



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Optimização dos parâmetros físico-químicos e controlo microbiológico do Requeijão da Beira Baixa DO

Mafalda Maria Caixado Varejão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Dr.^a Patrícia Dinis
Co-orientador: Prof. Doutor António Mendonça

Covilhã, Outubro de 2012

Dedicatória

Aos meus Pais.

À minha irmã Carolina.

Agradecimentos

Agradeço à Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa - Idanha-a-Nova, CRL pela oportunidade de realizar este projecto no laboratório da fábrica e também por todo o material que me disponibilizaram. Agradeço também a todos os trabalhadores da Cooperativa pela simpatia, paciência e ajuda que demonstraram ao longo destes meses.

À Dr.^a Patrícia Dinis, pela disponibilidade e orientação na dissertação e no estágio realizado na Cooperativa.

Ao Professor Doutor António Mendonça, pela orientação, disponibilidade, partilha de opiniões e ideias.

À D. Ana Maria Brás, por toda a ajuda, assistência e paciência no laboratório.

Aos meus pais e à minha irmã, pela possibilidade que me deram de realizar este mestrado, por me terem ouvido, aconselhado e dado força nos momentos de desânimo, o meu muito obrigado.

Por último, à Universidade da Beira Interior.

Declaro que todos os dados presentes nesta dissertação de mestrado são da minha inteira responsabilidade.

(Mafalda Maria Caixado Varejão)

Por opção, esta dissertação de mestrado não segue o novo acordo ortográfico.

Resumo

A produção do Requeijão da Beira Baixa DO (Denominação de Origem) está profundamente ligada à produção dos Queijos da Beira Baixa DOP (Denominação de Origem Protegida), uma vez que o soro resultante do fabrico dos queijos é usado como matéria-prima no fabrico do requeijão. Alterações tecnológicas na produção do queijo conduziram a alterações na composição química do soro e do requeijão produzido, tornando-se indispensável a caracterização do soro e do processo de fabrico do requeijão actual, com vista ao cumprimento das especificações DO.

O objectivo deste estudo foi proceder à caracterização e optimização do fabrico de requeijão para cumprimento das especificações do Requeijão da Beira Baixa DO.

Foram analisadas 118 amostras de requeijão para determinação da percentagem de humidade e de matéria gorda, 8 amostras para a determinação da percentagem de cinzas, 5 amostras para a determinação da percentagem de proteína total e 28 amostras para contagem de microrganismos totais, *Escherichia coli*, Coliformes totais, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*. O soro usado no fabrico do requeijão e o rescaldão resultante foram analisados para a determinação da percentagem de matéria gorda e de proteína total.

O requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa apresentou valores médios de 74,5% de humidade e 10,5% de matéria gorda, que estão fora dos limites especificados para o Requeijão da Beira Baixa DO. Os valores obtidos para a proteína total (10,9%) e para as cinzas (1,6%) estão dentro dos limites especificados. Não foram detectados microrganismos patogénicos no requeijão.

Foram realizados ensaios de fabrico de requeijão com 7, 8, 9 e 10% de adição de leite de ovelha ao soro para optimização dos parâmetros.

Conclui-se que com a adição de 9 a 10% de leite de ovelha ao soro é possível obter um produto que cumpre os limites especificados, desde que o soro contenha 0,38-0,86% de matéria gorda e 1,28-1,76% de proteína total, de forma a obter um requeijão passível de ser certificado como Requeijão da Beira Baixa DO.

Palavras-chave

Requeijão, soro, Denominação de Origem, Optimização do produto.

Abstract

Requeijão da Beira Baixa DO (Designation of Origin) is a Portuguese whey cheese closely related to Beira Baixa cheese PDO (Protected Designation of Origin) production, since whey produced by Beira Baixa cheese PDO manufacturing is used as raw material in whey cheese production. Technological improvements in cheese production resulted in changes in the chemical composition of whey and whey cheese produced, being necessary their characterization in order to fulfill DO specifications.

The aim of this study was to characterize and optimize the production of whey cheese to fulfill *Requeijão da Beira Baixa* DO specifications.

118 samples of whey cheese were analyzed for moisture (%) and fat (%), 8 samples for the determination of ash (%) and 5 samples for determination of total protein (%). 28 of the initial 118 samples were monitored for total microorganisms, *Escherichia coli*, total coliforms, *Staphylococcus* coagulase positive, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. The whey used as raw material in whey cheese production and the remaining liquid after collecting whey cheese (*rescaldão*) were analyzed for the determination of fat (%) and total protein (%).

The whey cheese produced showed mean values of 74.5% of moisture and 10.5% of fat, which are outside the limits specified for *Requeijão da Beira Baixa* DO. The values obtained for the total protein (10.2%) and ash (1.6%) are within specified limits. Pathogenic microorganisms were not detected in whey cheese.

Trials with the addition of 7, 8, 9 and 10% of sheep's milk to whey were made for the whey cheese production and optimization to fulfill the *Requeijão da Beira Baixa* DO specifications.

In conclusion, the addition of 9 to 10% of sheep milk to whey allows obtaining a product that meets the specifications, since the whey contains 0.38-0.86% of fat and 1.28-1.76% of total protein, in order to obtain a whey cheese which can be certified as *Requeijão da Beira Baixa* DO.

Keywords

Whey cheese, whey, Designation of Origin, Product Optimization

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xvi
Lista de tabelas	xx
Lista de acrónimos	xxii
Capítulo 1 - Introdução	
1.1 - Leite	1
1.2 - Soro	2
1.2.1 - Propriedades nutricionais do soro	2
1.3 - Requeijão	3
1.3.1 - Processo de Produção	4
1.3.2 - Características físicas do requeijão	6
1.4 - Denominação de origem	6
1.4.1 - Critérios definidos pelo Despacho n.º4184/2011	6
1.5 - Objectivo	7
1.6 - Parâmetros físico-químicos	7
1.6.1 - Humidade	7
1.6.2 - Matéria gorda	7
1.6.3 - Proteína total	7
1.6.4 - Cinzas	8
1.6.5 - pH	8
1.6.6 - Fosfatase alcalina	8
1.6.7 - Composição do soro e rescaldão	8
1.7 - Controlo microbiológico	9
1.7.1 - <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	9
1.7.2 - Coliformes totais/ <i>Escherichia coli</i>	10
1.7.3 - Microrganismos totais	10
1.7.4 - <i>Pseudomonas</i> spp.	10
1.7.5 - <i>Salmonella</i> spp.	11
1.7.6 - <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	
2.1 - Materiais e reagentes	12
2.2 - Análises físico-químicas	13
2.2.1 - Determinação da humidade	13
2.2.2 - Determinação da matéria gorda	14

2.2.3 - Determinação da proteína total	14
2.2.4 - Determinação das cinzas	15
2.2.5 - Determinação do pH e temperatura	16
2.2.6 - Determinação da fosfatase alcalina	16
2.2.7 - Determinação da composição do soro e rescaldão	17
2.3 - Controlo microbiológico	17
2.3.1 - Diluições	17
2.3.2 - Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	17
2.3.3 - Contagem de Coliformes totais/ <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.4 - Contagem de Microrganismos totais	19
2.3.5 - Contagem de <i>Pseudomonas spp.</i>	20
2.3.6 - Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	21
2.3.7 - Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.4 - Ensaio laboratoriais	24
2.5 - Validação do método	26
2.6 - Análise sensorial	26
Capítulo 3 - Resultados/ Discussão	
3.1 - Análise dos parâmetros físico-químicos	27
3.1.1 - Leite e soro	27
3.1.2 - Requeijão	31
3.2 - Optimização dos parâmetros físico-químicos do requeijão	36
3.2.1 - Taxas de recuperação	42
3.2.2 - Validação do método	43
3.3 - Controlo microbiológico	44
3.4 - Análise sensorial	52
Capítulo 4 - Conclusões	
4.1 - Conclusões gerais	54
4.2 - Perspectivas futuras	55
Bibliografia	56
Anexo 1	60

Lista de Figuras

Figura 1 - (A) Soro resultante do fabrico dos queijos; (B) Coagulação do soro.	5
Figura 2 - (A) Massa do requeijão; (B) Cestos de plástico onde é colocado o requeijão.	5
Figura 3 - (A) Requeijão embrulhado em papel; (B) Requeijão embalado a vácuo.	6
Figura 4 - Determinação da humidade. Cápsula com areia e requeijão após a secagem em estufa a 100°C durante 4 horas.	13
Figura 5 - Determinação da matéria gorda. (A) Butirómetro com requeijão; (B) Butirómetro após centrifugação.	14
Figura 6 - Determinação da proteína total. (A) Tubos com a amostra e o reagente de ataque; (B) Digestor; (C) Destilador; (D) Titulador automático.	15
Figura 7 - Determinação das cinzas. (A) Mufla; (B) Requeijão após incineração a 550°C.	15
Figura 8 - Determinação do pH e da temperatura através do potenciómetro.	16
Figura 9 - (A) Kit comercial utilizado na determinação da fosfatase alcalina; (B) Dissolução do reagente I e II (tubo 1) e resultado negativo para a fosfatase alcalina (tubo 2).	16
Figura 10 - Determinação da composição do soro através do Milkoscan.	17
Figura 11 - Colónias características de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva no meio BPA.	18
Figura 12 - Colónias características de <i>Escherichia coli</i> (azuis) e Coliformes (cor-de-rosa), no meio Compass Ecc Agar.	19
Figura 13 - Microrganismos totais no meio PCA.	20
Figura 14 - Colónias características de <i>Pseudomonas spp.</i> no meio CFC Agar.	20
Figura 15 - (A) Caldo de pré-enriquecimento; (B) Caldo de enriquecimento Rappaport e Selenito-Cistina, respectivamente; (C) Placas de petri contendo o meio Salmonella Chromogenic Agar e o meio Shigella Agar, respectivamente.	21
Figura 16 - Colónias características de <i>Salmonella spp.</i> no meio Salmonella Chromogenic Agar.	22
Figura 17 - Colónias características de <i>Salmonella spp.</i> no meio SS Agar.	22
Figura 18 - Teste rápido para confirmação de colónias de <i>Salmonella spp.</i> ; 1 - Controlo negativo; 2 - Controlo positivo, onde se verifica a aglutinação das partículas; 3 a 6 - Resultado negativo para as colónias características de <i>Salmonella spp.</i>	23
Figura 19 - (A) Caldo de enriquecimento primário semi-Fraser; (B) Caldo de enriquecimento secundário Fraser; (C) Placa de petri contendo o meio Listeria Selective Agar.	23
Figura 20 - Colónias características de <i>Listeria monocytogenes</i> no meio	

Listeria Selective Agar Base.	24
Figura 21 - (A) Soro resultante do fabrico dos queijos da Beira Baixa utilizado nos ensaios laboratoriais; (B) Início da coagulação.	25
Figura 22 - Escorrimento do requeijão.	25
Figura 23 - Volume de leite utilizado e percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro, ao longo do tempo.	27
Figura 24 - Percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro ao longo do tempo.	28
Figura 25 - Volume de leite utilizado e percentagem de proteína total presente no leite e no soro ao longo do tempo.	29
Figura 26 - Percentagem de proteína total presente no leite e no soro ao longo do tempo.	30
Figura 27 - Variação da percentagem de humidade do requeijão ao longo do tempo.	31
Figura 28 - Variação da percentagem de matéria gorda do requeijão ao longo do tempo.	32
Figura 29 - Percentagem de matéria gorda do requeijão em função da percentagem de matéria gorda do soro.	33
Figura 30 - Variação da percentagem de proteína total do requeijão ao longo do tempo.	34
Figura 31 - Percentagem de proteína total do requeijão em função da percentagem de proteína total do soro.	35
Figura 32 - Variação da percentagem de cinzas do requeijão ao longo do tempo.	35
Figura 33 - Variação da percentagem de humidade do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha.	36
Figura 34 - Variação da percentagem de matéria gorda do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha.	38
Figura 35 - Variação da percentagem de proteína total do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha.	39
Figura 36 - Variação da percentagem de cinzas do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha.	41
Figura 37 - Distribuição dos valores de contagem de Microrganismos totais (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.	45
Figura 38 - Distribuição dos valores de contagem de Microrganismos totais (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado.	45
Figura 39 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de	

Queijos da Beira Baixa.	46
Figura 40 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado.	47
Figura 41 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Escherichia coli</i> (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.	48
Figura 42 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Escherichia coli</i> (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado.	48
Figura 43 - Distribuição dos valores de contagem de Coliformes totais (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.	49
Figura 44 - Distribuição dos valores de contagem de Coliformes totais (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado.	50
Figura 45 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Pseudomonas spp.</i> (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.	50
Figura 46 - Distribuição dos valores de contagem de <i>Pseudomonas spp.</i> (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado.	51
Figura 47 - Resultados da prova sensorial para a aparência/ textura do requeijão.	52
Figura 48 - Resultados da prova sensorial para o sabor do requeijão.	53
Figura 49 - Resultados da prova sensorial para o odor do requeijão.	53
Figura 50 - Resultados da prova sensorial para a cor do requeijão.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição do leite (%) de algumas espécies.	1
Tabela 2 - Critérios estabelecidos pelo Despacho n.º4184/2011 para o Requeijão da Beira Baixa DO.	7
Tabela 3 - Reagentes utilizados.	12
Tabela 4 - Equipamentos utilizados.	12
Tabela 5 - Meios de cultura utilizados.	13
Tabela 6 - Diferentes percentagens e volumes de leite de ovelha adicionado ao soro nos ensaios laboratoriais.	25
Tabela 7 - Valores obtidos para a percentagem de matéria gorda do leite e do soro.	28
Tabela 8 - Valores obtidos para a percentagem de proteína total do leite e do soro.	30
Tabela 9 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de humidade em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.	37
Tabela 10 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de matéria gorda em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.	38
Tabela 11 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de proteína total em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.	40
Tabela 12 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de cinzas em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.	41
Tabela 13 - Valores médios obtidos e respectivo desvio-padrão para o pH do requeijão.	42
Tabela 14 - Matéria gorda presente no soro e no rescaldão para o requeijão sem leite e para os requeijões com diferentes percentagens de leite adicionado e respectivas taxas de recuperação.	42
Tabela 15 - Proteína total presente no soro e no rescaldão para o requeijão sem leite e para os requeijões com diferentes percentagens de leite adicionado e respectivas taxas de recuperação.	43
Tabela 16 - Valores médios obtidos da percentagem de humidade, matéria gorda, proteína total e cinzas para o requeijão (controlo) e para o requeijão com 8% de leite.	44

Lista de Acrónimos

DO	Denominação de Origem
DOP	Denominação de Origem Protegida
MRD	Maximum Recovery Diluent
BPA	Baird Parker Agar
RPF	Rabbit Plasma Fibrinogen
PCA	Plate Count Agar
SS Agar	Salmonella Shigella Agar

Capítulo 1 - Introdução

O leite e os seus derivados, classificados como lacticínios, apresentam uma grande importância económica e alimentar. O principal lacticínio produzido é o queijo e o soro resultante do seu processo de fabrico dá origem ao requeijão.

1.1 - Leite

O leite é um fluido que é segregado pela fêmea de todos os mamíferos, cuja função principal é satisfazer as exigências nutricionais das crias recém-nascidas (Fox e McSweeney, 1998). O leite apresenta na sua constituição água, lactose, lípidos e proteínas. A água é o componente principal da maioria dos produtos lácteos e influencia as alterações físicas, químicas e microbiológicas que ocorrem nos produtos. A lactose é o principal glúcido presente no leite. É um dissacarídeo constituído por galactose e glicose. O leite contém alguns vestígios de outros açúcares, como frutose, glucosamina e galactosamina. Os triacilgliceróis representam 97-98% dos lípidos totais presentes no leite. Os lípidos existem num estado emulsionado, na forma de glóbulos. Também fazem parte da constituição do leite: fosfolípidos; colesterol; diacilgliceróis; monoacilgliceróis e ácidos gordos livres (Belitz *et al.*, 2009). Contudo, a composição química do leite varia consoante as espécies (tabela 1). O leite de ovelha é mais rico em sólidos totais, gordura, proteína e cinzas do que o leite de leite de cabra, vaca e humano (tabela 1).

Tabela 1 - Composição do leite (%) de algumas espécies (adaptado de Fox e McSweeney, 1998).

Espécie	Sólidos Totais (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)
Humana	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Bovina	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Caprina	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Ovina	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0

O leite é um fluido biológico muito variável. Para além das diferenças entre espécies, o leite varia com a individualidade do animal, ou seja, com a raça, saúde, estado nutricional, fase de lactação, idade e intervalo entre as ordenhas (Fox e McSweeney, 1998).

O leite utilizado no fabrico dos queijos pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa é leite de ovelha ou mistura de leite de ovelha e cabra. As variações na composição do leite influenciam a produção e as características do queijo e conseqüentemente a produção e as características do requeijão (Comunicação pessoal).

As proteínas do leite são divididas em dois grupos, as caseínas (hidrofóbicas) e as proteínas do soro (hidrofílicas). As caseínas estão dispersas no leite sob a forma de agregados coloidais,

constituídos pelas α , β , γ e k-caseína. As principais proteínas do soro são a β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina e a albumina sérica (Hui, 2006). O leite também contém vitaminas e nutrientes essenciais ao crescimento. As vitaminas hidrossolúveis são as vitaminas que fazem parte do denominado complexo B e a vitamina C. As vitaminas lipossolúveis são as vitaminas A, D, E e K. Os nutrientes do leite são os iões: fosfatos; citratos; cloretos; sulfatos; carbonatos e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Encontram-se também, em quantidades vestigiais: cobre; ferro; silício; zinco e iodo (Fox e McSweeney, 1998).

1.2 - Soro

O soro de leite é um co-produto da fabricação de queijo, na indústria dos lacticínios. Após a coagulação das proteínas do leite através da acção da quimosina (coalho) ou de um ácido orgânico, o líquido resultante é denominado de soro de leite (Robinson, 1994). O soro apresenta uma coloração amarelo-esverdeado que depende da qualidade e do tipo de leite utilizado (Smithers, 2008). No processo de fabrico do queijo, cerca de 99% da lactose presente no leite passa para o soro. O elevado teor de lactose presente no soro contribui para que este seja considerado como um dos alimentos mais poluentes da indústria alimentar (Smithers, 2008). Assim, a maior parte do soro de leite é tratada como efluente. Esta opção implica não só uma perda de nutrientes importantes para consumo humano, como provoca a poluição das reservas de água doce (Pintado et al., 1996). Estima-se que 100 kg de soro líquido têm uma força poluente equivalente aos detritos produzidos num dia por 45 pessoas (Pintado e Malcata, 1999). No caso do leite de ovelha, são necessários 5-6 L de leite para fazer 1 Kg de queijo e são produzidos cerca de 3-4 L de soro de ovelha (Comunicação pessoal).

1.2.1 - Propriedades nutricionais do soro

O soro possui um valor nutritivo elevado. Para o soro passa a maior parte da água do leite, quase toda a lactose (88-99%), proteínas (21-25%), lípidos (6-12%) e sais minerais (62-89%) (Pintado e Malcata, 1999). O soro tem na sua constituição as proteínas do soro e proteínas minoritárias (imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e factores de crescimento) (Smithers, 2008).

As proteínas do soro têm um valor biológico superior ao das proteínas do ovo, da carne, da soja, da caseína e do peixe. O valor biológico refere-se à forma como o corpo humano pode utilizar as proteínas consumidas. Desta forma, as proteínas do soro são as escolhidas por fisiculturistas e atletas de elite. As proteínas do soro são uma fonte rica em aminoácidos essenciais e em aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina, isoleucina e valina. Os aminoácidos de cadeia ramificada desempenham um papel como reguladores do metabolismo das proteínas e da homeostase da glicose, do metabolismo dos lípidos e, como tal, desempenham um papel no controlo do peso. O soro também é rico em aminoácidos que

contêm enxofre como a cisteína e metionina. Estes aminoácidos têm um papel crítico como anti-oxidantes (Smithers, 2008).

O soro possui efeitos anticancerígenos. Algumas proteínas e péptidos específicos presentes no soro têm potenciais efeitos contra certos tumores (cancro do cólon, mama, pele e próstata). A maioria das evidências tem sido baseada em culturas de células *in vitro*, em estudos em animais *in vivo*. Por exemplo, uma dieta baseada nas proteínas do soro de leite mostrou ser mais eficaz do que uma dieta com outras proteínas (caseína, carne e soja) na redução da incidência de tumores do cólon, num modelo animal de ratos doentes (Hakkak *et al.*, 2001).

O soro de leite contém uma pluralidade de factores de crescimento (IGF-I, IGF-II, PDGF) que possuem uma potente actividade no crescimento das células de mamíferos e efeitos notáveis na cura de feridas (Smithers, 2008).

A lactoferrina presente no soro possui efeitos antimicrobianos e contribui para a melhoria do crescimento dos ossos, pois estimula o crescimento de osteoblastos e a inibição de osteoclastos. Desta forma, a utilização da lactoferrina como complemento é uma das várias estratégias para a prevenção e tratamento da osteoporose (Cornish *et al.*, 2004).

Produtos que contêm lactoperoxidase são indicados no tratamento de problemas orais (gengivites e mau hálito) e as imunoglobulinas encontradas no soro conferem imunidade passiva ao consumidor, ajudando no combate das infecções (Smithers, 2008).

Os componentes do soro, principalmente as proteínas e os péptidos, são cada vez mais utilizados como ingredientes para alimentos funcionais e nutracêuticos e como agentes medicinais activos, de forma a contribuírem para a saúde e bem-estar. No futuro, espera-se que o soro deixe de ser um subproduto poluente na indústria dos lacticínios e venha a ser purificado e utilizado em novos alimentos funcionais (Smithers, 2008).

Para além da produção de Requeijão, uma das formas de aproveitar o soro é através da produção de bebidas à base de soro de queijo de cabra, aromatizado com morango e polpa de pêsego. Estas bebidas têm um baixo valor calórico, apresentam uma boa aceitabilidade por parte dos consumidores e têm um custo mínimo adicional para a indústria dos lacticínios (Tranjan *et al.*, 2009). A produção de um molho para salada com soro de leite como fase aquosa também pode ser uma alternativa para a indústria alimentar (Fonseca *et al.*, 2009).

1.3 - Requeijão

Em Portugal existe uma tradição de fabrico de um queijo de soro de leite chamado Requeijão, produzido especialmente com soro de leite de ovelha (Pintado *et al.*, 1996). O requeijão é um produto de elevado valor nutricional, pois é rico em proteína (8,5%) e gordura (29%). Cerca de 50% da massa do requeijão é água e o conteúdo de lactose e ácido láctico é de 3,5% e 0,5%, respectivamente (Pintado e Malcata, 1999).

Verificou-se um aumento da longevidade em idosos, numa série de regiões rurais de Portugal, que sobrevivem com uma dieta baseada essencialmente em requeijão, complementada pelo rescaldão (soro resultante do fabrico do requeijão) como bebida de

acompanhamento (Tavares e Malcata, 2011). No processo de fabrico dos queijos é utilizado como coagulante a flor do cardo (*Cynara cardunculus*), que liberta cardosinas (enzimas proteolíticas) que ficam retidas no queijo e também no soro, que depois é utilizado no fabrico do requeijão. Assim, as proteínas do soro e os péptidos libertados pelas cardosinas residuais ficam retidos no requeijão. Estas proteínas com actividade biológica desencadeiam efeitos fisiológicos sobre o sistema cardiovascular. Apesar do teor relativamente elevado de matéria gorda e do uso de sal como agente de tempero, são encontrados no requeijão péptidos que têm a capacidade de inibir estes dois factores de risco de incidência cardiovascular, diminuindo a pressão arterial (Tavares e Malcata, 2011).

O consumo de requeijão contendo estirpes probióticas tem aumentado nos últimos anos, devido ao melhoramento do estado de saúde associado (Madureira *et al.*, 2008). Esta tendência tem impulsionado a produção de novos produtos. Foram produzidos requeijões a partir de soro de leite de ovino ou bovino, inoculados com uma estirpe probiótica (*Lactobacillus paracasei* LAFTI (R) 26) à qual se adicionou açúcar, açúcar e aloé vera, açúcar e chocolate e açúcar e geleia. As substâncias adicionadas melhoraram as características organolépticas dos requeijões e produzem diferentes padrões de textura (Madureira *et al.*, 2008).

O requeijão é um alimento importante e altamente recomendado pelos nutricionistas. Como é um produto muito perecível, é importante alargar a sua vida de prateleira e mantê-lo fresco durante um longo período de tempo. Uma das formas de preservar o requeijão é através da técnica de embalagem a vácuo, que altera o ambiente em torno do produto na embalagem, a fim de retardar as alterações sensoriais e microbiológicas (Khoshgozaran *et al.*, 2012)

1.3.1 - Processo de produção

Designa-se “Requeijão da Beira Baixa” o produto resultante da precipitação ou coagulação, pelo calor, do soro resultante do fabrico dos Queijos da Beira Baixa (Queijo de Castelo Branco DOP, Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP, Queijo de Ovelha e Queijo de mistura) (Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações, 2011).

A composição do soro depende do leite, pois no fabrico dos queijos da Beira Baixa pode ser utilizado leite de ovelha ou leite de ovelha e cabra, consoante o tipo de queijo que se está a laborar, ou seja, queijo de ovelha ou queijo de mistura. Concluída a laboração do queijo, coa-se o soro para eliminar o chamado repiso ou restos de coalhada, que prejudicariam a qualidade do requeijão. De seguida, o soro (figura 1A) é submetido a um aquecimento e mantido em constante movimento lento até se observar o início da coagulação, pelo aparecimento de flocos que, dada a sua baixa densidade, vão flutuando à superfície (figura 1B).



Figura 1 - (A) Soro resultante do fabrico dos queijos. **(B)** Coagulação do soro.

A coagulação ocorre normalmente entre 80° a 90°C. O processo de fabrico do requeijão demora entre 1 hora a 1 hora e 30 minutos. A fase seguinte do fabrico consiste em retirar, com uma escumadeira, a massa resultante da coagulação (figura 2A) e dispô-la em pequenos cestos de plástico, para obter a forma, tamanho e consistência desejadas, após o que fica a drenar durante alguns minutos (figura 2B).

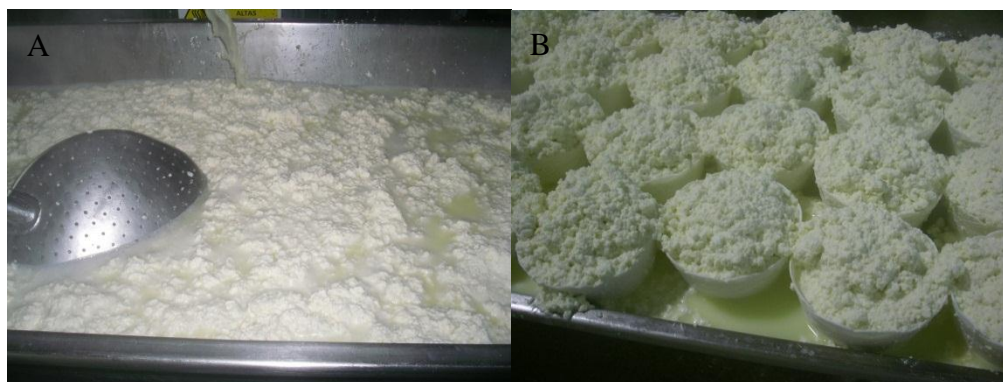


Figura 2 - (A) Massa do requeijão. **(B)** Cestos de plástico onde é colocado o requeijão.

O líquido residual resultante do fabrico do requeijão designa-se rescaldão e normalmente é utilizado para alimentação animal. A operação final da produção de requeijão consiste em retirar a massa dos cestos e embrulhá-la em papel, quando esta se encontra fria e não há escorrimento do rescaldão (figura 3A).

Apesar do requeijão ser produzido a uma temperatura entre os 80 a 90°C, o teor de proteínas, lactose e água proporcionam o crescimento de microorganismos durante as manipulações pós produção. Assim, os materiais utilizados para o acondicionamento do requeijão têm de ser inócuos e inertes, sendo o requeijão embalado a vácuo (figura 3B), respeitando as boas práticas de higiene, de forma a garantir as características do produto durante o normal período de transporte, armazenagem e venda. O requeijão é armazenado a

uma temperatura de 0 a 6°C e tem uma vida de prateleira de cerca de 9 dias (Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações, 2011).

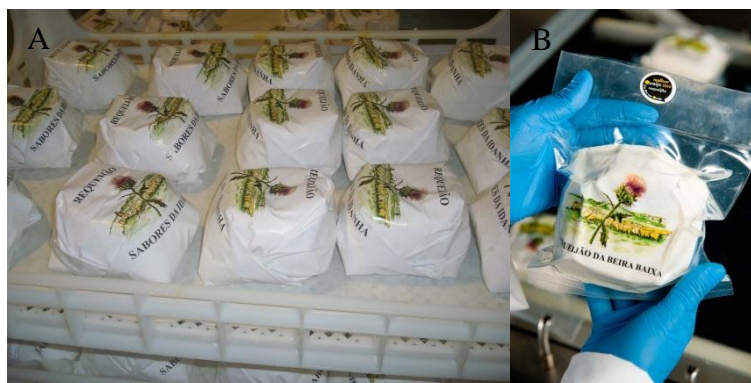


Figura 3 - (A) Requeijão embrulhado em papel (B) Requeijão embalado a vácuo.

1.3.2 - Características físicas do requeijão

O Requeijão da Beira Baixa apresenta-se como um produto fresco, que não sofreu qualquer fermentação, sem casca e com um rendilhado característico que é obtido pelos cestos de plástico, onde é colocada a massa para drenar o excesso de rescaldão. A massa tem uma consistência macia, fatiável ou untável, bem ligada e granulosa, lisa ao corte, de cor branca e sabor láctico adocicado. O peso de cada unidade pode variar entre 150 a 400 gramas (Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações, 2011).

1.4 - Denominação de Origem

Entende-se por Denominação de Origem (DO) o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício originário dessa região, local ou país, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os factores naturais e humanos, e cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada. A Denominação de Origem Protegida (DOP) é similar à Denominação de Origem, no entanto, enquanto a Denominação de Origem protege os produtos a nível nacional, os produtos DOP estão protegidos pela legislação da União Europeia. O uso da DOP confere aos seus detentores um direito específico de propriedade industrial, sobrepondo-se e eliminando qualquer marca que utilize ou evoque a mesma designação (Regulamento (CE) nº510/2006).

1.4.1 - Critérios definidos pelo Despacho n.º 4184/2011

Para que o Requeijão da Beira Baixa possa ser reconhecido como Denominação de Origem (DO) tem de respeitar os critérios estabelecidos pelo Despacho n.º 4184/2011 publicado em

Diário da República, 2ª Série, nº45 de 4 de Março de 2011. De acordo com este despacho o Requeijão da Beira Baixa DO tem de cumprir as características apresentadas na Tabela 2:

Tabela 2 - Critérios estabelecidos pelo Despacho n.º 4184/2011 para o Requeijão da Beira Baixa DO.

Parâmetros	Limites
Humidade	60 a 70%
Gordura Total	14g a 19g/100g de produto
Proteína Total	10g a 13g/100g de produto
Cinzas	1,4 a 1,8g/100g de produto

1.5 - Objectivo

O objectivo deste trabalho foi a optimização dos parâmetros físico-químicos do Requeijão da Beira Baixa, produzido a partir do soro resultante da produção dos queijos da Beira Baixa, para que este cumpra os valores permitidos pelo Despacho n.º 4184/2011 e possa ser reconhecido como Denominação de Origem (DO).

1.6 - Parâmetros físico-químicos

1.6.1 - Humidade

A humidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em humidade de superfície e humidade adsorvida. A humidade de superfície refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento e que é facilmente evaporada. A humidade absorvida refere-se à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem se combinar quimicamente com o mesmo. A percentagem de humidade é determinada através da perda de peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida (Zenebon *et. al*, 2008).

1.6.2- Matéria gorda

Os lípidos são compostos orgânicos altamente energéticos, insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos.

A técnica utilizada para a determinação da percentagem de matéria gorda foi a técnica de Van Gulik (NP 2105:1983). Esta técnica aplica-se a todos os tipos de queijo e consiste na separação e quantificação da matéria gorda com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido sulfúrico desnatura as proteínas que se encontram ligadas à matéria gorda e o álcool isoamílico favorece a separação da matéria gorda (NP 2105:1983).

1.6.3 - Proteína total

A determinação da proteína total baseia-se na determinação do azoto, pelo processo de digestão Kjeldahl. Este método baseia-se em três etapas: digestão, destilação e titulação. Na

digestão, a matéria orgânica existente na amostra é decomposta com ácido sulfúrico e catalisadores (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e o azoto orgânico é transformado em azoto amoniacal. Na destilação, a adição de hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio provoca a libertação de amoníaco, sendo este destilado e recebido num excesso de solução de ácido bórico como indicador. Finalmente, na titulação, determina-se a quantidade de azoto presente na amostra titulando-se o excesso do ácido utilizado na destilação com ácido sulfúrico. Como o conteúdo em azoto das diferentes proteínas é aproximadamente 16% introduz-se o factor de conversão 6,25 para transformar o número de gramas de azoto encontrado no número de gramas de proteína. Consoante o tipo de alimento o factor de conversão varia. No caso dos produtos lácteos o factor de conversão utilizado é 6,38 (Zenebon *et al.*, 2008).

1.6.4 - Cinzas

As cinzas ou o resíduo seco por incineração é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto após a queima da matéria orgânica, que é transformada em dióxido de carbono, água e óxido nítrico. A cinza é constituída principalmente por potássio, sódio, cálcio e magnésio. Em pequenas quantidades pode conter alumínio, ferro, cobre, manganês e zinco. A cinza obtida não é necessariamente da mesma composição que a matéria mineral presente no alimento, pois pode haver perda por volatilização ou interacção entre os constituintes da amostra. Os produtos lácteos têm uma alta concentração de cálcio e fósforo e baixa concentração de ferro e sódio (Cecchi, 2001).

1.6.5 - pH

O pH indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um produto. Na determinação do pH do requeijão utilizou-se um potenciómetro, o que permitiu uma determinação directa, simples e precisa do pH (Zenebon *et al.*, 2008).

1.6.7 - Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima presente naturalmente no leite. A verificação da actividade enzimática é útil na avaliação do tratamento térmico que o requeijão sofreu. No leite pasteurizado a actividade da fosfatase alcalina não deve ser detectada, pois a enzima fica inactiva com a temperatura de pasteurização. No processo de fabrico do requeijão, este é sujeito a uma temperatura (80-90°C/1h) superior à da pasteurização do leite (61,7°C/30 minutos e 71,1°C/15 segundos), logo a actividade da enzima não deve ser detectada (Zenebon *et al.*, 2008).

1.6.8 - Composição do soro e rescaldão

A matéria gorda é um dos componentes mais importantes do leite, afectando directamente o rendimento económico, o sabor, o aroma, a textura e a consistência do

requeijão. A percentagem de matéria gorda no soro e no rescaldão permite avaliar a retenção de matéria gorda no requeijão. A percentagem de matéria gorda que fica retida no soro está directamente associada ao processo de coagulação (tipo de coagulante utilizado, diluição do coagulante, temperatura de coagulação), à espécie de leite usada e ao tipo de queijo fabricado (Rodrigues, 2005).

Na Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa, o processo de fabrico de queijos é industrial, logo está concebido para que quase toda a percentagem de matéria gorda contida no leite passe para o queijo. O tipo de coagulante usado no queijo de ovelha é o cardo (*Cynara cardunculus*), que permite uma melhor retenção dos constituintes do leite no queijo quando comparado com um coalho de origem animal. Desta forma, a percentagem de matéria gorda que fica retida no soro é muito baixa.

1.7 - Controlo microbiológico

Durante o processo de fabrico, os alimentos sofrem manipulação, transporte e contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos e embalagens) que podem estar contaminadas com microrganismos. O elevado número de microrganismos que se pode transmitir aos alimentos pode ter graves consequências, quer em termos de saúde pública, quer em termos de deterioração dos alimentos. Desta forma, o controlo microbiológico dos alimentos assume um papel determinante na área alimentar, constituindo um dos melhores meios para testar numa unidade industrial, a eficácia das operações de lavagem, os processos de desinfeção e a higiene pessoal dos operários (Casal *et al.*, 2004)

Os meios de cultura utilizados neste trabalho para contagem de microrganismos foram os meios selectivos. Os meios selectivos são formulados para suprimir o crescimento dos microrganismos que não interessam, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar (Ferreira e Sousa, 2000).

1.7.1 - *Staphylococcus coagulase positiva*

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae*. O nome tem origem grega e significa cocos em cacho, morfologia característica destes microrganismos. Os *Staphylococcus* são bactérias Gram positivas, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. Agrupam-se normalmente em cacho, embora se possam observar de formas diversas, como cocos isolados, aos pares, em cadeias curtas ou em cachos. São anaeróbios facultativos. Produzem catalase e ácidos por degradação da glicose, em aerobiose e em anaerobiose. São capazes de crescer em meios com elevado teor de NaCl e a temperaturas compreendidas entre 18°C a 40°C (Prescott *et al.*, 2002). Das várias enzimas produzidas por *Staphylococcus*, uma assume particular importância, a coagulase. De entre as espécies patogénicas para o Homem, só uma, a *S. aureus*, a produz. Todas as restantes são designadas por coagulase-negativa ou não produtoras de coagulase (Ferreira e Sousa, 2000).

A principal fonte de contaminação por *Staphylococcus* é a cavidade nasal, mas também pode ser encontrado na pele, mãos e feridas infectadas. Desta forma, o facto de um alimento ser manipulado na ausência de condições de assepsia, já indica uma possível contaminação pelo microrganismo. Os animais também podem ser fontes de *Staphylococcus*, pois algumas espécies como a bovina, ovina e caprina podem ser associadas a casos de mamites (inflamação da glândula mamária) (Sant'Ana *et al.*, 2005).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das mais frequentes intoxicações alimentares de origem microbiana. Os sintomas têm um início rápido (2 a 6 horas) provocando cólicas abdominais, náuseas e vômitos. A maior parte destas bactérias produzem toxinas e o perigo para a saúde pública está relacionado com a ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada (Bendahou *et al.*, 2008).

1.7.2 - Coliformes totais / *Escherichia coli*

Os Coliformes são um grupo de bactérias do qual fazem parte os géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Aeromonas* e *Serratia*. Todas as bactérias coliformes são Gram negativas, não formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, produzem gás a partir de lactose e são destruídas por pasteurização (Prescott *et al.*, 2002). A sua presença em alimentos é uma indicação de contaminação fecal directa (processamento de matérias primas de origem animal, higiene pessoal dos operadores inadequada) ou indirecta (água, esgotos). Os Coliformes fecais toleram temperaturas acima dos 40°C e reproduzem-se nessa temperatura em menos de 24 horas. Este grupo está associado às fezes de animais de sangue quente (Ferreira e Sousa, 2000).

A *Escherichia coli* pertence à família das *Enterobacteriaceae*, constituída por bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Possui múltiplos flagelos em volta da célula, fermenta a glicose, é oxidase negativa e catalase positiva (Prescott *et al.*, 2002).

A presença de *Escherichia coli* é um problema importante de saúde pública. Nos seres humanos é a principal causa de infecções alimentares entre turistas e viajantes, sendo transmitida principalmente por alimentos, pessoa-a-pessoa e águas contaminadas (Chauret, 2011).

1.7.3 - Microrganismos totais

Entende-se por microrganismo, as bactérias, bolores e leveduras que se desenvolvem em meio de cultura, formando colónias. A determinação de Microrganismos totais a 37°C fornece informação genérica sobre a qualidade dos produtos (Merck, 2000).

1.7.4 - *Pseudomonas spp.*

As *Pseudomonas* são bactérias em forma de bastonete direito ou ligeiramente curvo, Gram negativas, aeróbias, não formadoras de esporos e com flagelos polares simples ou múltiplos (Prescott *et al.*, 2002). O grupo das *Pseudomonas* inclui as espécies pigmentadas e não

pigmentadas. As espécies pigmentadas são chamadas de *Pseudomonas* fluorescentes, pois produzem um pigmento que é fluorescente sob radiação ultravioleta. Entre estas salienta-se a *Pseudomonas aeruginosa* que produz piocianina (um pigmento fluorescente azul) e cresce até 42°C (Ferreira e Sousa, 2000). As *Pseudomonas* também podem produzir um pigmento fluorescente verde chamando pioverdina, que funciona como um transportador de ferro celular (Philson e Llinás, 1982).

Outras espécies muito comuns no solo e na água são a *Pseudomonas putida*, a *Pseudomonas fluorescens* e a *Pseudomonas syringa*. A espécie *Pseudomonas fluorescens* encontra-se envolvida na alteração da cor, sabor e aroma de alimentos refrigerados (leite, carne, ovos, marisco) porque cresce a 4°C. As *Pseudomonas* não fluorescentes incluem as espécies *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Ferreira e Sousa, 2000).

1.7.5- *Salmonella* spp.

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram negativa, em forma de bacilos não esporulados, aeróbia ou anaeróbia facultativa e móvel com flagelos peritricos. Não fermenta a lactose e produz sulfureto de hidrogénio (Prescott *et al.*, 2002).

A *Salmonella* é a principal bactéria patogénica em seres humanos e a principal causa de gastroenterite aguda em vários países. A salmonelose é um problema mundial de saúde pública devido ao aumento do número de estirpes de resistência microbiana (Addis *et al.*, 2011).

As principais espécies do género *Salmonella* são a *Salmonella typhi*, a *Salmonella enteritidis*, a *Salmonella choleraesuis* e a *Salmonella paratyphi A*. Na maioria dos casos, a salmonelose é adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados. As aves e os animais contaminados constituem o principal reservatório de *Salmonella* não *typhi* e transmitem a doença ao Homem. O reservatório de *S. typhi* é o Homem, que é o principal disseminador da febre tifóide (Ferreira e Sousa, 2000).

1.7.6 - *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, móvel à temperatura ambiente e hemolítico (Prescott *et al.*, 2002).

A maioria das infecções no Homem causadas por *Listeria monocytogenes* está associada ao contacto com animais infectados, ingestão de leite, carne mal cozinhada ou vegetais contaminados, especialmente quando estes produtos são congelados, o que permite a multiplicação deste microrganismo, uma vez que a bactéria cresce a 4°C (Ferreira e Sousa, 2000). O queijo é considerado um dos alimentos mais frequentemente contaminados com *Listeria monocytogenes* devido às condições favoráveis de crescimento do microrganismo durante a produção e maturação do queijo e devido à natureza psicrófila e halotolerante da *Listeria monocytogenes* (Guenther e Loessner, 2011).

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 - Materiais e reagentes

Os reagentes, equipamentos e meios de cultura utilizados durante este trabalho estão mencionados na tabela 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3 - Reagentes utilizados.

Reagentes	Pureza (%)	Fornecedor
Ácido Sulfúrico	65	Sigma-Aldrich
Álcool Isoamílico	98,5	Panreac
Sulfato de Potássio	99,5	JMGS
Sulfato de Cobre	99,5	Panreac
Hidróxido de Sódio	97	Technical
Tiosulfato de Sódio	99,5	Riedel de Haen
Ácido Bórico	99,8	JMGS

Tabela 4 - Equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Balança analítica	AND	FR-200
Centrifuga	Gerber	K100
Banho termostatzado	Selecta P	Precistern
Potenciómetro	Hanna	HI 9124
Milkoscan	Foss	S50
Autoclave	Tuttnauer	3850M
Estufa	Selecta P	-
Estufa 37°C	Binder	3.1
Estufa 25°C	Selecta P	Digitronic
Mufla	Selecta P	Select-Horn
Digestor	Buchi	435
Destilador	Buchi	323
Titulador Automático	Metrohm	725 Dosimat

Tabela 5 - Meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Fornecedor	Microrganismo
Maximum Recovery Diluent	Merck	-
Baird Parker Agar + RPF	Merck	Staphylococcus coagulase positiva
Plate Count Agar	Merck	Microrganismos totais
CFC Agar	Biokar	<i>Pseudomonas spp.</i>
Compass Ecc Agar	Biokar	Coliformes/ <i>Escherichia coli</i>
Água peptonada tamponada	Merck	
Selenito-Cistina	Merck	
Rappaport	Merck	<i>Salmonella spp.</i>
Salmonella Chromogenic Agar	OXOID	
Salmonella Shigella Agar	Merck	
Fraser		
Listeria Selective Agar (Oxford formulation)	Merck OXOID	<i>Listeria monocytogenes</i>

2.2 - Análises físico-químicas

2.2.1 - Determinação da humidade

A humidade foi determinada de acordo com a norma EN ISO 5534:2004. Pesaram-se 20,0 g de areia do mar tratada para uma cápsula e esta foi seca em estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas. A cápsula foi arrefecida em exsiccador, pesaram-se 3,0 g de requeijão e este foi envolvido com a areia, de forma a aumentar a porosidade da amostra e melhorar as condições de evaporação. A cápsula foi colocada na estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Após arrefecimento em exsiccador foi novamente pesada (figura 4). A humidade é expressa em percentagem (m/m) e foi realizada em duplicado.



Figura 4 - Determinação da humidade. Cápsula com areia e requeijão, após secagem na estufa a 100°C durante 4h.

2.2.2 - Determinação da matéria gorda

A matéria gorda foi determinada de acordo com a NP 2105:1983. Pesou-se 3,0 g de requeijão para o butirómetro (figura 5A) e adicionou-se cerca de 2/3 de ácido sulfúrico (65%), até tapar completamente a amostra. Introduziu-se a respectiva rolha e colocou-se o butirómetro em banho-maria a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas, até dissolução total das proteínas. Retirou-se o butirómetro do banho e após cuidadosa agitação, adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico (98,5%), agitando novamente. Deitou-se de seguida ácido sulfúrico até que o nível atinja o traço da escala de referência 35%. Introduziu-se a rolha e inverteu-se várias vezes o butirómetro. Centrifugou-se durante 10 minutos a $350 \pm 50\text{ G}$ (figura 5B). A leitura da matéria gorda é feita directamente na escala graduada do butirómetro e é expressa em percentagem (m/m). A determinação da matéria gorda foi realizada em duplicado.

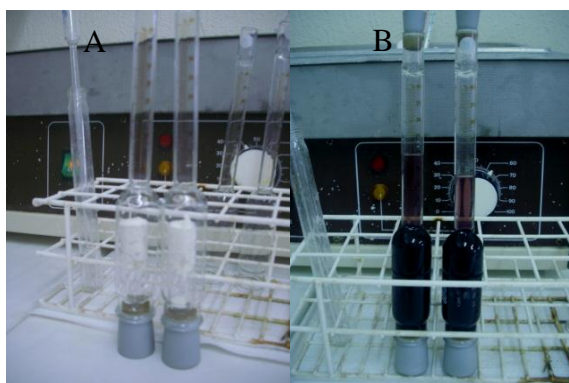


Figura 5 - Determinação da matéria gorda (A) Butirómetro com requeijão. (B) Butirómetro após centrifugação.

2.2.3 - Determinação da Proteína total

A determinação da proteína foi realizada de acordo com o método oficial da AOAC nº 920.123. Pesou-se 0,200 g de requeijão para cada tubo. De seguida, adicionaram-se reguladores de ebulição e 50,0 mL do reagente de ataque (ácido sulfúrico, sulfato de potássio e sulfato de cobre) a cada tubo (figura 6A). Como controlo adicionou-se num tubo 50,0 mL de água destilada. Colocou-se o suporte com os tubos no digestor e regulou-se a 350°C durante 4 horas (figura 6B). A amostra foi conservada em ebulição até à formação de fumos brancos intensos e quando estes desaparecem a mistura apresenta um verde pálido. Após arrefecimento dos tubos, adicionou-se 50,0 mL de água destilada e 50,0 mL da solução de hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio. Num *erlenmeyer*, adicionou-se 50,0 mL da solução indicadora de ácido bórico e iniciou-se a destilação (figura 6C). Titulou-se a solução contida no *erlenmeyer* com ácido sulfúrico (0,02 N) até à viragem da cor verde para a cor inicial da solução indicadora de ácido bórico (figura 6D).

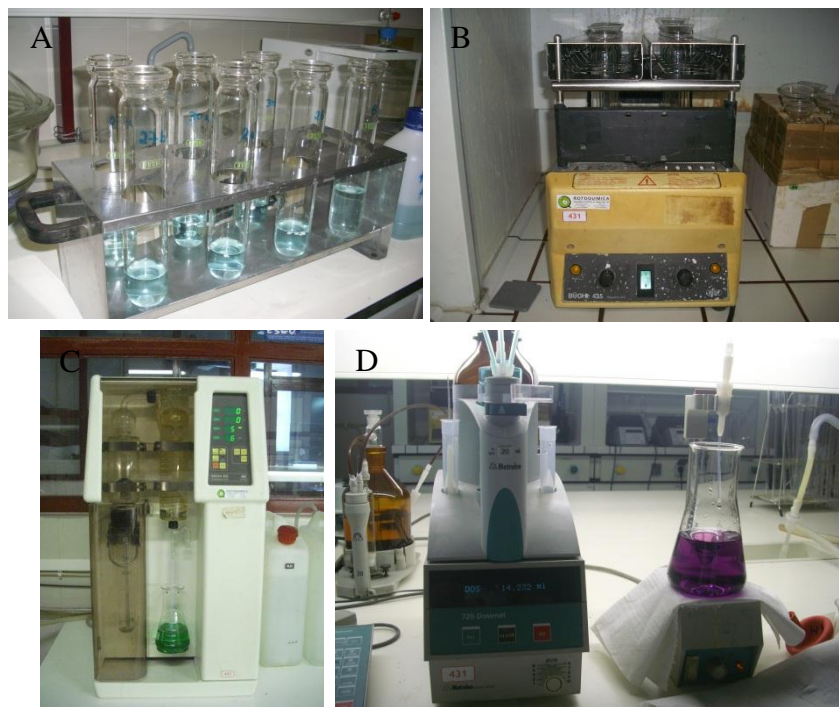


Figura 6 - Determinação da proteína total (A) Tubos com a amostra e o reagente de ataque (B) Digestor (C) Destilador (D) Titulador automático.

2.2.4 - Determinação das cinzas

Para determinar as cinzas procedeu-se de acordo com o método oficial da AOAC nº935.42. As cápsulas de porcelana foram incineradas na mufla a 550°C durante 1 hora, arrefecidas em exsiccador e pesadas. De seguida, pesou-se 5,0 g de requeijão e este foi incinerado na mufla a 550°C durante 24 horas. As cápsulas foram novamente arrefecidas em exsiccador e pesadas.

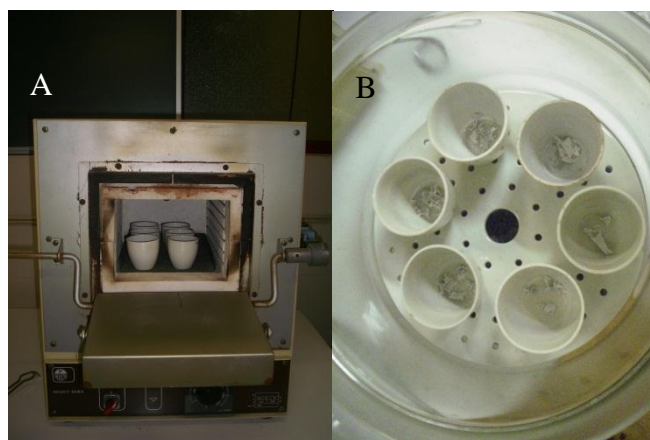


Figura 7 - Determinação das cinzas (A) Mufla (B) Requeijão após incineração a 550°C

2.2.5 - Determinação do pH e temperatura

O método de determinação do pH e da temperatura consistiu em mergulhar os eléctrodos, previamente calibrados, na amostra e aguardar até que as leituras de pH e temperatura estabilizassem (figura 8). Os valores são lidos directamente pelo potenciómetro.



Figura 8 - Determinação do pH e da temperatura através do potenciómetro.

2.2.6 - Determinação da fosfatase alcalina

Na determinação da fosfatase alcalina utilizou-se um Kit comercial Lactognost® da HEYL (figura 9A) e procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se 10,0 mL de água destilada num tubo de ensaio, um comprimido do reagente I e outro do reagente II. Após completa dissolução adicionou-se 1,0 g de requeijão. O tubo de ensaio foi colocado no banho-maria a 37 °C durante 1 hora. Foi adicionada uma dose do reagente III e agitou-se bem. A presença de coloração permite identificar a actividade da enzima, sendo negativo quando fica castanho, debilmente positivo quando fica verde e positivo quando fica azul.



Figura 9 - (A) Kit comercial utilizado na determinação da fosfatase alcalina (B) Dissolução do reagente I e II (tubo 1) e resultado negativo para a fosfatase alcalina (tubo 2).

2.2.7 - Determinação da composição do soro e rescaldão

A percentagem de matéria gorda e proteína total presentes no soro e no rescaldão foram determinados por espectrofotometria de infravermelho através do aparelho Milkoscan Foss S50. Colocou-se um frasco com soro ou rescaldão e a percentagem de matéria gorda e de proteína total foi lida directamente pelo aparelho (figura 10). Este método é rápido, económico e permite simultaneamente a determinação da percentagem de matéria gorda, proteína total e extracto seco isento de matéria gorda, numa só amostra de pequeno volume e sem qualquer tratamento prévio. Os resultados são expressos em percentagem (m/m).



Figura 10 - Determinação da composição do soro através do Milkoscan.

2.3 - Controlo microbiológico

2.3.1 - Diluições

Os métodos usados para a contagem de microrganismos presentes em alimentos sólidos exigem o tratamento prévio da amostra de forma a transferir para uma fase líquida, os microrganismos presentes no seu interior ou aderentes à sua superfície. O meio de diluição utilizado foi uma solução de triptona-sal (MRD). O MRD está em conformidade com as recomendações da ISO 6887. Este diluente pode ser usado como uma alternativa à solução de Ringer e é específico para leite e produtos lácteos. É composto por cloreto de sódio e peptona que asseguram a recuperação dos microrganismos.

Para cada amostra de requeijão foi preparada uma suspensão-mãe, com 10,0 g de requeijão em 90 mL de MRD. A partir da suspensão-mãe foi preparada uma diluição decimal em MRD.

2.3.2 - Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* seguiu-se a norma NP 4400-1:2002. Segundo esta norma, entende-se por *Staphylococcus coagulase positiva* as bactérias que

formam colónias características na superfície de um meio de cultura selectivo e que apresentem uma reacção de coagulase fortemente positiva.

O meio de cultura utilizado foi o Baird-Parker RPF Agar (BPA), que é constituído por triptona, extracto de carne, extracto de levedura, piruvato de sódio, glicina, cloreto de lítio e ágar bacteriológico. A este meio é adicionado o suplemento RPF (fibrinogénio plasmático de coelho), cuja função é servir de substrato à coagulase presente nos *Staphylococcus* coagulase positiva. O suplemento RPF é constituído por plasma de coelho, fibrinogénio de bovino, inibidor da tripsina e telurito de potássio. O cloreto de lítio e o telurito de potássio inibem o crescimento da flora microbiana enquanto o piruvato e a glicina estimulam o crescimento de *Staphylococcus*. O plasma de coelho é adicionado devido à especificidade dos *Staphylococcus* produzirem coagulase. O plasma de coelho é reforçado com fibrinogénio de bovino, o que provoca o aparecimento de halos de fibrina à volta das colónias. As colónias ficam de cor negra devido à redução do telurito de potássio para telureto. A presença de telurito também inibe o crescimento de outras bactérias Gram positivas. As colónias de *Staphylococcus* coagulase positiva são pretas ou cinzentas rodeadas por um halo opaco de fibrina. (figura 11).



Figura 11 - Colónias características de *Staphylococcus* coagulase positiva no meio BPA.

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 0,1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

2.3.3 - Contagem de Coliformes totais / *Escherichia coli*

Para a contagem de Coliformes totais e *Escherichia coli* procedeu-se de acordo com a norma ISO 16649-2:2001.

O meio utilizado foi o Compass Ecc Agar, que é um meio selectivo e cromogénico que permite simultaneamente a contagem de *Escherichia coli* e de Coliformes em produtos alimentares. Os Coliformes têm a capacidade de fermentar a lactose produzindo ácido láctico e dióxido de carbono. A fermentação da lactose envolve duas enzimas, uma permease e a β -

galactosidase. A presença da β -galactosidase é usada como critério de classificação para Coliformes. Verificou-se também a presença de outra enzima, a β -D-glucuronidase em *Escherichia coli*. Assim, a presença da β -galactosidase permite a identificação de Coliformes e a presença da β -galactosidase e da β -D-glucuronidase permite a detecção específica de *Escherichia coli*. A utilização de um substrato cromogénico permite a detecção da actividade da enzima através de uma reacção colorida. Os Coliformes produzem colónias cor-de-rosa e a *Escherichia coli* produz colónias azuis que podem ser rodeadas por um halo cor-de-rosa (figura 12).



Figura 12 - Colónias características de *Escherichia coli* (azuis) e Coliformes (cor-de-rosa), no meio Compass Ecc Agar.

Após feitas as diluições, transferiu-se por incorporação 1 mL de cada diluição e as placas de Petri foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

2.3.4 - Contagem de Microrganismos totais

Para a contagem de Microrganismos totais procedeu-se de acordo com a norma NP 4405:2002, onde o número total de microrganismos é obtido por contagem de colónias num meio de cultura sólido, após incubação a 30-37°C em aerobiose.

O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA), constituído por triptona, extracto de levedura, glucose e ágar-ágar. Este meio não contém inibidores e é principalmente usado para determinar o número total de bactérias no leite, produtos lácteos, água e outros materiais.

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 0,1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 48 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características (figura 13) para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

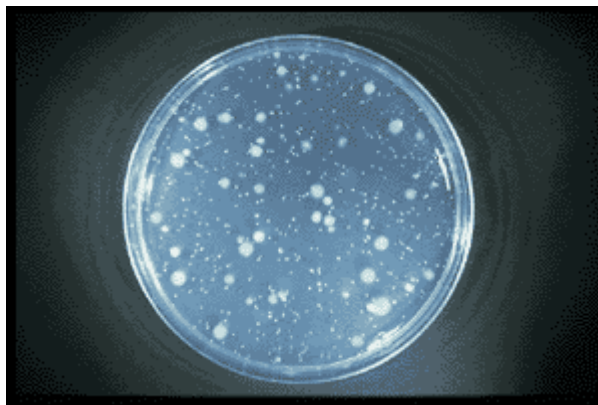


Figura 13 - Microrganismos totais no meio PCA.

2.3.5 - Contagem de *Pseudomonas spp.*

Para a contagem de *Pseudomonas spp.* utilizou-se a norma ISO 13720:1995. O meio de cultura utilizado foi o CFC Agar. Este meio é usado para o isolamento e contagem de *Pseudomonas* pigmentadas e não pigmentadas em alimentos. O CFC agar tem na sua composição gelatina digerida pelo suco pancreático, triptona, sulfato de potássio, cloreto de magnésio e ágar bacteriológico. A gelatina digerida pelo suco pancreático e a triptona são os nutrientes necessários para o crescimento de *Pseudomonas*. O cloreto de magnésio e o sulfato de potássio estimulam a produção de piocianina. Ao meio CFC agar é adicionado um suplemento CFC (cefalosporina, fucidine e cetrimida) sob a forma de um pó liofilizado, que inibe o crescimento de bactérias e leveduras contaminantes, favorecendo o crescimento de *Pseudomonas spp.* As colónias características são amarelo esverdeadas, ficando por vezes fluorescentes (figura 14).



Figura 14- Colónias características de *Pseudomonas spp.* no meio CFC Agar.

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 0,1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 25 °C durante 48 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

2.3.6 - Pesquisa de *Salmonella spp.*

Para a pesquisa de *Salmonella spp.* procedeu-se de acordo com a norma ISO 6579:2002. Foram dissolvidas 25,0 g de cada amostra de requeijão em 225,0 mL de água peptonada tamponada (caldo de pré-enriquecimento) (figura 15 A) e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação, transferiu-se 1,0 mL do caldo de pré-enriquecimento para tubos contendo 9,0 mL do caldo de enriquecimento Selenito-Cistina e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Transferiu-se também 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento para tubos contendo 9,0 mL do caldo de enriquecimento Rappaport e incubou-se a 42°C durante 24 horas (figura 15B). Após as 24 horas de incubação, realizaram-se sementeiras em placas de Petri contendo o meio Salmonella Chromogenic Agar e o meio Salmonella Shigella Agar (SS Agar) (figura 15C).

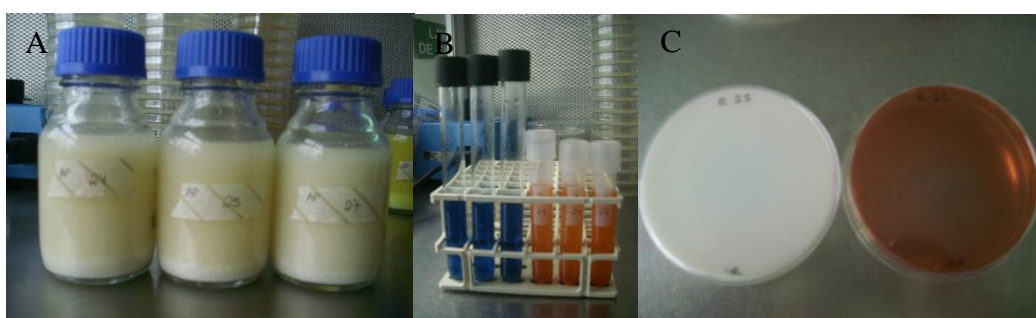


Figura 15 - (A) Caldo de pré-enriquecimento. (B) Caldos de enriquecimento Rappaport e Selenito-Cistina, respectivamente. (C) Placas de Petri contendo o meio Salmonella Chromogenic Agar e o meio Salmonella Shigella Agar, respectivamente.

A água peptonada tamponada é um diluente destinado à preparação de suspensões de leite, produtos lácteos e outros produtos alimentares. A água peptonada tamponada foi utilizada como um pré-enriquecimento para a pesquisa de *Salmonella spp.* antes do enriquecimento selectivo e das fases de isolamento. O pré-enriquecimento de *Salmonella spp.* tem como objectivo a reanimação de microrganismos que sofreram danos durante a produção do requeijão, como por exemplo a exposição a temperaturas entre os 80°C a 90°C.

O caldo de enriquecimento Selenito-Cistina inibe o crescimento de bactérias coliformes e *Enterococos* sem inibir o crescimento da *Salmonella spp.* O caldo de enriquecimento Rappaport inibe o crescimento de outros microrganismos sem afectar o crescimento da maioria das *Salmonellas spp.*

O Salmonella Chromogenic Agar é um meio selectivo e diferencial que foi concebido para identificar espécies de *Salmonella spp.* com base na utilização de um substrato cromogénico. A incapacidade da *Salmonella spp.* para utilizar outro substrato cromogénico, que a maioria dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* pode utilizar, permite a sua identificação. Neste meio as colónias de *Salmonella spp.* apresentam uma coloração púrpura/rosa (figura 16).

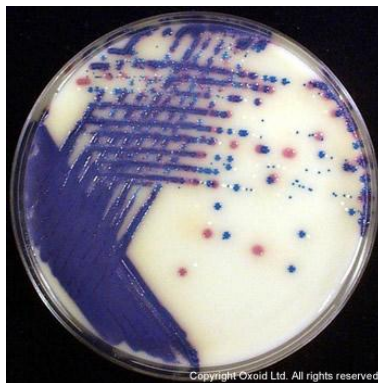


Figura 16 - Colónias características de *Salmonella* spp. no meio Salmonella Chromogenic Agar.

O meio SS Agar tem na sua constituição o corante verde brilhante e uma elevada concentração de tiosulfato e citrato que inibem o crescimento da flora microbiana. A produção de sulfureto é detectada através dos iões tiosulfato e ferro, ficando as colónias de cor negra. As colónias de *Salmonella* lactose negativa são incolores, as colónias lactose positiva apresentam uma coloração cor-de-rosa a vermelho e as colónias que produzem sulfureto de hidrogénio têm um centro negro (figura 17).

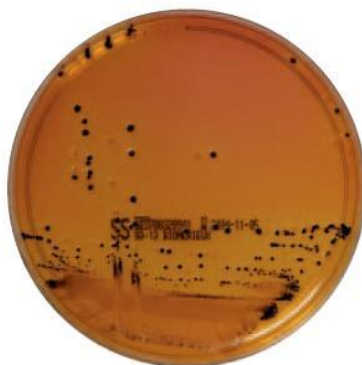


Figura 17 - Colónias características de *Salmonella* spp. no meio SS Agar.

As colónias que apresentaram coloração púrpura/rosa no Salmonella Chromogenic Agar e/ou colónias com ou sem centro negro no SS Agar, foram submetidas a um teste sorológico de forma a confirmar se eram *Salmonella* spp. ou não. O *Confirm Salmonella* (Biokar Diagnostics) é um teste de aglutinação em látex para confirmar as colónias suspeitas de *Salmonella* spp. É também usado como um teste rápido para pesquisa de *Salmonella* spp. sem necessitar de etapas de purificação. As partículas de látex são revestidas com anti-soros contra uma ampla gama de antígenos de *Salmonella* spp. Quando se misturam os anti-soros com uma suspensão de organismos de *Salmonella* spp. verifica-se rapidamente a agregação das partículas, sendo esta reacção visível a olho nu (figura 18).



Figura 18- Teste rápido para confirmação de colónias de *Salmonella spp.*; 1 - Controlo negativo; 2 - Controlo positivo, onde se verifica aglutinação das partículas; 3,4,5 e 6 - Resultado negativo para colónias características de *Salmonella spp.*

2.3.7 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi feita de acordo com a norma ISO 11290-1:2004. Foram dissolvidas 25,0 g de cada amostra de requeijão em 225,0 mL do caldo de enriquecimento primário selectivo semi-Fraser (figura 19A), ao qual se adicionou 0,250 mL de um suplemento selectivo e 0,250 mL de um suplemento de citrato de amónio férrico (III). O caldo de enriquecimento primário foi incubado a 37°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação, transferiu-se 0,1 mL do caldo anterior para tubos contendo 9 mL do caldo de enriquecimento secundário Fraser e incubou-se a 37°C durante 24 horas (figura 19B). Após o tempo de incubação realizaram-se sementeiras em placas de Petri contendo o meio *Listeria* Selective Agar Base (Oxford formulation) (figura 19C).



Figura 19 - (A) Caldo de enriquecimento primário semi-Fraser **(B)** Caldo de enriquecimento secundário Fraser **(C)** Placa de petri contendo o meio *Listeria* Selective Agar.

O caldo de enriquecimento selectivo Fraser permite condições óptimas de crescimento para a *Listeria*, devido ao elevado teor de nutrientes. Este caldo tem na sua constituição peptona de caseína, extracto de levedura, cloreto de sódio, cloreto de lítio e esculina. A este caldo são adicionados dois suplementos, um suplemento selectivo constituído por acriflavina e ácido

nalidíxico e um suplemento de citrato de amónio férrico (III). O crescimento de outras bactérias é inibido pelo cloreto de lítio, pelo ácido nalidíxico e pela acriflavina. A detecção da actividade da β -D-glucosidase da *Listeria* é possível através da presença de esculina e de citrato de amónio e ferro. A esculina é clivada pela β -D-glucosidase a esculetina que forma um complexo negro com os iões de ferro verificando-se um escurecimento do caldo durante o crescimento. O caldo de enriquecimento semi-Fraser tem metade da concentração de ácido nalidíxico e de acriflavina do caldo de enriquecimento Fraser.

O meio de cultura utilizado foi o *Listeria* Selective Agar Base (Oxford formulation). Este meio é constituído por agar, esculina, citrato de amónio férrico, cloreto de lítio, acriflavina, sulfato de colistina e fosfomicina. O cloreto de lítio, a acriflavina, o sulfato de colistina e a fosfomicina inibem o crescimento de bactérias Gram negativas e a maioria dos organismos Gram positivos. A *Listeria monocytogenes* hidrolisa a esculina a esculetina, que reage com os iões de ferro (III) formando um complexo preto à volta das colónias. As colónias de *Listeria monocytogenes* são cinzentas esverdeadas, pequenas e rodeadas por um halo castanho-escuro a preto (figura 20).



Figura 20 - Colónias características de *Listeria monocytogenes* no meio *Listeria* Selective Agar Base.

2.4 - Ensaio laboratoriais

Os valores obtidos para a percentagem de humidade, matéria gorda, proteína total e cinzas do requeijão produzido na Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa estão fora do intervalo estabelecidos no Despacho n.º 4184/2011. Para que o requeijão cumpra estes critérios e possa ser reconhecido como Requeijão da Beira Baixa DO foram realizados vários ensaios à escala laboratorial onde se adicionaram volumes variados de leite de ovelha ao soro, durante o processo de fabrico do requeijão. A adição de leite de ovelha é permitida pelo Despacho n.º 4184/2011 e na tabela 6 encontram-se as percentagens e o volume de leite de ovelha adicionado.

Tabela 6 - Diferentes percentagens e volumes de leite de ovelha adicionado ao soro nos ensaios laboratoriais.

Leite (%)	Volume de leite adicionado (ml)
7	350
8	400
9	450
10	500

Para os ensaios à escala laboratorial utilizaram-se 5,0 L de soro resultante do fabrico dos Queijos da Beira Baixa, adicionaram-se 15,0 g de sal e diferentes percentagens de leite de ovelha (figura 21A). Seguiram-se as mesmas condições de fabrico usadas à escala industrial, ou seja, o soro foi submetido a um aquecimento entre os 80 a 90 °C e mantido em constante movimento lento até se observar o início da coagulação pelo aparecimento de flocos que se juntam à superfície (figura 21B).



Figura 21 - (A) Soro resultante do fabrico dos queijos da Beira Baixa utilizado nos ensaios laboratoriais. (B) Início da coagulação.

A massa resultante da coagulação foi retirada com uma escumadeira e colocou-se nos cestos de plásticos, para escorrer o rescaldão (figura 22). Após arrefecer, o requeijão foi embrulhado em papel e embalado a vácuo.



Figura 22- Escorrimento do requeijão.

Os ensaios decorreram durante os meses de Fevereiro a Maio de 2012 e foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas ao requeijão com leite adicionado. Como controlo foi usado requeijão, sem qualquer adição de leite.

2.5 - Validação do método

Foi realizado um ensaio à escala industrial com adição de 8% de leite de ovelha, de forma a validar o método. Utilizaram-se 778,0 L de soro, 63,0 L de leite de ovelha e 5,0 Kg de sal. Foi usado como controlo um requeijão fabricado no mesmo dia mas sem adição de leite. Após o fabrico dos requeijões, foram feitas análises físico-químicas, microbiológicas e uma prova sensorial.

2.6 - Análise sensorial

Foi feita uma prova cega a dois requeijões, um sem adição de leite (controlo) e outro com 8% de leite adicionado. Foram cortados às fatias e colocados à disposição de um painel de 14 provadores constituído por técnicos e trabalhadores da Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa. A caracterização do produto foi feita com recurso a uma ficha de prova (anexo 1) construída especificamente para este estudo. Os atributos avaliados foram: aparência/textura (granulosa, dura, mole, semidura); cor (amarela, branca, branco-amarela); sabor (láctico, doce, salgado) e o odor (láctico, agradável, inodoro). Foi pedido aos provadores que identificassem a amostra que mais gostaram. Após a prova sensorial foram recolhidos e analisados os resultados.

Capítulo 3 - Resultados / Discussão

3.1 - Análise dos parâmetros físico-químicos

3.1.1 - Leite e soro

Estudou-se a composição do soro por ser a matéria-prima do fabrico do requeijão. A composição do leite não foi analisada, contudo, os valores de matéria gorda e de proteína total do leite foram facultados pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. Na figura 23 podemos observar o volume mensal de leite utilizado no fabrico dos queijos da Beira Baixa e a percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro, ao longo do tempo.

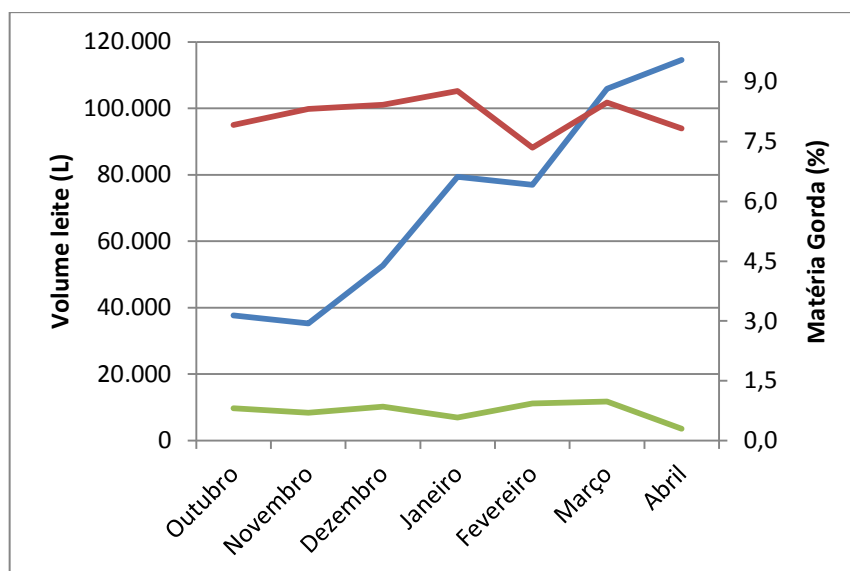


Figura 23 - Volume mensal de leite utilizado e percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro ao longo do tempo. (—) Volume mensal de leite (N=7); (—) % Matéria gorda do leite (N=61); (—) % Matéria gorda do soro (N=61).

À medida que o volume de leite aumenta, a percentagem de matéria gorda do leite e do soro diminuem (figura 23). O período de Fevereiro a Abril coincide com a época alta de produção de leite, em que o leite tende a ter uma menor percentagem de matéria gorda.

Na figura 24 podemos observar a percentagem de matéria gorda do leite e a percentagem de matéria gorda do soro, ao longo dos meses em estudo.

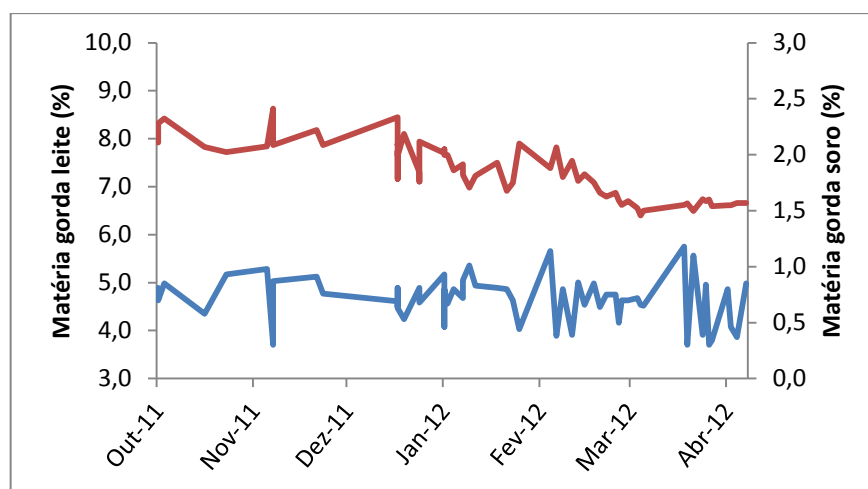


Figura 24 - Percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro, ao longo do tempo. (—) % Matéria gorda do leite (N=61); (—) % Matéria gorda do soro (N=61).

A percentagem de matéria gorda presente no leite e no soro sofre muitas oscilações ao longo do tempo (figura 24). A percentagem de matéria gorda do soro depende da percentagem de matéria gorda do leite e da percentagem de matéria gorda que fica retida no queijo, durante o processo de fabrico. Na tabela 7 estão representados os valores médios obtidos e o respectivo desvio-padrão para a percentagem de matéria gorda do leite e do soro, bem como os valores máximos e mínimos obtidos.

Tabela 7 - Valores obtidos para a percentagem de matéria gorda do leite e do soro.

Matéria gorda (%)	Leite	Soro
$X \pm \delta$	$7,3 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,2$
Mínimo	6,4	0,3
Máximo	8,6	1,2

O valor médio obtido para a percentagem de matéria gorda do leite de ovelha foi de 7,3% e variou de 6,4% a 8,6% (tabela 7). Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma percentagem de matéria gorda de 8,4% para o leite de ovelha, mas são semelhantes aos obtidos por Fox e McSweeney (1998) que obtiveram uma percentagem de matéria gorda de 7,4% para o leite de ovelha.

As variações na percentagem de matéria gorda do leite também foram verificadas no soro, mas ampliadas pelo processo de produção de queijos. Verificou-se um decréscimo da matéria gorda no soro ao longo do tempo, apesar de não ser tão acentuado como no leite (figura 24). O valor médio obtido para a matéria gorda foi de 0,7% e variou de 0,3% a 1,2% (tabela 7). Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma percentagem de matéria gorda de 1,3% para o soro de ovelha. Prekoppova *et*

al. (1990) verificaram que a percentagem de matéria gorda do soro de leite de ovelha variava entre 2,0% e 6,7%. Os valores obtidos neste estudo são inferiores, pois dependem da matéria gorda presente no leite. O tipo de leite também varia, pois pode ser utilizado leite de ovelha ou leite de mistura (ovelha e cabra), consoante o tipo de queijo que vai ser fabricado. Desta forma, a percentagem de matéria gorda do leite utilizado no fabrico dos queijos influencia directamente a percentagem de matéria gorda do soro e conseqüentemente a percentagem de matéria gorda do requeijão.

Na figura 25 podemos observar o volume mensal de leite utilizado no fabrico dos queijos da Beira Baixa e a percentagem de proteína total presente no leite e no soro, ao longo do tempo.

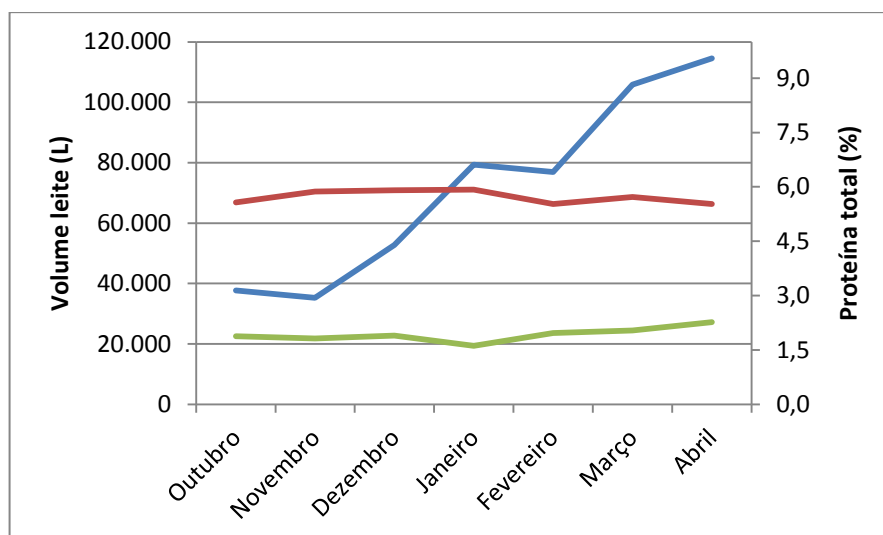


Figura 25 - Volume mensal de leite utilizado e percentagem de proteína total presente no leite e no soro ao longo do tempo. (—) Volume mensal de leite (N=7); (—) % Proteína total do leite (N=61); (—) % Proteína total do soro (N=61).

Verificou-se que com o aumento do volume de leite, a percentagem de proteína total do leite e do soro variou ao longo dos meses em estudo (figura 25), pois apesar de nos meses de Fevereiro a Abril haver uma maior produção de leite, este apresenta uma menor percentagem de proteína total.

Na figura 26 podemos observar a percentagem de proteína total do leite e a percentagem de proteína total do soro, ao longo dos meses em estudo.

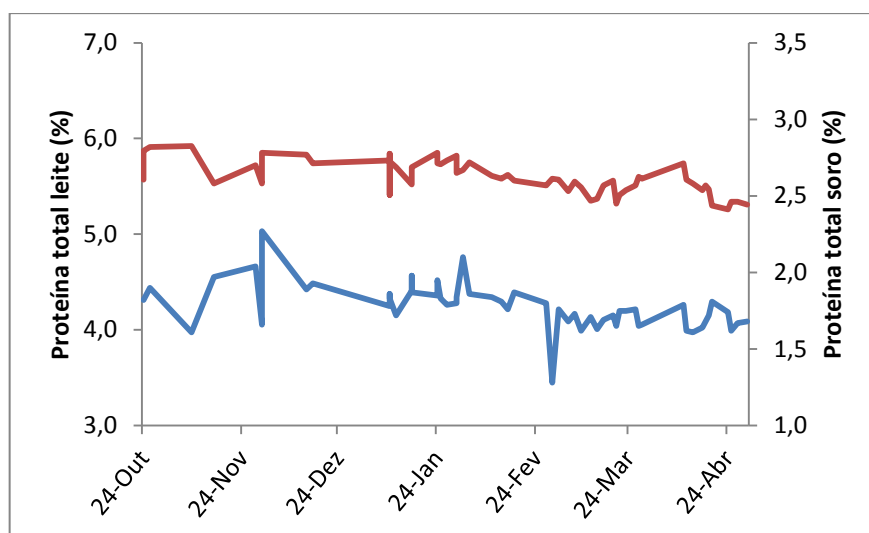


Figura 26 - Percentagem de proteína total presente no leite e no soro, ao longo do tempo. (—) % Proteína total do leite (N=61); (—) % Proteína total do soro (N=61).

Verifica-se uma variação na percentagem de proteína total do leite e do soro ao longo do tempo (figura 26). A percentagem de proteína total do soro apresenta uma maior oscilação ao longo do tempo, pois é influenciada pela percentagem de proteína total do leite e pelo processo de fabrico, ou seja, pela percentagem de retenção de proteína do queijo. Na tabela 8 estão representados os valores médios obtidos e o respectivo desvio-padrão para a percentagem de proteína total do leite e do soro, bem como os valores máximos e mínimos obtidos.

Tabela 8 - Valores obtidos para a percentagem de proteína total do leite e do soro.

Proteína total (%)	Leite	Soro
$\bar{X} \pm \delta$	5,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Mínimo	5,3	1,3
Máximo	5,9	2,3

O valor médio obtido para a proteína total do leite foi de 5,6% e variou de 5,3% a 5,9% (tabela 8). Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma percentagem de proteína total de 6,1% para leite de ovelha, mas são superiores aos referidos por Fox e McSweeney (1998) que obtiveram uma percentagem de 4,5% de proteína total para o leite de ovelha.

Foi verificado um decréscimo da proteína total no soro ao longo do tempo, tal como se verificou no leite, apesar de não ser tão acentuado. O valor médio obtido para a proteína total foi de 1,8% e variou de 1,3% a 2,3% (tabela 8). Os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma percentagem de

proteína total de 1,9% para o soro de ovelha, no entanto são inferiores aos obtidos por Prekoppova *et al.* (1990) em que a percentagem de proteína do soro de leite de ovelha variou de entre 2,9% e 3,7%.

3.1.2 - Requeijão

Na figura 27 podemos observar os valores obtidos para a humidade do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa, sem leite adicionado, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

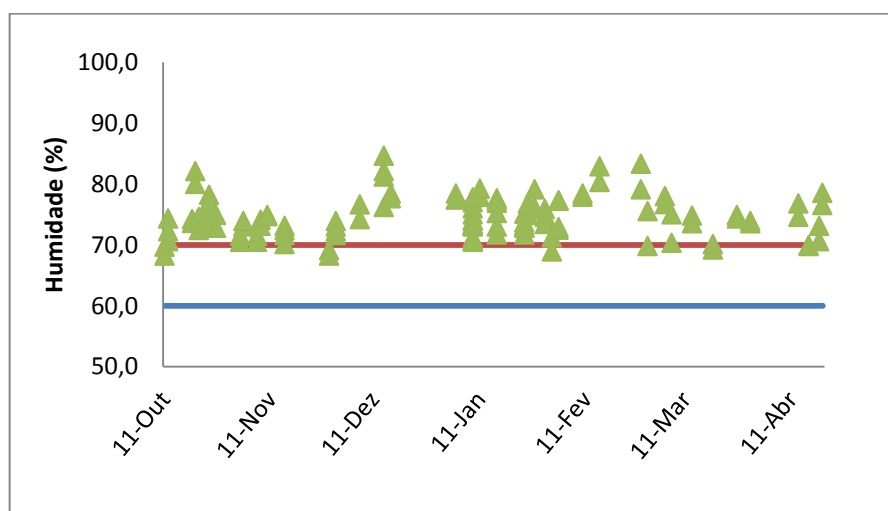


Figura 27 - Variação da percentagem de humidade do requeijão ao longo do tempo. (▲) % humidade requeijão (N=118) (—) Limite superior definido pelo Despacho n.º 4184/2011 (—) Limite inferior definido pelo Despacho n.º 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve apresentar 60 a 70% de humidade. O requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa não cumpre os valores definidos, pois a maioria dos valores de humidade obtidos estão acima do limite superior definido, o que indica que grande parte da constituição do requeijão é água (figura 27). O valor médio obtido foi de $74,5\% \pm 3,4\%$ e variou entre 68,2% e 84,6%. Os valores obtidos são superiores aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma percentagem de humidade que variou de 69,2% a 71,7% em requeijões sem adição de leite, produzidos a 90°C durante 45 minutos, referindo que a temperatura de aquecimento é o principal factor que influencia a percentagem de humidade do requeijão. Os valores obtidos neste trabalho são superiores aos obtidos por Pintado *et al.* (1996) talvez devido à diminuição da temperatura de aquecimento que variou entre 80°C e 90°C permitindo uma maior retenção de água no requeijão. Segundo Pintado e Malcata (1999) a percentagem de água do requeijão é relativamente variável, dependendo da permeabilidade do molde onde é colocado, do período de drenagem e das condições de armazenamento. Vodret (1970) também relatou que

as diferenças na percentagem de humidade do requeijão podem estar relacionadas com a temperatura de precipitação das proteínas.

Na figura 28 podemos observar os valores obtidos para a matéria gorda do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

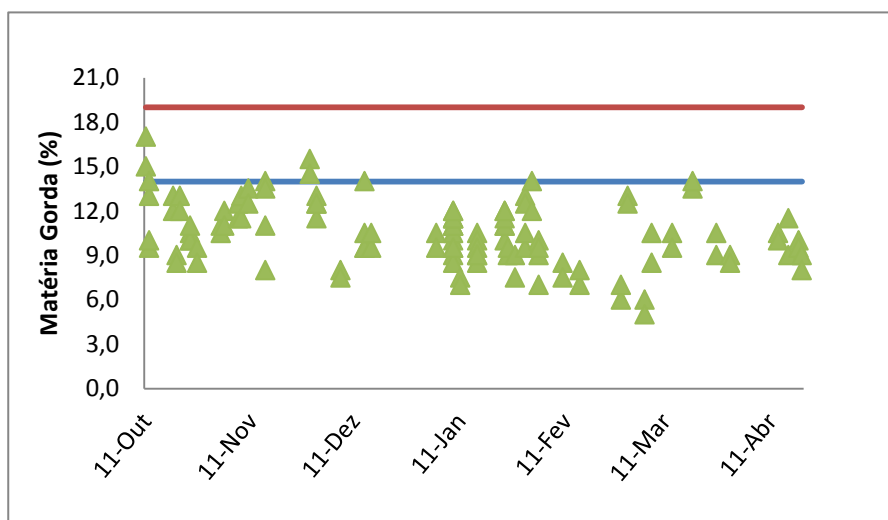


Figura 28 - Variação da percentagem de matéria gorda do requeijão ao longo do tempo. (▲) % matéria gorda requeijão (N=118) (—) Limite superior definido pelo Despacho nº 4184/2011 (—) Limite inferior definido pelo Despacho nº 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve apresentar um teor de matéria gorda de 14g a 19g/100g de produto. O requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijo da Beira Baixa não cumpre os valores definidos, pois a maioria dos valores obtidos para a matéria gorda estão abaixo do limite inferior definido (figura 28). O valor médio obtido foi de $10,5 \pm 2,1$ variando entre 5,0% e 17,0% de matéria gorda. Pintado *et al.* (1996) obtiveram uma percentagem de matéria gorda que variou de 17,8% a 18,5% em requeijões sem adição de leite, produzidos a 90°C durante 45 minutos, referindo que a temperatura e o tempo de aquecimento influenciam a percentagem de matéria gorda do requeijão. Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos obtidos por Pintado *et al.* (1996) devido ao processo de fabrico dos queijos da Beira Baixa, em que a maior parte da matéria gorda do leite fica retida nos queijos.

Na figura 29 podemos observar a variação da percentagem de matéria gorda do requeijão em função da percentagem de matéria gorda do soro.

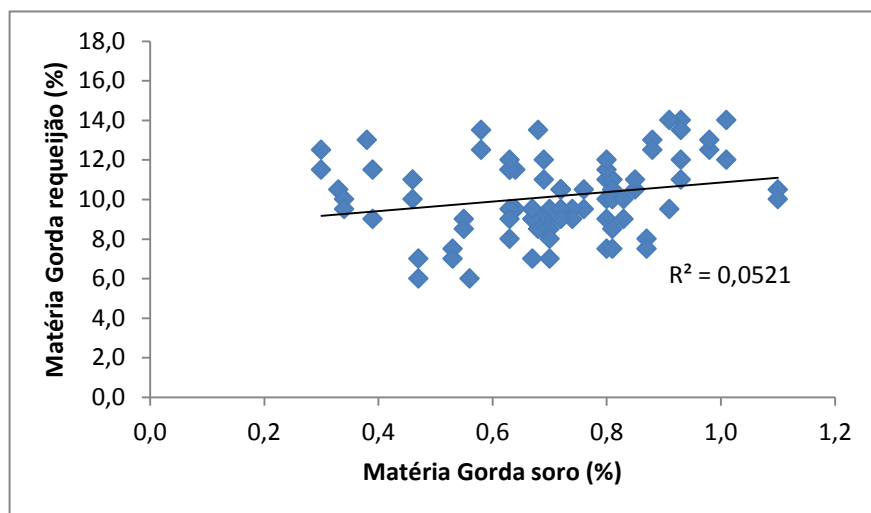


Figura 29 - Percentagem de matéria gorda do requeijão em função da percentagem de matéria gorda do soro. (◆) % Matéria gorda (N=113) (—) Linha de tendência linear.

Era esperado que a percentagem de matéria gorda no requeijão aumentasse com a percentagem de matéria gorda no soro, no entanto, os valores obtidos não são significativos ($p < 0,05$) (figura 29), pois a taxa de recuperação da matéria gorda é diferente todos os dias. As variações na percentagem de matéria gorda no soro também podem ser explicadas pela variação da percentagem de matéria gorda no leite. A percentagem de humidade também influencia a percentagem de matéria gorda do requeijão, pois apesar de, para análise, ser pesada sempre a mesma quantidade de requeijão este pode conter mais ou menos água consoante a percentagem de humidade que possui.

Na figura 30 podemos observar os valores obtidos para a proteína total do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

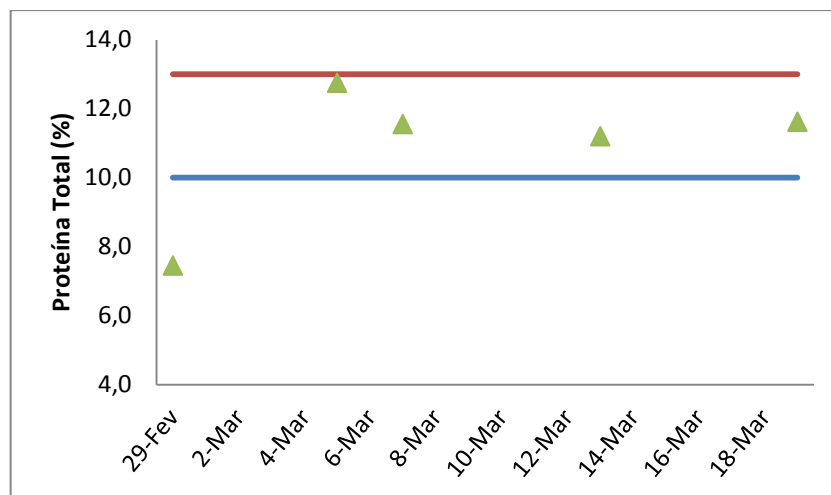


Figura 30 - Variação da percentagem de proteína total do requeijão ao longo do tempo. (▲) % proteína total (N=5), (→) Limite superior definido pelo Despacho nº 4184/2011, (←) Limite inferior definido pelo Despacho nº 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve ter um teor de proteína total de 10 g a 13 g/100 g de produto. Através da figura 30 podemos observar que, a maioria dos valores de proteína total estão dentro dos limites definidos. O valor médio obtido foi de $10,9\% \pm 2,0\%$ variando entre 7,5% e 12,8% de proteína total. Pintado *et al.* (1996) obtiveram uma percentagem de proteína total que variou de 7,4% a 8,2% em requeijões sem adição de leite, produzidos a 90°C durante 45 minutos, referindo que a temperatura de aquecimento afecta especialmente a percentagem de proteína total do requeijão. Os valores obtidos neste trabalho são superiores aos obtidos por Pintado *et al.* (1996) devido a uma maior percentagem de retenção de proteína no requeijão e à menor temperatura de aquecimento utilizada (80-90°C).

Na figura 31 podemos observar a variação da proteína total do requeijão em função da proteína total do soro.

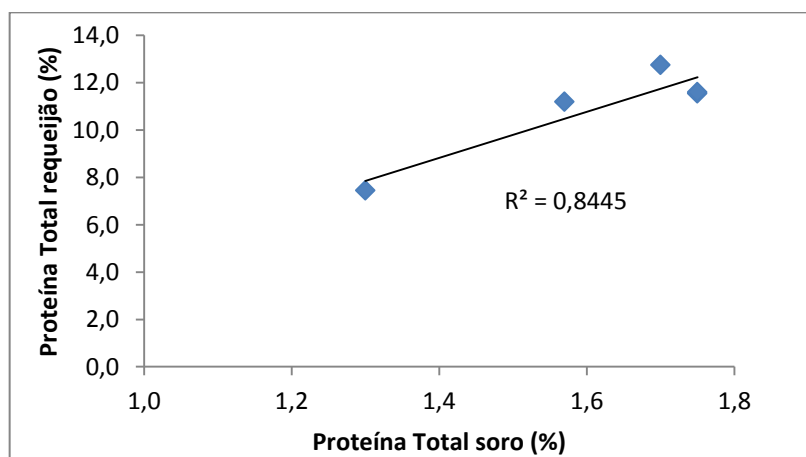


Figura 31 - Percentagem de proteína total do requeijão em função da percentagem de proteína total do soro. (◆) % Proteína total (N=4) (—) Linha de tendência linear.

Era esperado uma relação entre a proteína total do soro e a proteína total do requeijão (figura 31). No entanto, os valores obtidos não são significativos ($p < 0,05$). Para confirmar se existe uma relação seriam necessários mais dados.

Na figura 32 podemos observar os valores obtidos para as cinzas do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

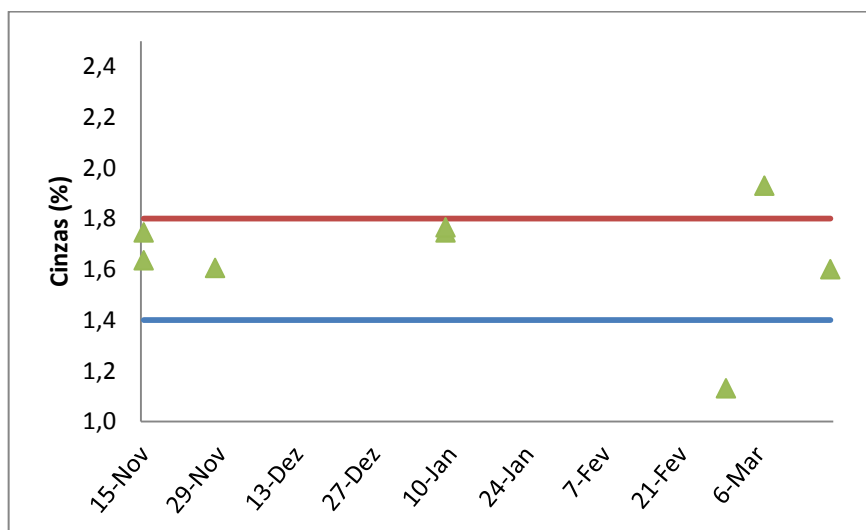


Figura 32 - Variação da percentagem de cinzas do requeijão ao longo do tempo. (▲) % cinzas (N=8) (—) Limite superior definido pelo Despacho n.º 4184/2011, (—) Limite inferior definido pelo Despacho n.º 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve ter um teor de cinzas entre 1,4 g a 1,8 g/100 g de produto. Através da figura 32 podemos observar que, