cardo Cynara cardunculus L.*. Trabalho final da Licenciatura em Engenharia Agro-Industrial, ISA. Lisboa.
- ALVES, S. M. P.; MARTINS, A. P. L.; MOURATO, M. P.; VASCONCELOS, M. M. e FONTES, A. M. L.** (2004) Effect of clotting agent on coagulation properties of sheep milk. *Symposium Internacional "El futuro de los sectores lecheros ovino y caprino"*. 28-30, 4-15, FIL/IDF, CIHEAM, Zaragoza.
- ANTILA, V.** (1971) Evaluation of bulk tank milk and its suitability for dairy use. *Suom. Elain*. **77**:259. (*Dairy Sd. Abstr.* **33**: 5643). Citado por Cousin e Marth, 1976.
- ASSENAT, L.** (1985) Le laits de brebis. Composition et propriétés. *In*: **LUQUET, F.M.** (coord.) (1985) *Laits et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre*. Vol.I – *De la mamelle a la laiterie*, 281-319. APRIA, Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. Citado por Alves, 2003.

- BARBOSA, M.** (1983) O cardo (*Cynara cardunculus L.*) como coagulante vegetal. 1º Congresso Nacional das Indústrias Agro-Alimentares, 22 a 25 de Março de 1983, Lisboa. DTIA, nº9, *Comunicações e Conferências* – 9. LNETI, ITI, DTIA, Lisboa. Citado por Alves, 2003.
- BENCINI, R.; JOHNSTON, K.** (1997) Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Sheep Dairy News*, **14 (2)**, Summer, 29-30. Citado por Alves, 2003.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H.** (1988) Estimation of potencial shelflife of parturized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *Journal of Food Protection*, Ames, **v.48**, n.8, p.663-667. Citado por Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08
- BLOQUE, R. VEILLET-PONCET, L.** (1980) Evolution et détermination de la flore bactérienne d'un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonctuion du temps. *In: Le lait*, Lx, 474-486. Citado por Infante, 1998.
- BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H.** (1990) *The microbiology of raw milk*. 2.ed. In: **ROBINSON, R. K.** (Ed.). *The microbiology of milk*. London, UK: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 163-208. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- BRULE, G LENOIR, J.** (1990) La coagulation du lait. *In: ECK, A.* (coord.) (1990) *Le fromage*. 2^{ème} ed., pp. 1-21. *Technique et Documentation* – Lavoisier, Paris. Citado por Alves, 2003.
- BRULE, G. LENOIR, J.** (1987) A Coagulação do leite. *In: O Queijo*. Colecção EuroAgro – Publicações Europa-América. Citado por Dias, 1998.
- BURDOVÁ, O.; BARANOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; RÓŽAŇSKA, H.; ROLA, J. G.** (2002) Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **46**, 325-329.
- ČANIGOVÁ M.** (1998) The effect of psychrotrophic microflora for manufacture of cheeses. *Mliekárstvo*, **29**, 29-30. Citado por Burdová *et al.*, 2002.

- ČANIGOVÁ, M.; RAJTAROVÁ, K.; KAKALEJ, M.** (2002) The influence of selected detergents on psychrotrophic microflora isolated from milk. Proceedings of lectures and posters. Milk and milk products at the beginning of new millenium. *Hygiēna Alimentorum*, **22**, 54-58. Citado por Burdová et al., 2002.
- CEMPÍRKOVÁ, R.** (2002) Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Vet. Med. – Czech*, **47(8)**: 227–233.
- CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W.** (1994) Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. **34**, p. 1-30, 1994. Citado por Pinto et al., 2006.
- CHANDLER R. E.; MCMEEKINT, A.** (1985): Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, **40**, 37–41. Citado por Cempírková, 2002.
- CHAVANNES, D.; DEMONT, P.** (1945) *Contrôle du lait et des principaux produits laitiers* (3^{ème} ed.). Librairie Rouge & C^{ie} S. A., Lausanne.
- CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T.** (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v. **13**, p. 255-275. Citado por Pinto et al., 2006.
- COLLINS, E. B.** (1981) Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, Baltimore, **64**, n.1, p.157-160.
- COUSIN, M. A.** (1976) *Psychrotrophic growth in milk and its use to manufacture cultured dairy products*. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison. Citado por Cousin e Marth, 1976.
- COUSIN, M. A.** (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Prot.*, **45**, 172-207. Citado por Infante, 1998, por Silveira et al., 2005, consultado a 09/10/08, por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007 e por Pinto et al., 2006.
- COUSIN, M. A.; MARTH, E. H.** (1976) Psychrotrophic Bacteria Cause Changes in Stability of Milk to Coagulation by Rennet or Heat. *Journal of Dairy Science*, **60**, 7:1042-1047.

- CRAVEN, H. M. MACAU-LEY, B. J.** (1992) Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage. I. Identification of types. *Journal of Dairy Techonology, Australian*, v.47, n.1, p.38-45. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007.
- CRAVEN, H. M. MACAU-LEY, B. J.** (1993) Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. *Journal of Dairy Techonology, Australian*, v.47, n.1, p.50-55. Citado por Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08.
- CREAMER, L. K.; BERRY, G. P.; MILLS, O. E.** (1977) A study of the dissociation of β -casein from the bovine casein micelle at low temperature. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 12, 58-66. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- CROMIE, S.** (1992) Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. The Australian. *J. Dairy Technology*, 47, 96-100. Citado por Infante, 1998.
- DALGLEISH, D.G.** (1999) The enzymatic coagulation of milk. *In: FOX, P. F.* (ed.) (1993) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol.1. *General Aspects*. 2nd ed., pp 69-100. Chapman & Hall, London, UK..
- DANZART, M.** (1986) Univariate procedures. *In: PIGGOT, J. R.* (ed.) *Statistical procedures in food research*. Elsevier, London, p.19-59.
- DAVIES, D. T.; LAW, A. J. R.** (1983) Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micelar size and milk temperature. *Journal of Dairy Research*, 50, 67-75. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- DE LA FUENTE, M. A.; REQUENA, T.; JUAREZ, M.** (1997) salt balance in ewe's and goat's milk during storage at chilling and freezing temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 82-88. Citado por Raynal e Remeuf (2000).
- DEBEUKELAR, N. J.** (1975) *Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria*. M. S. thesis. University of Wisconsin, Madison. Citado por Cousin e Marth, 1976.
- DeBEUKELAR, N. J.; COUSIN, M. A.; BRADLEY JR., R. L.; MARTH, E. H.** (1976) Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol. 60, No. 6., p.857-861.

- DELACROIX-BUCHET, A.; BARILLET, F. LAGRIFFOUL, G.** (1994) Caractérisation de l'aptitude framagère des laits de brebis Lacaune à l'aide d'un Formagraph. *Lait*, **74**, 173-186. Citado por Alves, 2003.
- DIAS, J. J. M.** (1998) *Estudo de alguns parâmetros microbiológicos e tecnológicos do Queijo de Serpa*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. ISA, Lisboa.
- DOGAN, B.; BOOR, K. J.** (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:130-138. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007.
- DOUSSET, X.; DEMAIMAY, M.; RAVAUD, C.; LEVESQUE, A.; PINET, X. KERGO, Y.** (1988) Influence de la temperature de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cors de son stockage. *Le Lait*, **68** (2), 143-156. Citado por Infante, 1998.
- DZUREC, D. J.; ZALI, R. R.** (1995) Effect of heating, cooling, storing milk on casein and whey proteins. *Journal of Dairy Science*, **68**, 273-280. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- ECK, A.** (1987) *O queijo*. Volume 1. Título original: *Le fromage. Technique et Documentation* – Lavoisier, Paris. Traduzido por Renato Casquilho. Revisão técnica do Eng. Agrônomo Bento Ripado. Coleção Euro-Agro. Publicações Europa-América.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G.** (2000a) Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology*, v. **57**, p. 99-106. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G.** (2000b) Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*, v. **10**, p. 325-331. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G.** (1998) Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, v. **8**, p. 829-834. Citado por Pinto *et al.*, 2006.

- EUILLAT, S.; LE GUENNEC, S. OLSSON, A.** (1976) Contribution à l'étude de la protéolise des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages à pâte molle. *Le Lait*, **558**, 521-536. Citado por Infante, 1998.
- FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A.** (1986) Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* **53**:139–177. Citado por Fajardo-Lira e Nielsen, 1998.
- FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S.** (1998) Effect of Psychrotrophic Microorganisms on the Plasmin System in Milk. *J Dairy Sci* **81**:901–908.
- FOX, P. F.** (1981) Heat-induced changes in milk preceding coagulation. *Journal Dairy Science*, v. **64**, p. 2127-2137. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- FOX, P. F.** (1982) *Heat-induced coagulation of milk. Pages 189–228 in Developments in Dairy Chemistry-1.* P. F. Fox, ed. Appl. Sci. Publ., London, England. Citado por Fajardo-Lira e Nielsen, 1998.
- FOX, P. F.** (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* **72**:1379–1400. Citado por Fajardo-Lira e Nielsen, 1998 e por Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08.
- GONZÁLEZ, J. P. E.; MARTÍNEZ, A. C.; SORIA, A. C.; SÁNCHEZ, R. A.; MARTÍNEZ, C. E. S.; ANGULO, V. M. LÓPEZ, S. A.** (1995) Estudio de la calidad de la leche utilizada en queserías industriales inscritas en la denominación de origen de Queso Manchego *Alimentaria*, **266**: 19-23. Citado por Infante, 1998.
- GREEN, M. L. GRANDISON, A.S.** (1993) Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. *In: FOX, P. F.* (ed.) (1993) *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* Vol.1. *General Aspects.* 2nd ed., pp 101-140. Chapman & Hall, London, UK. Citado por Alves, 2003.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D.** (1981) Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal Applied Bacteriology*, v. **50**, p. 289-303. Citado por Pinto *et al.*, 2006.

- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D.** (1987) Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. *Food Microbiology*, v. **4**, p. 285-291. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; WEST, I. G.; MUIR, D. D.** (1988) The effect extend low - temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology*, v. **5**, p. 75-87. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- GRIPON, J.** (1983) Caractérisation de la dégradation des protéines du lait par les bactéries psychrotrophes. Utilisation des techniques électrophorétiques. *La Technique Laitière*, **974**, 31-34. Citado por Infante, 1998.
- GUNASEKERA, T. S.; DORSCH, M. R.; SLADE, M. B.; VEAL D. A.** (2003) Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using rRNA directed probes. *J. Appl. Microbiol.* **94**:936-945. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007.
- HADBAVNÿ, M.; KORIMOVÁ, J.; KORIM, P.; KREMEŇ, J.** (2002) Economic and organizing problems of cow milk production. Proceedings of lectures and posters, Milk and milk products at the beginning of new millenium. *Hygiena Alimentorum*, **22**, 237-239. Citado por Burdová *et al.*, 2002.
- HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M.** (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, n°22, p. 7162-7168.
- HICKS, C. L.; ALLAUDIN, M.; LANGLOIS, B. E.; O'LEARY, J.** (1982) Psychrotrophic bactris reduces cheese yield. *J Food Protection*, **45**, 331. Citado por Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08.
- HSIEN-YEH-HSU SHIPE, W. F.** (1986) Effects of some chemical and physical treatments on proteolysis in milk. *Journal Dairy Science*, **69**: 1491-1497. Citado por Dias, 1998.
- HUI, Y. H.** (1993) Dairy Science and Technology Handbook. Wiley-VCH, Inc., New York, U.S.A.

- ICHILCZYK-LEONE, J.; AMRAN, Y.; SHNEID, N.; LENOIR, J.** (1981) Refrigeration of milk and its implications in cheesemaking. 1. Effects of refrigeration on the physicochemical and coagulation properties of milk. *Revue Laitière Française*, nº 401, 7, 9, 11, 13-14. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- INFANTE, M.T.M.** (1998) Efeito da refrigeração na qualidade microbiológica do leite para produção de queijo Serpa. Dissertação apresentada ao ISA para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos
- IPQ** (1983a) NP – 469 *Leites. Determinação da matéria gorda (Técnica de Gerber). Processo corrente.*
- IPQ** (1983b) NP – 470 *Leites. Determinação da acidez.*
- IPQ** (1983c) NP – 474 *Leites. Determinação da densidade relativa. Processo corrente.*
- IPQ** (1983d) NP – 475 *Leites. Determinação do resíduo seco e resíduo seco isento de matéria gorda.*
- IPQ** (1991) NP – 1986 *Leites. Determinação do teor de proteína bruta. Técnica de Kjeldahl.*
- ISO/DIS Standard 6610** (1983) *Lait – Dénombrement des micro-organismes – Technique par comptage des colonies à 30 °C.*
- ISO/DIS Standard 8552** (1986) *Lait – Dénombrement des micro-organismes psychrotrophes – Technique par comptage des colonies à 21 °C (Méthode rapide).*
- KALANTZOPOULOS, G.C.** (1993) Cheeses from ewes' and goats' milk. *In: FOX, P. F.* (ed.) (1993) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol.2. *Major cheese groups*, 2nd ed., pp 507-553. Chapman & Hall, London, UK. Citado por Alves, 2003.
- KESSLER, H. G.** (1981) *Food engineering and dairy technology*. Verlag A. Kessler, Freising.
- KNAUT, T.; BRUDERER, G.** (1965) Elektrophoretische Veränderungen des Kaseins beim Wachstum von *Pseudomonas*-arten in der Milch. *Milchwissenschaft* **20**:315. Citado por Cousin e Marth, 1976.

- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.** (1991) Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J Dairy Sci* **74**:3275-3283.
- KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K.** (2007) Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Sciences Research*, **3**(11): 1383-1387.
- LAW, B.** (1979) Reviews of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and products. *J.Dairy Res.*, **46**, 573-588. Citado por Infante, 1998.
- LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E.** (1977) Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Research*, v. **44**, p.145-148. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- LENOIR, J. SCHNEID, N.** (1987) Tratamento de leites refrigerados e armazenados. *In: O queijo*. Coleções EuroAgro – Publicações Europa-América, Men Martins. Citado por Dias, 1998.
- LENOIR, J.; REMEUF, F. SCHNEID, N.** (1997) Le lait de fromagerie – L’aptitude du lait à la coagulation par la pression. *In: ECK e GILLIS* (coord.) (1997) *Le fromage. De la science à l’assurance-qualité*, 3^{ème} ed., pp. 229-256. *Technique et Documentation – Lavoisier*, Paris. Citado por Alves, 2003.
- LENOIR, J.; VEISSEYRE, R.; CHOISY, C.** (1974) Cold stored milk, raw material of modern cheesemaking. *Renue Laitière Française*, n° 322, 1-7. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- LENOIR, M.** (1980) L’évolution de la qualité du lait et ses conséquences technologiques. *La Technique Laitière*, n°949, 15-20. Citado por Infante, 1998.
- LUCEY, J. A.; FOX, P. F.** (1993) Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal Dairy Science*, **76**: 1714-1724. Citado por Dias, 1998.
- LUQUET, F.M.** (coord.) (1985) *O leite. Do úbere à fábrica de lacticínios*. 1ºVolume. Título original: *Laits et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre*. Vol.I – *De la mamelle a la laiterie*. APRIA, *Technique et Documentation – Lavoisier*, Paris. Traduzido por Franco de Sousa. Publicações Europa-América.

- MACEDO, I. Q.; FARO, C. PIRES, E.** (1996) Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus L.*: action on bovine α s and β -casein and comparison with chymosin *J. Agric. Food.Chem.*, **44 (1)**: 42-47. Citado por Dias, 1998.
- MADRID, A.** (1993). *Manual de tecnologia quejera*. AMV Ediciones – Mundi-Prensa, Madrid. Citado por Dias, 1998.
- MAHAUT, M.; JEANTET, R. BRULÉ, G.** (2000a) *Initiation à la Technologie Fromagère*. Editions Tec&Doc. Paris.
- MAHAUT, M.; JEANTET, R. BRULÉ, G.; SCHUCK, P.** (2000b) *Les produits industriels laitiers*. Editions Tec&Doc. Paris
- MAHIEU, H.** (1985) Modifications du lait après récolte *In: LUQUET, F.M.* (coord.) (1985) *et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre*. Vol.I – *De la mamelle a la laiterie*. APRIA, Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. Citado por Dias, 1998.
- MARTINEZ, E.; ESTEBÁN, M. A.** (1980) Actividad coagulante del extracto de la flor del cardo *Cynara humilis L.*. *Archivos de Zootecnia*, **29**, 114, 107-117. Citado por Alves, 2003.
- MARTINS, A.P.L.** (1989) *O leite de ovelha - produção, utilização e características. Contribuição para o estudo e caracterização do leite de ovelha da região de Azeitão*. NTLD, ENTPA, INIA. Lisboa, 1989. Trabalho apresentado ao INIA para prestação de provas de acesso à categoria de Assistente de Investigação.
- MARTINS, A.P.L.** (1999) *A flor de cardo (Cynara cardunculus L.) como agente coagulante no fabrico do queijo. Caracterização e influência dos processos de conservação na actividade coagulante*. Dissertação apresentada ao ISA para prestação de provas de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Dezembro de 1999.
- MARTINS, A. P. L.; VASCONCELOS, M. M.** (1993) Alguns aspectos da qualidade do leite e o fabrico de queijos regionais. *Via Láctea*, n.º 2, Jan. 93, 73-79.
- MARTINS, A. P. L.; VASCONCELOS, M. M.** (2001) Queijos tradicionais portugueses. Qualidade e factores de tipicidade. *Via Láctea*, n.º 17, Jan. 01, 16-20.

- MARTINS, A. P. L.; VASCONCELOS, M. M.** (2004) *A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos*. Núcleo de Tecnologia do Leite e Derivados, Departamento de Tecnologia dos Produtos Agrários, Estação Agronómica Nacional.
- MARTINS, A. P. L.; BELO, A. T.; VASCONCELOS, M. M.; FONTES, A. L.; PEREIRA, E. A. BELO, C. C.** (2007) *Caracterização do sistema de produção do queijo de Nisa (PDO): Efeito da raça na composição e aptidão tecnológica do leite de ovelha*. NTLD-DTPA, Estação Agronómica Nacional, Instituto Superior de Agronomia, Estação Zootécnica Nacional.
- MARTINS, A. P. L.; BELO, C. C.; PEREIRA, E. A.; VASCONCELOS, M. M.; BELO, A. T.; MARTINS, M. P.; MIMOSO, M. C.; FONTES, A. L.** (2005) *A aptidão tecnológica do leite de ovelha de diferentes raças tendo em vista o fabrico de queijo*. NTLD-DTPA, Estação Agronómica Nacional, Instituto Superior de Agronomia, Estação Zootécnica Nacional.
- MARTINS, A. P. L.; VASCONCELOS, M. M.; ROLO, M.** (200) O mercado, o crescimento sectorial e as limitações e tecnológicas. As denominações de origem protegidas de queijos portugueses. *Via láctea*, n.º 15, Jan. 00, 25-33.
- MC PHEE, J. D.; GRIFFITHS, M. W.** (2002) Psychrotrophic bacteria. *Pseudomonas* species. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Ed. Roginsky, H., Fuquay, J.W, Fox, P. F. Academic Press, pp: 2340-2351. Citado por Kumaresan *et al.*, 2007.
- McHAHON, D.J. BROWN, R.J.** (1984) Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science*, **67**, 919-929. Cit por Alves, 2003.
- MIRANDA, G.; GRIPON, J.** (1986) *Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait*. *Le Lait*, **66**, 1-18. Citado por Infante, 1998.
- MOCQUOT, G.; DUCLUZEAU, R.** (1968) The influence of cold storage of milk on its microflora and its suitability for cheesemaking. Page 235 in J. Hawthorne and E. J. Rolfe. *Low temperature biology of foodstuffs*. Pergamon Press, Oxford. Citado por Cousin e Marth, 1976.

- MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T.** (2006) Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* **161**:334-346. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007.
- NUÑEZ, J. A.; CHAVARRI, F. J. NUÑEZ, N.** (1984) Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, with particular reference to Gram negative rods. *J. Applied Bacteriology*, **51**, 23-29. Citado por Infante, 1998.
- ONDRAŠOVIČ, M.; BURDOVÁ, O.; ONDRAŠOVIČOVÁ, O.; VARGOVÁ, M.; PARA, L'; ALBERTO, J.** (2002) Contribution to the control of effectiveness of disinfection and cleaning in primary milk production. Proceedings of lectures and posters. Milk and milk products at the beginning of new millenium. *Hygiena Alimentorum*, **22**, 67-70. Citado por Burdová et al., 2002.
- ONO, T.; KOHNO, H.; ODAGIRI, S.; TAKAGI, T.** (1989) Subunit components of caseins micelles from bovine, ovine, caprine and quine milks. *Journal of Dairy Research*, **56**, 61-68. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J.** (1983) Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. *Journal of Food Protection*, v.**46**, p. 90-94. Citado por Pinto et al., 2006.
- PEIXEIRO, M. R. P. A.** (2005) *Optimização do Processo de Coagulação do Leite de Ovelha com Extracto de Cardo (Cynara Cardunculus L.) e Influência nas Características do Queijo de Azeitão*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. ISA, Lisboa.
- PELLEGRINI, O.; REMEUF, F.; RIVEMALE, M.** (1994) Changes in physicochemical characteristics and renneting properties of ewe's milk collected in the Roquefort area. *Lait*, **74**, 425-442. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D.** (2006) Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **26(3)**: 645-651.
- PIRES, E.; FARO, C.; VERÍSSIMO, P.; ESTEVES, C.; RAMALHO-SANTOS, M.; SIMÕES, I. CASTANHEIRA, P.** (1997). Importância da utilização do cardo no fabrico do Queijo Serra da Estrela. *In: Terra Fértil*, **3**: 21-28. Citado por Dias, 1998.

- PITTON, C.** (1988) Evolution de la flore microbienne de surface du Gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Lait*, **68** (4): 419-434. Citado por Dias, 1998.
- PLA, R.; CARRETEIRO, C.; MOR-MUR, N. GUAMIS, B.** (1992) Refrigeración de leche de oveja en la granja. Influencia de la conservación a baja temperatura sobre los recuentos de flora total y sicrotrofa. *Rev. Esp. Lecheria*. Diciembre, 42-44. Citado por Infante, 1998.
- PROJECTO DE NORMA PORTUGUESA. prNP – 3547 – Leite cru de ovelha. Definição e características.** Citado por Infante, 1998.
- PUHAN, Z.** (1989) Influence of cold storage on milk chemical aspects. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 40, 340-363. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- RAMET, J.P.; WEBER, F.** (1980) Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, **60**, 1-13. Citado por Alves, 2003.
- RAPP, H.; CALBERT, H. E.** (1954) Influence of the bulk handling of raw milk on its rennet coagulation time. *J. Dairy Sci.* **37**:637. (Abstr.). Citado por Cousin e Marth, 1976.
- RAVANIS, S.; LEWIS, M. J.** (1995) Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. *Letters in Applied Microbiology*, London, **v.20**, n.3, p.164-167. Citado por Silveira *et al.*, 2005, consultado a 09/10/08.
- RAYNAL, K.; REMEUF, F.** (2000) Effect of storage at 4 °C on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. *J. Dairy Research*, **67**, 199-207.
- REBELO, A.G.** (1983) *Queijo: Notas sobre queijos regionais das beiras*. Coordenação: Eng.º Camilo silveira da Costa. Coleção Agros. Livraria popular Francisco Franco, Lda. Lisboa
- REMEUF, F.; LENOIR, J.; DUBY, C.** (1989) Étude des relations entre las caractéristiques phisico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait*, **69**, 499-518. Citado por Alves, 2003, e por Raynal e Remeuf, 2000.

- REPS, A.** (1993) 5-Bacterial surface-ripened cheese.s In: **FOX, P. F.** (ed.) (1993) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Vol. II, 2ª edição. Chapman & Hall. Citado por Dias, 1998
- ROBINSON, R.K.** (1986) *Modern dairy technology*. Vol. 1: *Advances in milk processing*. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London and New York.
- SCOTT, R.** (1986) *Cheesemaking practice*. 2ª edição. Elsevier Applied Science, London & New York. Citado por Dias, 1998.
- SHAH, N. P.** (1994) Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft* **49**:432-437. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007 e Citado por Kumaresan *et al.*, 2007.
- SILVA, P. H. F.** (2003) Leite UHT: Factores determinantes para sedimentação e gelificação. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- SINGH, H.; ROBERTS, M. S.; MUNRO, P. A.; TET TEO, C.** (1996) Acide-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment. *J. Dairy Sci.*, **79**:1340-1346. Citado por Dias, 1998.
- SKEAN, J. D.; OVERCAST, W. W.** (1960) Changes in the paper electrophoretic protein patterns of refrigerated skim milk accompanying growth of three *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* **8**:335. Citado por Adams *et al.*, 1975.
- SØRHAUG, T.** (1992) *Temperature control*. Lederberg J. (ed.): Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Vol. **4**. 201–211. Citado por Cempírková, 2002.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L.** (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **8**:35-41. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007 e por Pinto *et al.*, 2006.
- SPECK, M. L.; ADAMS, D. M.** (1976) Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. In: Symposium: impact of heat stable microbial enzymes in food processing. *Journal of Dairy Science*, v. **59**, p. 786-789. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- SPREER, E.** (1991) *Lactología industrial*. 2ª edición. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza, p. 45; 299; 306; 342

- STORRY, J. E.; GRANDISON, A. S.; MILLARD, D.; OWEN, A. J.; FORD, G. D.** (1983) Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research*, 50, 215-229. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- TEKNISK DOKUMENTATION AB** (1980) *Dairy Handbook*. Dairy and Food Engineering Division. Alfa-Laval AB, Sweden.
- TERADA, A.; TANAKA, S.; UCHIDA, K.** (1982) Studies on psychrotrophic bacteria of bovine milk, proteolytic and lipolytic activities of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk. *Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College*, v. 31, p. 222-228. Citado por Pinto *et al.*, 2006.
- TERNSTROM, A.; LINDBERG, A. M.; MOLIN, G.** (1993) Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 75:25-34. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007.
- THOMAS, S. B.** (1971) The suitability of refrigerated milk for cheesemaking. *Dairy Indust*, 36:287. Citado por Cousin e Marth, 1976.
- THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F.** (1973). Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Ind.* 38:11. Citado por DeBeukelar *et al.*, 1976.
- VAN DEN BERG, M.G.** (1981) I.D.F. Documentation No. 130. Citado por Robinson, 1986.
- VASCONCELOS, M. M.** (1990) *Estudo do Queijo de Azeitão – Melhoria da tecnologia Tradicional e sua influência nas características do Queijo*. Trabalho apresentado ao INIA para prestação de provas de acesso à categoria de Investigador auxiliar. NTLD, ENTPA. INIA. Lisboa
- VEISSEYRE, R.** (1988) *Lactologia Técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Editorial Acirbia, s.a. Zaragoza. Citado por Infante, 1998.
- VIEIRA DE SÁ, F.; BARBOSA, M.** (1970a) Activité coagulante comparée d'une presure végétale extraite du chardon (*Cynara cardunculus L.*) et de la présure animale. *XIII Congres International de Laiterie*, Sydney, 12-16 Octobre, Vol. 1 F, A.4.5, 292. Citado por Alves, 2003.

- VIEIRA DE SÁ, F.; BARBOSA, M.** (1970b) Comportement rheologique comparatif des caillés au découpage das la fabrication du fromage en employant de l'extrait de chardon (*Cynara cardunculus L.*) et de la presure animale. *XIII Congres International de Laiterie*, Sydney, 12-16 Octobre, **Vol. 1F**, A.4.5, 293. Citado por Alves, 2003.
- VIEIRA DE SA, F.; BARBOSA, M.** (1970c) Expériences de fabrication de fromage en employant un enzyme coagulant extrait du chardon (*Cynara cardunculus L.*). XVIII Congres Internacional de laiterie, Sydney, 12-16 Octobre, Vol. 1F, A.4.5, 294. Citado por Alves, 2003.
- VIEIRA DE SÁ, F.; BARBOSA, M.** (1972) Cheesemaking with a vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus L.*). *Journal of Dairy research*, **39**, 335. Citado por Alves, 2003.
- VIEIRA DE SÁ, F.; BARBOSA, M.** (1990) *O leite e os Seus Produtos. 5ª Edição.* Nova Colecção Agrária. Clássica Editora. Lisboa
- WALSTRA P.; VAN VLIET T.** (1986) The physical chemistry of curd making. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **40**: 241-259. Citado por Raynal e Remeuf, 2000.
- WALSTRA, P.** (1990) On the stability of casein micelles *J. Dairy Sci.*, **73**: 1965-1979. Citado por Dias, 1998.
- WEATHERUP, W.; MICHAEL, W.; MULLAN, A.; KORMOS, J.** (1988) Effects of storing milk at 3 °C and 7 °C on the quality and yield of Cheddar Cheese. *Dairy Ind. Inter.*, **vol. 52**, nº2, 16-25. Citado por Infante, 1998.
- WEBB, B. H.; JOHNSON, A. H.** (1965) *Fundamentals of dairy chemistry.* AVI Publ. Co., Inc., Westport. pp525. Citado por Adams *et al.*, 1975.
- WHITE, J. C. D.; DAVIES, D. T.** (1958) The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex, III. Coagulation by rennet. *J. Dairy Res.* **25**: 267. Citado por Cousin e Marth, 1976.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR. J. K.** (2000) Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2085-2095. Citado por Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007 e por Pinto *et al.*, 2006.

WITTER, L. (1961) Psychrotrophilic bacteria – A review. *J.Dairy Sci.*, 983-1012. Citado por Infante, 1998.

YANAGIYA, T.; MIKAMI, M.; MIURA, H. (1973) Changes of milk protein by psychrotrophie organisms. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **47**:259. Citado por Cousin e Marth, 1976.

YSEBAERT (2000) *Optigraph – User’s manual. Dairy Division.* Citado por Alves, 2003.

ZALL, R. R. (1990) Control and destruction of microorganisms. **In:** *Dairy Microbiology*, Robinson, R. K., Elsevier App. Sci., **Vol. I**, (2nd ed.), Londres. Citado por Infante, 1998.

6.1. CIBERGRAFIA

RIBEIRO, M.T.; CARVALHO, A. C http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_97_21720039241.html **Consultado a 09/10/08**

SCHOENIAN, S. (2006) <http://www.sheep101.info/dairy.html>. **Consultado a 09/10/08.**

SILVEIRA, I. A., CARVALHO, E. P., TEIXEIRA, D. (2005) *Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado.* Revista Higiene Alimentar. Dep^{to} de Ciências dos Alimentos – Univ. Federal de Lavras-MG. **Consultado no site <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0005.htm> a 09/10/08.**

<http://www.criareplantar.com.br/pecuaria/leite/leite.php> **Consultado a 09/10/08.**

*[http://westfalia.com/au/en/products_services/proformance_equipment/products/milk_cooling
_equipment/reference_documents/milk_refrigation.asp](http://westfalia.com/au/en/products_services/proformance_equipment/products/milk_cooling_equipment/reference_documents/milk_refrigation.asp)* **Consultado**
a 09/10/08

7. ANEXOS

ANEXO I

Quadro da caracterização inicial do leite estudado com os respectivos parâmetros estatísticos: média, desvio-padrão, máximo, mínimo e N.

	pH	Acidez (mL NaOH N/L leite)	MG (%) (m/v)	Azoto Total (%) (m/v)	PB (%) (m/m)	Res. Seco (%) (m/m)	Res. Seco Isento de MG (%) (m/m)	Densidade
Ensaio prévio	6,60	25,0	7	0,720	4,60	17,28	10,52	1,0349
			6,8	0,749	4,78	17,25	10,68	
Ensaio 1	6,52	26,5	4,8	0,704	4,49	15,30	10,67	1,0360
			4,8	0,787	5,02	15,21	10,58	
Ensaio 2	6,62	25,0	8	0,772	4,92	18,64	10,91	1,0350
			8			18,55	10,82	
Ensaio 3	6,67	16,5	7	0,751	4,79	17,18	10,42	1,0350
			7	0,762	4,86	17,61	10,85	
Ensaio 4	6,58	28,0	7,3	0,749	4,78	17,72	10,66	1,0340
			7,3	0,711	4,53	17,92	10,86	
Ensaio 5	6,65	23,0	6,3	0,726	4,63	16,52	10,43	1,0335
			6,3	0,723	4,62	16,54	10,44	
Ensaio 6	6,56	23,0	7,3	0,739	4,71	17,91	10,85	1,0340
			7,3	0,742	4,74	17,91	10,85	
Ensaio 7	6,64	22,0	7,1	0,753	4,80	17,46	10,59	1,0342
			7,1	0,646	4,12	17,40	10,54	
Ensaio 8	6,57	27,0	7,8	0,751	4,79	18,33	10,78	1,0340
			7,8	0,732	4,67	18,32	10,78	
Ensaio 9	6,73	26,5	6,9	0,807	5,15	17,79	11,12	1,0345
			6,9	0,789	5,04	17,80	11,13	
Ensaio 10	6,68	26,5	7,5			18,51	11,27	1,0352
			7,6	0,781	4,98	16,90	9,56	
Ensaio 11	6,53	27,0	8,8	0,715	4,56	18,73	10,20	1,0320
			8,7	0,702	4,48	18,72	10,29	
Ensaio 12	6,63	26,5		0,796	5,08	18,43	11,08	1,0345
			7,6	0,756	4,83	18,50	11,16	
Ensaio 13	6,64	30,0	7,1			17,66	10,81	1,0362
			7,2	0,819	5,23	17,65	10,70	
Média	6,62	25,18	7,16	0,747	4,77	17,63	10,70	1,0345
Desvio-Padrão	0,06	3,28	0,90	0,038	0,24	0,91	0,35	0,0011
Máximo	6,73	30,00	8,80	0,819	5,23	18,73	11,27	1,0362
Mínimo	6,52	16,50	4,80	0,646	4,12	15,21	9,56	1,0320
N	14	14	14	14	14	14	14	14

ANEXO II

Quadros com os resultados obtidos durante os ensaios com a utilização do coelho *standard*.

Ensaio 1													
Dias	temp. de refr.	pH	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,617	755	8,23	12,4	5,58	12,98	382	3,11	1,21 × 10 ⁵	5,08	1,82 × 10 ⁵	5,26
T0		6,617	748	7,02	11,4	4,91	12,21	447	2,79	1,19 × 10 ⁵	5,08	1,85 × 10 ⁵	5,27
T0		6,617	744	6,61	10,19	4,59	10,84	476	2,63	1,57 × 10 ⁵	5,20	1,63 × 10 ⁵	5,21
T1	4 °C	6,604	697	6,42	9,62	5,14	10,65	470	2,68	3,07 × 10 ⁵	5,49	3,90 × 10 ⁵	5,59
T1	4 °C	6,604	687	5,90	8,73	4,84	9,69	514	2,51	3,50 × 10 ⁵	5,54	2,70 × 10 ⁵	5,43
T1	4 °C	6,604	698	7,69	11,56	6,18	12,88	386	3,13	3,70 × 10 ⁵	5,57	4,20 × 10 ⁵	5,62
T1	8 °C	6,599	691	6,84	11,00	5,52	12,73	435	2,95	2,41 × 10 ⁶	6,38	2,21 × 10 ⁶	6,34
T1	8 °C	6,599	696	6,35	9,53	5,11	10,62	474	2,66	2,55 × 10 ⁶	6,41	2,40 × 10 ⁶	6,38
T1	8 °C	6,599	694	6,32	9,68	5,13	10,91	476	2,64	2,41 × 10 ⁶	6,38	2,26 × 10 ⁶	6,35
T2	4 °C	6,631	699	6,25	9,25	4,97	10,20	483	2,61	7,60 × 10 ⁵	5,88	6,60 × 10 ⁵	5,82
T2	4 °C	6,631	701	5,81	8,69	4,62	9,61	530	2,46	1,10 × 10 ⁶	6,04	6,00 × 10 ⁵	5,78
T2	4 °C	6,631	697	7,54	11,20	6,03	12,37	395	3,06	9,30 × 10 ⁵	5,97	7,10 × 10 ⁵	5,85
T2	8 °C	6,613	672	6,46	9,85	5,48	11,34	453	2,80	1,03 × 10 ⁷	7,01	1,75 × 10 ⁷	7,24
T2	8 °C	6,613	668	6,06	9,09	5,17	10,40	485	2,64	8,84 × 10 ⁶	6,95	2,04 × 10 ⁷	7,31
T2	8 °C	6,613	650	5,82	8,78	5,18	10,26	497	2,62	1,02 × 10 ⁷	7,01	1,66 × 10 ⁷	7,22
T3	4 °C	6,606	674	6,02	9,01	5,10	10,10	493	2,61	6,30 × 10 ⁵	5,80	1,42 × 10 ⁶	6,15
T3	4 °C	6,606	669	5,58	8,36	4,80	9,43	538	2,46	6,00 × 10 ⁵	5,78	1,28 × 10 ⁶	6,11
T3	4 °C	6,606	669	6,53	9,83	5,59	11,12	447	2,82	6,60 × 10 ⁵	5,82	1,17 × 10 ⁶	6,07
T3	8 °C	6,467	563	6,05	9,17	6,57	11,61	429	3,00	1,50 × 10 ⁷	7,18	2,60 × 10 ⁷	7,41
T3	8 °C	6,467	565	5,71	8,13	6,13	10,86	462	2,83	1,52 × 10 ⁷	7,18	2,30 × 10 ⁷	7,36
T3	8 °C	6,467	555	5,47	8,35	6,03	10,54	477	2,79	2,01 × 10 ⁷	7,30	1,30 × 10 ⁷	7,11
T7	4 °C	6,558	567	5,14	7,01	5,39	9,00	581	2,36				
T7	4 °C	6,558	581	5,27	8,07	5,51	10,57	505	2,63				
T7	4 °C	6,558	592	6,81	10,58	6,93	13,45	393	3,24				

Ensaio 2													
Dias	temp. de refr.	pH	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,672	820	6,96	10,08	4,09	9,93	481	2,48	1,58 × 10 ⁵	5,20	3,68 × 10 ⁵	5,57
T0		6,672	830	6,58	9,64	3,75	9,36	519	2,35	1,50 × 10 ⁵	5,18	4,60 × 10 ⁵	5,66
T0		6,672	851	8,54	11,44	4,54	11,89	396	2,86	1,53 × 10 ⁵	5,18	3,96 × 10 ⁵	5,60
T1	4 °C	6,722	853	6,87	10,08	3,59	9,63	502	2,38	>1000	>3,00	2,14 × 10 ⁶	6,33
T1	4 °C	6,722	876	6,56	9,57	3,21	8,95	544	2,23	>1000	>3,00	2,27 × 10 ⁶	6,36
T1	4 °C	6,722	887	8,64	12,65	4,04	11,72	405	2,77	>1000	>3,00	2,16 × 10 ⁶	6,33
T1	8 °C	6,707	882	7,50	10,99	3,56	10,24	468	2,48	>1000	>3,00	6,40 × 10 ⁶	6,81
T1	8 °C	6,707	868	6,86	10,13	3,45	9,55	507	2,34	>1000	>3,00	6,90 × 10 ⁶	6,84
T1	8 °C	6,707	879	6,80	10,22	3,33	9,47	517	2,30	>1000	>3,00	5,30 × 10 ⁶	6,72
T2	4 °C	6,686	831	6,86	10,23	3,89	9,90	494	2,44	8,50 × 10 ⁶	6,93	1,22 × 10 ⁷	7,09
T2	4 °C	6,686	843	6,54	9,54	3,56	9,18	529	2,31	9,60 × 10 ⁶	6,98	9,40 × 10 ⁶	6,97
T2	4 °C	6,686	863	8,55	12,58	4,35	11,88	403	2,83	7,00 × 10 ⁶	6,85	1,08 × 10 ⁷	7,03
T2	8 °C	6,668	801	7,16	10,60	4,41	10,59	460	2,51	2,23 × 10 ⁷	7,35	3,70 × 10 ⁷	7,57
T2	8 °C	6,668	807	6,79	9,93	4,14	9,88	489	2,47	2,06 × 10 ⁷	7,31	2,30 × 10 ⁷	7,36
T2	8 °C	6,668	821	6,77	9,93	3,98	9,76	497	2,44	2,04 × 10 ⁷	7,31	2,20 × 10 ⁷	7,34
T3	4 °C	6,692	815	7,01	10,18	4,19	10,05	473	2,52	9,00 × 10 ⁶	6,95	1,00 × 10 ⁷	7,00
T3	4 °C	6,692	826	6,66	9,71	3,83	9,47	510	2,39	1,17 × 10 ⁷	7,07	2,00 × 10 ⁷	7,30
T3	4 °C	6,692	841	8,71	12,84	4,77	12,36	386	2,94	9,70 × 10 ⁶	6,99	2,00 × 10 ⁷	7,30
T3	8 °C	6,588	745	7,13	10,62	5,09	11,20	438	2,77	3,40 × 10 ⁷	7,53	2,60 × 10 ⁷	7,41
T3	8 °C	6,588	751	6,74	10,05	4,76	10,49	468	2,64	2,50 × 10 ⁷	7,40	3,30 × 10 ⁷	7,52
T3	8 °C	6,588	764	6,63	9,94	4,49	10,24	484	2,56	3,10 × 10 ⁷	7,49	3,20 × 10 ⁷	7,51
T7	4 °C	6,583	689	6,43	9,55	5,20	10,63	464	2,71				
T7	4 °C	6,583	708	6,11	9,02	4,74	9,79	503	2,53				
T7	4 °C	6,583	715	7,89	11,75	6,02	12,74	385	3,14				

Ensaio 3													
Dias	temp. de refr.	pH	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM	Log	CM	Log
										21 °C	21 °C	30 °C	30 °C
T0		6,580	673	5,86	8,71	4,95	9,81	513	2,54	$8,40 \times 10^3$	3,92	$1,70 \times 10^4$	4,23
T0		6,580	669	5,43	8,08	4,65	9,10	560	2,40	$5,50 \times 10^3$	3,74	$2,20 \times 10^4$	4,34
T0		6,580	674	6,94	10,38	5,87	11,65	420	2,94	$5,40 \times 10^3$	3,73	$1,80 \times 10^4$	4,26
T1	4 °C	6,599	671	6,13	9,00	5,20	10,25	480	2,65	$3,30 \times 10^3$	3,52	$4,00 \times 10^4$	4,60
T1	4 °C	6,599	687	5,85	8,52	4,81	9,55	524	2,48	$3,30 \times 10^3$	3,52	$3,00 \times 10^4$	4,48
T1	4 °C	6,599	690	7,56	11,17	6,18	12,34	290	3,09	$4,00 \times 10^3$	3,60	$3,00 \times 10^4$	4,48
T1	8 °C	6,566	668	6,46	9,51	5,55	10,91	451	2,78	$3,08 \times 10^4$	4,49	$3,00 \times 10^4$	4,48
T1	8 °C	6,566	689	6,22	9,16	5,08	10,29	482	2,53	$3,14 \times 10^4$	4,50	$3,00 \times 10^4$	4,48
T1	8 °C	6,566	688	6,21	9,16	5,12	10,31	483	2,53	$3,74 \times 10^4$	4,57	$1,00 \times 10^4$	4,00
T2	4 °C	6,578	731	6,66	9,84	5,00	10,47	467	2,56	$1,70 \times 10^3$	3,23	$1,00 \times 10^4$	4,00
T2	4 °C	6,578	738	6,36	9,39	4,64	9,92	495	2,53	$3,60 \times 10^3$	3,56	$1,00 \times 10^4$	4,00
T2	4 °C	6,578	748	8,19	12,09	5,81	12,55	500	3,11	$4,40 \times 10^3$	3,64	$1,00 \times 10^4$	4,00
T2	8 °C	6,555	730	6,96	10,43	5,15	11,14	443	2,77	$1,98 \times 10^5$	5,30	$2,00 \times 10^5$	5,30
T2	8 °C	6,555	737	6,53	9,74	4,77	10,32	479	2,51	$2,40 \times 10^5$	5,38	$1,00 \times 10^5$	5,00
T2	8 °C	6,555	739	6,58	9,77	4,76	10,33	476	2,59	$1,64 \times 10^5$	5,21	$4,00 \times 10^5$	5,60
T3	4 °C	6,527	676	6,34	9,37	5,37	10,45	467	2,59	$1,70 \times 10^4$	4,23	<100000	<5,00
T3	4 °C	6,527	684	6,04	8,97	5,03	9,95	496	2,58	$1,70 \times 10^4$	4,23	<100000	<5,00
T3	4 °C	6,527	702	8,03	11,83	6,37	12,93	372	3,20	$1,80 \times 10^4$	4,26	<100000	<5,00
T3	8 °C	6,489	675	6,68	9,92	5,05	11,17	438	2,83	$2,50 \times 10^6$	6,40	$2,00 \times 10^6$	6,30
T3	8 °C	6,489	683	6,35	9,43	5,26	10,48	469	2,68	$2,09 \times 10^6$	6,32	$2,00 \times 10^6$	6,30
T3	8 °C	6,489	688	6,13	9,30	5,03	10,29	488	2,62	$3,01 \times 10^6$	6,48	$3,00 \times 10^6$	6,48
T7	4 °C	6,503	675	6,25	9,45	5,26	10,94	473	2,71				
T7	4 °C	6,503	694	5,97	8,86	4,82	9,78	512	2,52				
T7	4 °C	6,503	702	7,74	11,52	6,15	12,61	386	3,13				

Ensaio 4													
Dias	temp. de refr.	pH	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM	Log	CM	Log
										21 °C	21 °C	30 °C	30 °C
T0		6,651	804	6,06	8,73	3,73	8,70	564	2,25	$1,28 \times 10^5$	5,11	$1,50 \times 10^5$	5,18
T0		6,651	813	5,69	8,21	3,39	8,12	619	2,12	$7,90 \times 10^4$	4,90	$1,11 \times 10^5$	5,05
T0		6,651	825	7,45	10,81	4,32	10,57	447	2,63	$1,17 \times 10^5$	5,07	$1,00 \times 10^5$	5,00
T1	4 °C	6,691	819	6,16	8,79	3,65	8,67	561	2,25	$1,25 \times 10^5$	5,10	$1,25 \times 10^5$	5,10
T1	4 °C	6,691	829	5,89	8,43	3,34	8,23	596	2,15	$1,03 \times 10^5$	5,01	$1,58 \times 10^5$	5,20
T1	4 °C	6,691	843	7,62	10,89	4,14	10,52	446	2,62	$1,07 \times 10^5$	5,03	$1,35 \times 10^5$	5,13
T1	8 °C	6,680	839	6,56	9,46	3,60	9,16	526	2,33	$1,87 \times 10^5$	5,27	$2,80 \times 10^5$	5,45
T1	8 °C	6,680	840	6,20	8,48	3,42	8,69	562	2,22	$2,27 \times 10^5$	5,36	$3,00 \times 10^5$	5,48
T1	8 °C	6,680	841	6,20	9,00	3,37	8,72	565	2,22	$1,75 \times 10^5$	5,24	$3,90 \times 10^5$	5,59
T2	4 °C	6,662	818	6,35	9,17	3,72	9,02	536	2,31	$5,20 \times 10^5$	5,72	$1,00 \times 10^5$	5,00
T2	4 °C	6,662	835	6,00	8,67	3,36	8,43	588	2,17	$4,40 \times 10^5$	5,64	$5,00 \times 10^5$	5,70
T2	4 °C	6,662	845	7,72	11,24	4,18	10,82	437	2,64	$4,10 \times 10^5$	5,61	$3,00 \times 10^5$	5,48
T2	8 °C	6,671	787	6,56	9,50	4,23	9,60	500	2,46	$1,96 \times 10^6$	6,29	$3,00 \times 10^6$	6,48
T2	8 °C	6,671	795	6,28	9,06	3,92	9,10	534	2,33	$1,88 \times 10^6$	6,27	$2,00 \times 10^6$	6,30
T2	8 °C	6,671	816	6,27	9,04	3,67	8,92	545	2,28	$2,28 \times 10^6$	6,36	$4,00 \times 10^6$	6,60
T3	4 °C	6,660	864	6,60	9,61	3,32	9,09	536	2,26	$5,70 \times 10^5$	5,76	<1000000	<6,00
T3	4 °C	6,660	840	6,01	8,86	3,25	8,56	584	2,17	$2,80 \times 10^5$	5,45	$1,00 \times 10^6$	6,00
T3	4 °C	6,660	837	7,68	11,32	4,19	10,99	441	2,67	$6,00 \times 10^5$	5,78	<1000000	<6,00
T3	8 °C	6,653	803	6,52	9,75	3,93	9,72	512	2,41	$2,92 \times 10^6$	6,47	$3,00 \times 10^6$	6,48
T3	8 °C	6,653	833	6,28	9,33	3,48	9,05	549	2,27	$2,98 \times 10^6$	6,47	$1,00 \times 10^6$	6,00
T3	8 °C	6,653	786	6,03	8,99	3,83	9,12	554	2,31	$2,98 \times 10^6$	6,47	$2,00 \times 10^6$	6,30
T7	4 °C	6,625	776	6,21	8,94	4,14	9,11	531	2,35				
T7	4 °C	6,625	794	5,86	8,47	3,70	8,51	583	2,21				
T7	4 °C	6,625	804	7,59	11,07	4,65	11,02	433	2,72				

Ensaio 5														
Dias	temp. de refr.	pH	Acidez	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,559	23,0	744	6,85	9,92	4,93	10,36	456	2,67	$4,38 \times 10^4$	4,64	$2,77 \times 10^5$	5,44
T0		6,559	23,0	747	6,54	9,45	4,66	9,86	483	2,55	$3,52 \times 10^4$	4,55	$1,85 \times 10^5$	5,27
T0		6,559	23,0	752	8,28	12,03	5,80	12,55	378	3,10	$3,29 \times 10^4$	4,52	$9,23 \times 10^4$	4,97
T1	4 °C	6,581	30,0	742	6,77	9,88	4,90	10,36	461	2,65	$5,37 \times 10^4$	4,73	$1,67 \times 10^5$	5,22
T1	4 °C	6,581	30,0	758	6,47	9,42	4,50	9,76	495	2,51	$8,20 \times 10^4$	4,91	$1,85 \times 10^5$	5,27
T1	4 °C	6,581	30,0	766	8,37	12,19	5,69	12,57	378	3,09	$5,87 \times 10^4$	4,77	$1,78 \times 10^5$	5,25
T1	8 °C	6,560	27,5	748	7,16	10,49	5,11	10,98	436	2,76	$2,29 \times 10^5$	5,36	$2,15 \times 10^5$	5,33
T1	8 °C	6,560	27,5	775	6,98	10,25	4,68	10,50	460	2,62	$1,98 \times 10^5$	5,30	$2,97 \times 10^5$	5,47
T1	8 °C	6,560	27,5	767	6,81	10,05	4,64	10,36	471	2,59	$2,02 \times 10^5$	5,30	$1,88 \times 10^5$	5,27
T2	4 °C	6,572	27,5	745	6,76	10,00	4,88	10,52	463	2,55	$2,97 \times 10^5$	5,47	$5,07 \times 10^5$	5,71
T2	4 °C	6,572	27,5	758	6,43	9,45	4,49	9,79	498	2,50	$3,38 \times 10^5$	5,53	$5,54 \times 10^5$	5,74
T2	4 °C	6,572	27,5	772	8,35	12,19	5,57	12,51	381	3,06	$3,35 \times 10^5$	5,52	$6,00 \times 10^5$	5,78
T2	8 °C	6,540	26,5	735	7,02	10,40	5,18	11,02	441	2,76	$7,61 \times 10^6$	6,88	$1,12 \times 10^7$	7,05
T2	8 °C	6,540	26,5	752	6,73	9,98	4,73	10,46	470	2,62	$7,52 \times 10^6$	6,88	$8,72 \times 10^6$	6,94
T2	8 °C	6,540	26,5	757	6,70	9,87	4,65	10,28	475	2,59	$6,23 \times 10^6$	6,79	$5,60 \times 10^6$	6,75
T3	4 °C	6,570	27,5	761	6,95	10,18	4,77	10,54	457	2,66	$4,51 \times 10^5$	5,65	$6,23 \times 10^5$	5,79
T3	4 °C	6,570	27,5	773	6,61	9,66	4,38	9,87	490	2,51	$5,60 \times 10^5$	5,75	$1,25 \times 10^6$	6,10
T3	4 °C	6,570	27,5	775	8,46	12,37	5,58	12,65	378	3,09	$6,32 \times 10^5$	5,80	$6,23 \times 10^5$	5,79
T3	8 °C	6,535	28,0	749	7,39	10,83	5,23	11,35	422	2,83	$2,60 \times 10^7$	7,42	$2,52 \times 10^7$	7,40
T3	8 °C	6,535	28,0	750	6,94	10,25	4,89	10,75	453	2,69	$3,04 \times 10^7$	7,48	$2,52 \times 10^7$	7,40
T3	8 °C	6,535	28,0	753	6,93	10,20	4,85	10,66	455	2,68	$2,42 \times 10^7$	7,38	$8,41 \times 10^7$	7,92
T7	4 °C	6,506	30,0	729	6,96	9,96	5,25	10,50	440	2,72				
T7	4 °C	6,506	30,0	747	6,68	9,54	4,82	9,95	470	2,58				
T7	4 °C	6,506	30,0	758	8,49	12,16	5,97	12,58	367	3,14				

Ensaio 6														
Dias	temp. de refr.	pH	Acidez	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,642	22,0	856	7,77	12,52	4,10	11,64	448	2,65	$1,14 \times 10^6$	6,06	$9,00 \times 10^5$	5,95
T0		6,642	22,0	856	7,14	10,52	3,74	9,98	483	2,45	$8,92 \times 10^5$	5,95	$1,16 \times 10^6$	6,06
T0		6,642	22,0	858	6,57	9,65	3,42	9,12	533	2,28	$1,05 \times 10^6$	6,02	$1,06 \times 10^6$	6,03
T1	4 °C	6,656	25,0	851	7,03	10,33	3,67	9,87	492	2,43	>1000	>3,00	$3,52 \times 10^2$	2,55
T1	4 °C	6,656	25,0	853	6,64	9,77	3,44	9,32	525	2,31	>1000	>3,00	$3,20 \times 10^2$	2,51
T1	4 °C	6,656	25,0	859	8,50	12,47	4,32	11,82	405	2,83	>1000	>3,00	$3,14 \times 10^2$	2,50
T1	8 °C	6,653	26,0	821	7,28	10,71	4,21	10,50	458	2,59	>1000	>3,00	$1,04 \times 10^7$	7,02
T1	8 °C	6,653	26,0	835	6,93	10,18	3,81	9,84	491	2,45	>1000	>3,00	$8,80 \times 10^6$	6,94
T1	8 °C	6,653	26,0	837	6,96	10,25	3,80	9,88	490	2,45	>1000	>3,00	$8,70 \times 10^6$	6,94
T2	4 °C	6,649	25,0	844	6,98	10,27	3,76	9,83	492	2,44	$8,00 \times 10^6$	6,90	$5,50 \times 10^6$	6,74
T2	4 °C	6,649	25,0	849	6,58	9,35	3,48	9,23	529	2,30	$8,30 \times 10^6$	6,92	$7,30 \times 10^6$	6,86
T2	4 °C	6,649	25,0	863	8,44	12,43	4,25	11,73	528	2,80	$7,60 \times 10^6$	6,88	$6,20 \times 10^6$	6,79
T2	8 °C	6,580	28,5	789	7,34	10,87	4,67	10,97	442	2,70	$3,68 \times 10^7$	7,57	$2,34 \times 10^7$	7,37
T2	8 °C	6,580	28,5	791	6,90	10,24	4,32	10,32	474	2,57	$3,68 \times 10^7$	7,57	$2,80 \times 10^7$	7,45
T2	8 °C	6,580	28,5	799	6,85	10,12	4,21	10,12	483	2,52	$3,48 \times 10^7$	7,54	$2,04 \times 10^7$	7,31
T3	4 °C	6,659	26,0	807	7,62	12,47	4,56	12,35	448	2,82	$1,09 \times 10^7$	7,04	$1,26 \times 10^7$	7,10
T3	4 °C	6,659	26,0	854	7,20	10,54	4,03	10,23	472	2,53	$1,22 \times 10^7$	7,09	$1,11 \times 10^7$	7,05
T3	4 °C	6,659	26,0	857	6,61	9,72	3,67	9,39	520	2,35	$1,15 \times 10^7$	7,06	$1,32 \times 10^7$	7,12
T3	8 °C	6,263	38,5	584	8,63	11,77	8,95	12,42	310	3,62	$2,46 \times 10^8$	8,39	$2,11 \times 10^8$	8,32
T3	8 °C	6,263	38,5	572	7,45	11,03	7,88	13,93	350	3,49	$2,26 \times 10^8$	8,35	$2,73 \times 10^8$	8,44
T3	8 °C	6,263	38,5	571	6,82	10,14	7,27	12,36	382	3,23	$2,82 \times 10^8$	8,45	$1,97 \times 10^8$	8,29
T7	4 °C	6,453	33,0	671	7,44	12,50	6,21	15,15	398	3,36				
T7	4 °C	6,453	33,0	679	6,68	10,25	5,64	11,85	439	2,87				
T7	4 °C	6,453	33,0	682	6,27	9,41	5,21	10,58	474	2,68				

Ensaio 7														
Dias	temp. de refr.	pH	Acidez	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,572	27,0	736	7,58	11,07	5,58	11,73	406	2,93	$1,83 \times 10^4$	4,26	$4,80 \times 10^4$	4,68
T0		6,572	27,0	734	6,76	9,92	4,99	10,59	458	2,57	$1,97 \times 10^4$	4,29	$4,40 \times 10^4$	4,64
T0		6,572	27,0	732	6,35	9,26	4,71	9,81	494	2,54	$2,10 \times 10^4$	4,32	$4,00 \times 10^4$	4,60
T1	4 °C	6,587	28,0	737	7,51	10,44	5,49	10,85	409	2,86	$1,75 \times 10^4$	4,24	$3,80 \times 10^4$	4,58
T1	4 °C	6,587	28,0	746	7,07	11,04	5,04	11,79	443	2,77	$1,44 \times 10^4$	4,16	$2,60 \times 10^4$	4,41
T1	4 °C	6,587	28,0	750	6,47	9,44	4,57	9,86	491	2,53	$1,49 \times 10^4$	4,17	$3,80 \times 10^4$	4,58
T1	8 °C	6,582	30,0	738	8,10	11,83	5,89	12,50	381	3,11	$1,17 \times 10^5$	5,07	$1,06 \times 10^5$	5,03
T1	8 °C	6,582	30,0	751	7,18	10,50	5,03	10,95	439	2,76	$1,20 \times 10^5$	5,08	$1,06 \times 10^5$	5,03
T1	8 °C	6,582	30,0	746	6,66	9,79	4,74	10,26	473	2,61	$1,04 \times 10^5$	5,02	$1,06 \times 10^5$	5,03
T2	4 °C	6,581	29,0	725	6,62	9,96	4,97	10,78	466	2,66	$3,20 \times 10^4$	4,51	$1,10 \times 10^5$	5,04
T2	4 °C	6,581	29,0	739	6,28	9,22	4,57	9,77	504	2,49	$3,80 \times 10^4$	4,58	$9,00 \times 10^4$	4,95
T2	4 °C	6,581	29,0	754	6,23	12,04	5,75	12,58	381	3,09	$4,40 \times 10^4$	4,64	$7,00 \times 10^4$	4,85
T2	8 °C	6,558	31,0	729	6,95	10,23	5,17	10,92	442	2,75	$1,18 \times 10^6$	6,07	$9,60 \times 10^5$	5,98
T2	8 °C	6,558	31,0	740	6,68	9,82	4,84	10,35	468	2,64	$8,90 \times 10^5$	5,95	$8,10 \times 10^5$	5,91
T2	8 °C	6,558	31,0	738	6,48	9,96	4,75	10,93	484	2,59	$8,80 \times 10^5$	5,94	$7,10 \times 10^5$	5,85
T3	4 °C	6,584	25,0	730	6,87	10,45	5,13	11,26	451	2,75	$2,01 \times 10^5$	5,30	$2,50 \times 10^5$	5,40
T3	4 °C	6,584	25,0	745	6,43	9,43	4,52	9,91	493	2,53	$1,97 \times 10^5$	5,29	$2,00 \times 10^5$	5,30
T3	4 °C	6,584	25,0	761	8,52	12,38	5,85	12,83	380	3,16	$1,89 \times 10^5$	5,28	$2,50 \times 10^5$	5,40
T3	8 °C	6,559	27,5	735	7,14	10,55	5,24	11,17	432	2,81	$1,69 \times 10^7$	7,23	$1,29 \times 10^7$	7,11
T3	8 °C	6,559	27,5	707	6,43	9,57	5,07	10,37	473	2,54	$1,53 \times 10^7$	7,18	$1,17 \times 10^7$	7,07
T3	8 °C	6,559	27,5	749	6,72	9,91	4,75	10,38	470	2,61	$1,55 \times 10^7$	7,19	$1,27 \times 10^7$	7,10
T7	4 °C	6,584	27,5	706	6,50	9,70	5,09	10,69	467	2,68				
T7	4 °C	6,584	27,5	729	6,25	9,25	4,66	9,91	501	2,51				
T7	4 °C	6,584	27,5	743	8,24	12,06	5,92	12,69	377	3,13				

Ensaio 8														
Dias	temp. de refr.	pH	Acidez	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,727	26,5	933	8,88	13,19	3,57	11,64	407	2,69	$3,66 \times 10^5$	5,56	$9,50 \times 10^5$	5,98
T0		6,727	26,5	919	8,35	12,67	3,43	11,18	432	2,59	$4,26 \times 10^5$	5,63	$1,15 \times 10^6$	6,06
T0		6,727	26,5	933	8,26	12,65	3,25	10,91	439	2,53	$3,12 \times 10^5$	5,49	$9,90 \times 10^5$	6,00
T1	4 °C	6,737	29,0	919	8,41	12,42	3,51	11,07	425	2,61	$7,84 \times 10^5$	5,89	$8,20 \times 10^5$	5,91
T1	4 °C	6,737	29,0	928	7,95	11,70	3,22	10,36	456	2,46	$6,96 \times 10^5$	5,84	$7,60 \times 10^5$	5,88
T1	4 °C	6,737	29,0	927	10,22	15,11	4,13	13,36	358	3,06	$9,96 \times 10^5$	6,00	$5,90 \times 10^5$	5,77
T1	8 °C	6,735	30,0	897	8,89	13,13	4,02	11,96	397	2,81	>1000	>3,00	$5,00 \times 10^5$	5,70
T1	8 °C	6,735	30,0	912	8,43	12,39	3,59	11,19	422	2,64	>1000	>3,00	$5,00 \times 10^5$	5,70
T1	8 °C	6,735	30,0	921	8,28	12,36	3,42	10,95	433	2,57	>1000	>3,00	$5,00 \times 10^5$	5,70
T2	4 °C	6,727	29,0	912	8,77	13,05	3,75	11,71	409	2,73	$3,49 \times 10^5$	6,54	$4,90 \times 10^5$	6,69
T2	4 °C	6,727	29,0	923	8,38	12,47	3,41	11,08	431	2,58	$3,80 \times 10^5$	6,58	$4,30 \times 10^5$	6,63
T2	4 °C	6,727	29,0	935	10,81	16,18	4,22	14,14	345	3,17	$3,79 \times 10^6$	6,58	$4,30 \times 10^5$	6,63
T2	8 °C	6,694	30,0	881	9,22	13,94	4,43	12,75	379	2,95	$1,34 \times 10^7$	7,13	$8,80 \times 10^6$	6,94
T2	8 °C	6,694	30,0	909	8,99	13,22	3,86	11,95	400	2,78	$1,06 \times 10^7$	7,03	$9,30 \times 10^6$	6,97
T2	8 °C	6,694	30,0	942	9,03	13,67	3,45	11,76	404	2,69	$1,33 \times 10^7$	7,12	$1,04 \times 10^7$	7,02
T3	4 °C	6,667	26,5	900	8,68	12,58	3,89	11,53	407	2,74	$6,30 \times 10^6$	6,80	$8,00 \times 10^6$	6,90
T3	4 °C	6,667	26,5	919	8,28	12,19	3,42	10,89	435	2,57	$6,00 \times 10^6$	6,78	$4,00 \times 10^6$	6,60
T3	4 °C	6,667	26,5	901	10,48	15,53	4,68	14,12	344	3,23	$7,80 \times 10^6$	6,89	$1,00 \times 10^7$	7,00
T3	8 °C	6,625	28,5	840	9,10	13,82	4,98	13,20	373	3,06	$1,63 \times 10^7$	7,21	$1,40 \times 10^7$	7,15
T3	8 °C	6,625	28,5	841	8,55	12,74	4,66	12,22	395	2,90	$1,84 \times 10^7$	7,26	$1,80 \times 10^7$	7,26
T3	8 °C	6,625	28,5	828	8,27	12,53	4,69	12,16	403	2,87	$1,50 \times 10^7$	7,18	$1,70 \times 10^7$	7,23
T7	4 °C	6,614	30,5	812	9,41	15,99	5,67	15,74	351	3,33				
T7	4 °C	6,614	30,5	820	8,55	10,22	5,04	10,13	384	2,89				
T7	4 °C	6,614	30,5	829	8,09	11,98	4,57	11,68	414	2,82				

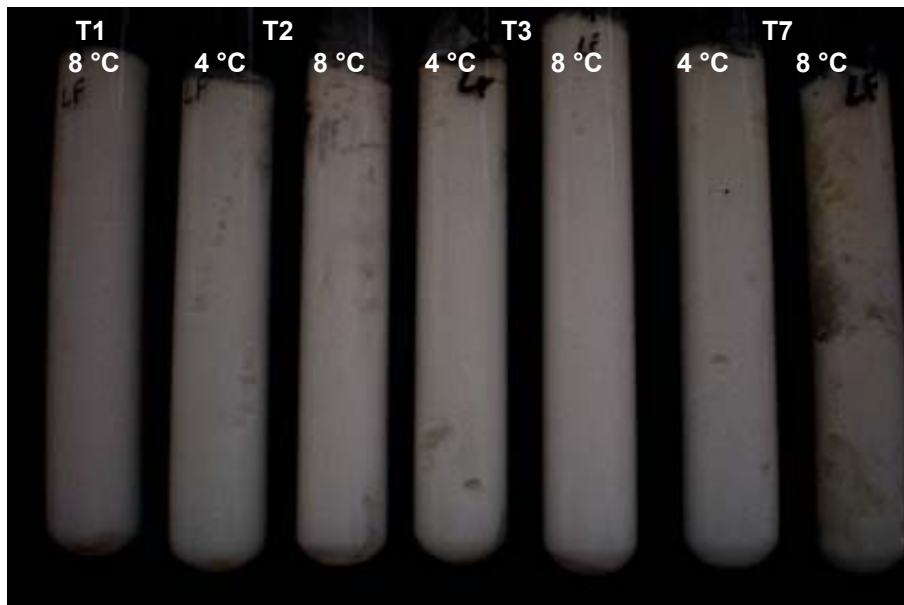
Ensaio 9														
Dias	temp. de refr.	pH	Acidez	R	AR	A2R	A ₂₀	A ₄₀	OK20	A _{30m}	CM 21 °C	Log 21 °C	CM 30 °C	Log 30 °C
T0		6,675	26,5	880	9,70	14,02	4,77	13,02	356	3,08	$2,06 \times 10^5$	5,31	$4,20 \times 10^5$	5,62
T0		6,675	26,5	867	8,64	12,32	4,38	11,73	395	2,84	$1,84 \times 10^5$	5,26	$5,60 \times 10^5$	5,75
T0		6,675	26,5	895	8,26	11,80	3,84	10,92	422	2,64	$2,07 \times 10^5$	5,32	$4,60 \times 10^5$	5,66
T1	4 °C	6,676	27,5	890	8,50	12,36	4,00	14,41	409	2,72	$2,85 \times 10^5$	5,45	$6,10 \times 10^5$	5,79
T1	4 °C	6,676	27,5	894	7,92	11,49	3,72	10,57	442	2,56	$3,13 \times 10^5$	5,50	$5,80 \times 10^5$	5,76
T1	4 °C	6,676	27,5	889	10,04	14,68	11,84	13,59	351	3,16	$3,12 \times 10^5$	5,49	$5,50 \times 10^5$	5,74
T1	8 °C	6,673	28,0	899	9,14	13,59	4,16	12,29	389	2,87	$8,20 \times 10^5$	5,91	$7,00 \times 10^5$	5,85
T1	8 °C	6,673	28,0	899	8,61	12,56	3,87	11,41	409	3,72	$9,10 \times 10^5$	5,96	$7,10 \times 10^5$	5,85
T1	8 °C	6,673	28,0	914	8,62	12,86	3,73	11,38	411	2,68	$7,60 \times 10^5$	5,88	$7,50 \times 10^5$	5,88
T2	4 °C	6,631	28,0	943	8,91	12,72	3,43	11,29	408	2,67	$3,16 \times 10^6$	6,50	$2,60 \times 10^6$	6,41
T2	4 °C	6,631	28,0	949	8,30	12,02	3,12	10,55	439	2,49	$3,17 \times 10^6$	6,50	$3,60 \times 10^6$	6,56
T2	4 °C	6,631	28,0	971	10,84	15,80	3,68	13,51	348	3,05	$3,00 \times 10^6$	6,48	$4,90 \times 10^6$	6,69
T2	8 °C	6,629	30,0	903	9,20	13,43	4,15	12,20	383	2,87	$2,18 \times 10^7$	7,34	$1,29 \times 10^7$	7,11
T2	8 °C	6,629	30,0	921	8,95	12,93	3,71	11,60	397	2,74	$2,29 \times 10^7$	7,36	$1,14 \times 10^7$	7,06
T2	8 °C	6,629	30,0	906	8,64	12,63	3,82	11,46	405	2,71	$2,21 \times 10^7$	7,34	$1,10 \times 10^7$	7,04
T3	4 °C	6,624	29,5	885	8,37	12,12	4,04	11,28	414	2,71	$5,70 \times 10^6$	6,76	$1,60 \times 10^7$	7,20
T3	4 °C	6,624	29,5	896	7,93	11,49	3,69	0,56	442	2,55	$4,10 \times 10^6$	6,61	$2,20 \times 10^7$	7,34
T3	4 °C	6,624	29,5	924	10,65	15,44	4,43	13,81	343	3,18	$4,80 \times 10^6$	6,68	$1,90 \times 10^7$	7,28
T3	8 °C	6,563	32,5	792	8,76	12,74	5,57	12,83	369	3,12	$4,40 \times 10^7$	7,64	$3,30 \times 10^7$	7,52
T3	8 °C	6,563	32,5	809	8,37	12,17	5,08	12,07	391	2,95	$4,40 \times 10^7$	7,64	$2,80 \times 10^7$	7,45
T3	8 °C	6,563	32,5	811	8,34	12,18	5,04	12,06	392	2,94	$4,70 \times 10^7$	7,67	$3,70 \times 10^7$	7,57
T7	4 °C	6,602	31,0	821	8,18	12,09	4,78	11,88	403	2,86				
T7	4 °C	6,602	31,0	838	7,90	11,54	4,38	11,14	425	2,72				
T7	4 °C	6,602	31,0	845	10,34	15,06	5,59	14,49	334	3,41				

ANEXO III

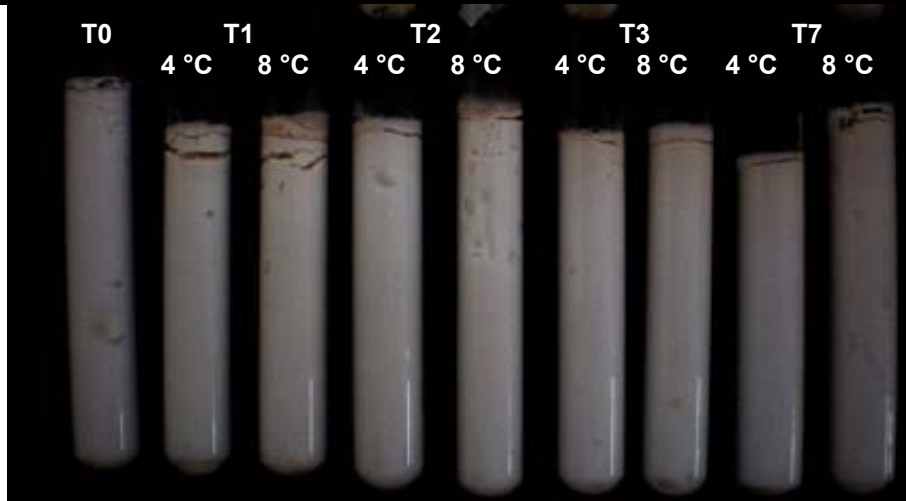
Resultados do teste de lactofermentação.

Dias	Ensaio 8	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Não Coagulou	$4,40 \times 10^4$	$1,97 \times 10^4$
T1 4 °C	Não Coagulou	$3,40 \times 10^4$	$1,56 \times 10^4$
T1 8 °C	Não Coagulou	$1,06 \times 10^5$	$1,14 \times 10^5$
T2 4 °C	Não Coagulou	$9,00 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$
T2 8 °C	Não Coagulou	$8,27 \times 10^5$	$9,83 \times 10^5$
T3 4 °C	Não Coagulou	$2,33 \times 10^5$	$1,96 \times 10^5$
T3 8 °C	Não Coagulou	$1,24 \times 10^7$	$1,59 \times 10^7$
T7 4 °C	Não Coagulou		
T7 8 °C	Proteólise intensa		

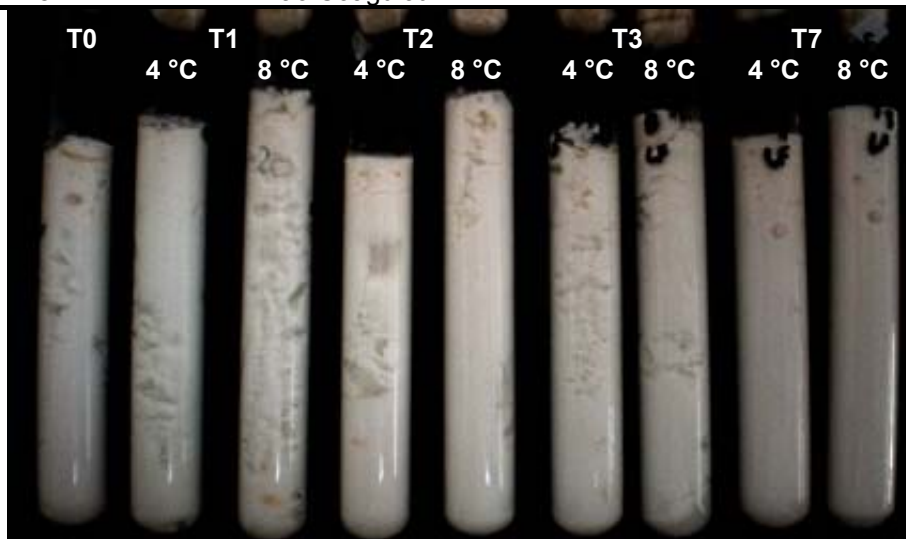
Dias	Ensaio 9	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Não Coagulou	$1,03 \times 10^6$	$3,68 \times 10^5$
T1 4 °C	Coágulo Fraco	$7,23 \times 10^5$	$8,25 \times 10^5$
T1 8 °C	Ligeira produção de gás	$5,00 \times 10^5$	-
T2 4 °C	Ligeira proteólise e produção de gás	$4,50 \times 10^6$	$3,69 \times 10^6$
T2 8 °C	Ligeira produção de gás	$9,50 \times 10^6$	$1,24 \times 10^7$
T3 4 °C	Ligeira proteólise e produção de gás	$7,33 \times 10^6$	$6,70 \times 10^6$
T3 8 °C	Ligeira produção de gás	$1,63 \times 10^7$	$1,66 \times 10^7$
T7 4 °C	Não Coagulou		
T7 8 °C	Muita proteólise		



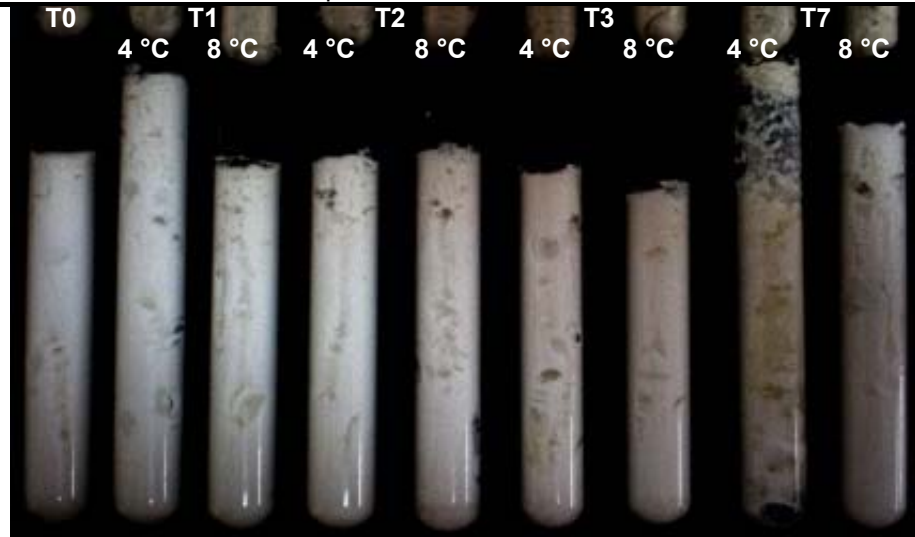
Dias	Ensaio 10	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Diminuta produção de gás	$4,80 \times 10^5$	$1,99 \times 10^5$
T1 4 °C	Diminuta produção de gás	$5,80 \times 10^5$	$3,03 \times 10^5$
T1 8 °C	Diminuta produção de gás	$7,20 \times 10^5$	$8,30 \times 10^5$
T2 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$3,70 \times 10^6$	$3,11 \times 10^6$
T2 8 °C	Ligeira produção de gás e proteólise	$1,18 \times 10^7$	$2,23 \times 10^7$
T3 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$1,90 \times 10^7$	$4,87 \times 10^6$
T3 8 °C	Diminuta produção de gás	$3,27 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$
T7 4 °C	Não Coagulou		
T7 8 °C	Ligeira produção de gás e proteólise		



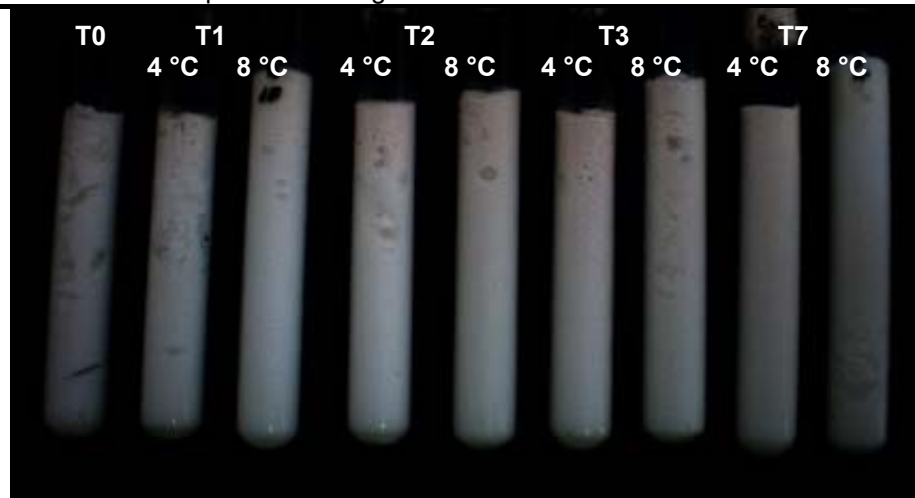
Dias	Ensaio 11	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Ligeira produção de gás e proteólise	$5,47 \times 10^4$	$2,13 \times 10^4$
T1 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$6,33 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$
T1 8 °C	Muita proteólise	$3,33 \times 10^4$	$2,98 \times 10^4$
T2 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$8,33 \times 10^4$	$7,57 \times 10^4$
T2 8 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$1,66 \times 10^6$	$2,04 \times 10^6$
T3 4 °C	Muita proteólise	$5,67 \times 10^5$	$3,53 \times 10^5$
T3 8 °C	Muita proteólise	$6,57 \times 10^6$	$9,67 \times 10^6$
T7 4 °C	Não Coagulou		
T7 8 °C	Não Coagulou		



Dias	Ensaio 12	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Ligeira produção de gás e proteólise	$1,01 \times 10^6$	$7,32 \times 10^5$
T1 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$4,73 \times 10^6$	-
T1 8 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$6,00 \times 10^5$	$5,48 \times 10^5$
T2 4 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$8,77 \times 10^6$	$1,32 \times 10^7$
T2 8 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$1,17 \times 10^7$	$1,15 \times 10^7$
T3 4 °C	Ligeira produção de gás e proteólise	$3,53 \times 10^7$	$4,10 \times 10^7$
T3 8 °C	Ligeira produção de gás e proteólise	$5,70 \times 10^7$	$7,50 \times 10^7$
T7 4 °C	Totalmente digerido		
T7 8 °C	Muita proteólise		



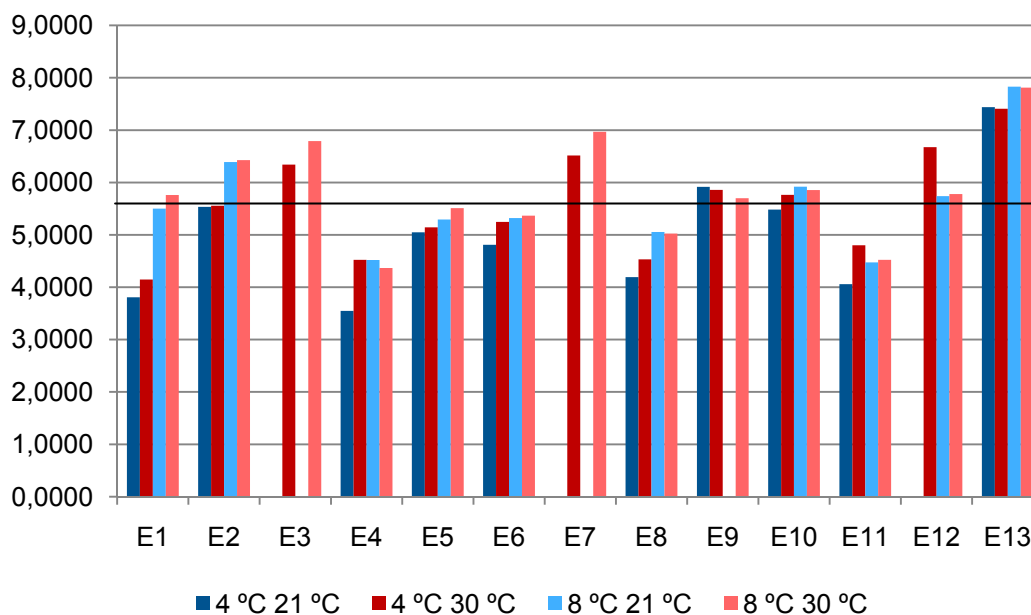
Dias	Ensaio 13	Micro 30 °C	Micro 21 °C
T0	Ligeira produção de gás e proteólise	$7,93 \times 10^6$	-
T1 4 °C	Ligeira produção de gás e proteólise	$2,57 \times 10^7$	$2,76 \times 10^7$
T1 8 °C	Diminuta produção de gás e proteólise	$6,50 \times 10^7$	$6,76 \times 10^7$
T2 4 °C	Ligeira produção de gás e proteólise	$1,56 \times 10^7$	$8,43 \times 10^7$
T2 8 °C	Não coagulado/Coágulo fraco	$5,65 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$
T3 4 °C	Coágulo fraco	$3,33 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$
T3 8 °C	Coágulo fraco/Ligeira produção de gás e proteólise	$2,03 \times 10^8$	$1,60 \times 10^8$
T7 4 °C	Não Coagulou		
T7 8 °C	Ligeira produção de gás e proteólise/coágulo fraco		



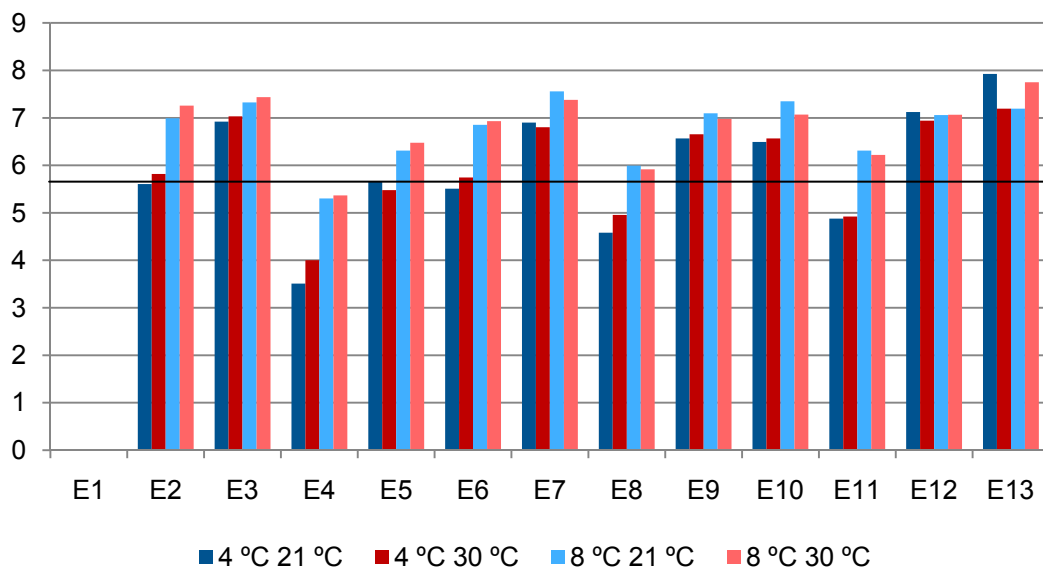
ANEXO IV

Quadros-resumo e respectivos gráficos das contagens microbianas ao longo da refrigeração, com uma linha representando o limite de contagens de mesófilos totais regulamentado (500 000 UFC/mL).

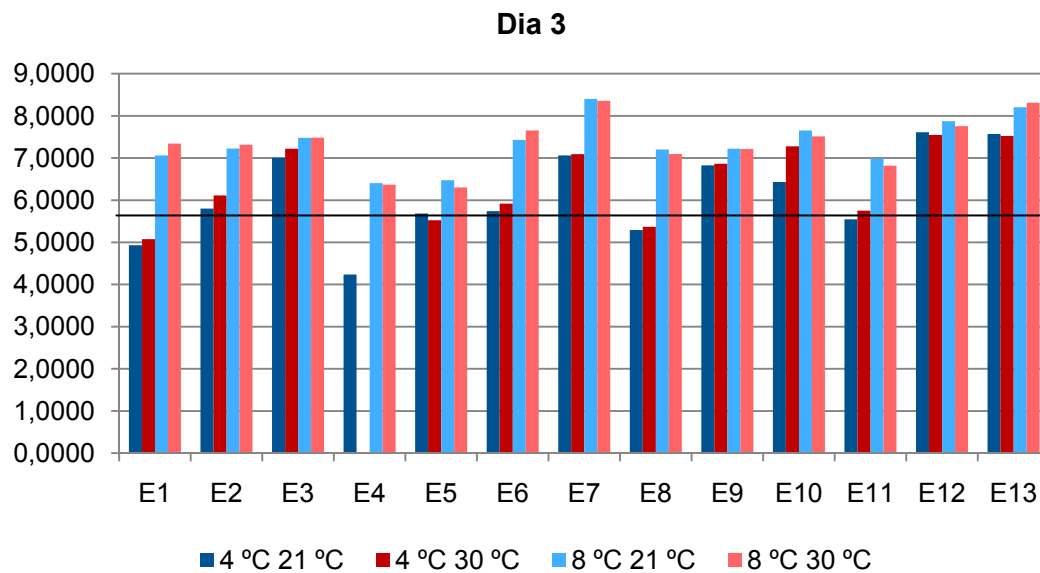
Dia 1	4 °C		8 °C	
	21 °C	30 °C	21 °C	8 °C 30 °C
E1	3,8066	4,1461	5,5015	5,7609
E2	5,5344	5,5563	6,3903	6,4260
E3	-	6,3404	-	6,7924
E4	3,5482	4,5229	4,5211	4,3680
E5	5,0479	5,1441	5,2930	5,5097
E6	4,8115	5,2469	5,3213	5,3683
E7	-	6,5168	-	6,9685
E8	4,1931	4,5315	5,0556	5,0253
E9	5,9166	5,8593	-	5,6990
E10	5,4819	5,7634	5,9191	5,8573
E11	4,0582	4,8016	4,4742	4,5229
E12	-	6,6752	5,7385	5,7782
E13	7,4404	7,4099	7,8299	7,8129



Dia 2	4 °C		8 °C	
	21 °C	30 °C	21 °C	30 °C
E1	-	-	-	-
E2	5,6049	5,8173	6,9906	7,2593
E3	6,9226	7,0334	7,3243	7,4367
E4	3,5097	4,0000	5,3025	5,3680
E5	5,6596	5,4771	6,3096	6,4771
E6	5,5098	5,7432	6,8524	6,9300
E7	6,9013	6,8016	7,5579	7,3790
E8	4,5798	4,9542	5,9927	5,9173
E9	6,5674	6,6532	7,0946	6,9777
E10	6,4928	6,5682	7,3477	7,0707
E11	4,8789	4,9208	6,3096	6,2201
E12	7,1217	6,9428	7,0607	7,0669
E13	7,9260	7,1931	7,1941	7,7508



Dia 3	4 °C		8 °C	
	21 °C	30 °C	21 °C	30 °C
E1	4,9303	5,0743	7,0594	7,3424
E2	5,7993	6,1106	7,2244	7,3153
E3	7,0058	7,2218	7,4771	7,4819
E4	4,2389	-	6,4037	6,3680
E5	5,6842	5,5229	6,4713	6,3010
E6	5,7387	5,9192	7,4294	7,6516
E7	7,0620	7,0899	8,4003	8,3560
E8	5,2915	5,3680	7,2014	7,0946
E9	6,8261	6,8653	7,2192	7,2131
E10	6,4303	7,2788	7,6532	7,5141
E11	5,5482	5,7533	6,9853	6,8173
E12	7,6128	7,5482	7,8751	7,7559
E13	7,5682	7,5229	8,2050	8,3082



ANEXO V

Modelo do caderno semanal usado na recolha dos resultados.

Página 1

Página 2

<p>n° Ensaio</p> <p>Data</p>	<p style="text-align: center;">Teste ATC</p> <p style="text-align: center;">T0</p> <p>Data: Nome ficheiro: 1 h a 32 °C pH =</p> <p style="text-align: center;">Acidez=</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Cuvete</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Conc. Coalho</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> </tr> <tr> <td>R</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>AR</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A2R</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₂₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₄₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>OK20</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>A_{30m}</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">T1</p> <p>Data: Nome ficheiro: 1 h a 32 °C pH = 4 °C 8 °C</p> <p style="text-align: center;">Acidez= 4 °C 8 °C</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Temp.</th> <th colspan="3">4 °C</th> <th colspan="3">8 °C</th> </tr> <tr> <th>Cuvete</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Conc. Coalho</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> </tr> <tr> <td>R</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>AR</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A2R</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₂₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₄₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>OK20</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>A_{30m}</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Cuvete	8	9	10	Conc. Coalho	0,08%			R	:	:	:	AR				A2R				A ₂₀				A ₄₀				OK20	:	:	:	A _{30m}				Temp.	4 °C			8 °C			Cuvete	5	6	7	8	9	10	Conc. Coalho	0,08%			0,08%			R	:	:	:	:	:	:	AR							A2R							A ₂₀							A ₄₀							OK20	:	:	:	:	:	:	A _{30m}						
Cuvete	8	9	10																																																																																																								
Conc. Coalho	0,08%																																																																																																										
R	:	:	:																																																																																																								
AR																																																																																																											
A2R																																																																																																											
A ₂₀																																																																																																											
A ₄₀																																																																																																											
OK20	:	:	:																																																																																																								
A _{30m}																																																																																																											
Temp.	4 °C			8 °C																																																																																																							
Cuvete	5	6	7	8	9	10																																																																																																					
Conc. Coalho	0,08%			0,08%																																																																																																							
R	:	:	:	:	:	:																																																																																																					
AR																																																																																																											
A2R																																																																																																											
A ₂₀																																																																																																											
A ₄₀																																																																																																											
OK20	:	:	:	:	:	:																																																																																																					
A _{30m}																																																																																																											

Página 3

Página 4

<p style="text-align: center;">T2</p> <p>Data: Nome ficheiro: 1 h a 32 °C pH = 4 °C 8 °C</p> <p style="text-align: center;">Acidez= 4 °C 8 °C</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Temp.</th> <th colspan="3">4 °C</th> <th colspan="3">8 °C</th> </tr> <tr> <th>Cuvete</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Conc. Coalho</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> </tr> <tr> <td>R</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>AR</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A2R</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₂₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₄₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>OK20</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>A_{30m}</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">T3</p> <p>Data: Nome ficheiro: 1 h a 32 °C pH = 4 °C 8 °C</p> <p style="text-align: center;">Acidez= 4 °C 8 °C</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Temp.</th> <th colspan="3">4 °C</th> <th colspan="3">8 °C</th> </tr> <tr> <th>Cuvete</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Conc. Coalho</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> </tr> <tr> <td>R</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>AR</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A2R</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₂₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₄₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>OK20</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>A_{30m}</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Temp.	4 °C			8 °C			Cuvete	5	6	7	8	9	10	Conc. Coalho	0,08%			0,08%			R	:	:	:	:	:	:	AR							A2R							A ₂₀							A ₄₀							OK20	:	:	:	:	:	:	A _{30m}							Temp.	4 °C			8 °C			Cuvete	5	6	7	8	9	10	Conc. Coalho	0,08%			0,08%			R	:	:	:	:	:	:	AR							A2R							A ₂₀							A ₄₀							OK20	:	:	:	:	:	:	A _{30m}							<p style="text-align: center;">T7</p> <p>Data: Nome ficheiro: 1 h a 32 °C pH = 4 °C 8 °C</p> <p style="text-align: center;">Acidez= 4 °C 8 °C</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Temp.</th> <th colspan="3">4 °C</th> <th colspan="3">8 °C</th> </tr> <tr> <th>Cuvete</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Conc. Coalho</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">0,08%</td> </tr> <tr> <td>R</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>AR</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A2R</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₂₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>A₄₀</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>OK20</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> <td style="text-align: center;">:</td> </tr> <tr> <td>A_{30m}</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Temp.	4 °C			8 °C			Cuvete	5	6	7	8	9	10	Conc. Coalho	0,08%			0,08%			R	:	:	:	:	:	:	AR							A2R							A ₂₀							A ₄₀							OK20	:	:	:	:	:	:	A _{30m}						
Temp.	4 °C			8 °C																																																																																																																																																																																																															
Cuvete	5	6	7	8	9	10																																																																																																																																																																																																													
Conc. Coalho	0,08%			0,08%																																																																																																																																																																																																															
R	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
AR																																																																																																																																																																																																																			
A2R																																																																																																																																																																																																																			
A ₂₀																																																																																																																																																																																																																			
A ₄₀																																																																																																																																																																																																																			
OK20	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
A _{30m}																																																																																																																																																																																																																			
Temp.	4 °C			8 °C																																																																																																																																																																																																															
Cuvete	5	6	7	8	9	10																																																																																																																																																																																																													
Conc. Coalho	0,08%			0,08%																																																																																																																																																																																																															
R	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
AR																																																																																																																																																																																																																			
A2R																																																																																																																																																																																																																			
A ₂₀																																																																																																																																																																																																																			
A ₄₀																																																																																																																																																																																																																			
OK20	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
A _{30m}																																																																																																																																																																																																																			
Temp.	4 °C			8 °C																																																																																																																																																																																																															
Cuvete	5	6	7	8	9	10																																																																																																																																																																																																													
Conc. Coalho	0,08%			0,08%																																																																																																																																																																																																															
R	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
AR																																																																																																																																																																																																																			
A2R																																																																																																																																																																																																																			
A ₂₀																																																																																																																																																																																																																			
A ₄₀																																																																																																																																																																																																																			
OK20	:	:	:	:	:	:																																																																																																																																																																																																													
A _{30m}																																																																																																																																																																																																																			

Página 5

Testes Físico-químicos

Acidez (mL NaOH N/L leite)	
MG (%)	
Azoto	
Humidade (%)	
Densidade	

Cálculos:

- Acidez:
(10 mL leite + Fenolftaleína)
Vol. NaOH gasto = _____
- MG
(10 mL H₂SO₄, d=1,826 + 11 mL leite + 1 mL Álcool Amílico, centrifuga 7-8 min)

- Azoto
(1 mL leite + 1 pastilha + 5 mL H₂SO₄, pro-análise)

- Humidade
(15g de areia - 3 h estufa + 5 mL leite)

	Peso cápsula + areia
	+ 5 mL leite
	1ª Pesagem
	2ª Pesagem
	3ª Pesagem
	4ª Pesagem
	5ª Pesagem
	6ª Pesagem
	7ª Pesagem

$$RS = \frac{R}{M} = \frac{F-tara}{L-tara}$$

Página 6

Contagens - Microbiologia
21 °C

T0 - Data

Diluições			
1			
2			
3			

T1 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

T2 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

T3 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

Observações:

Página 7

30 °C

T0 - Data

Diluições			
1			
2			
3			

T1 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

T2 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

T3 - Data

4 °C			
1			
2			
3			
8 °C			
1			
2			
3			

Observações: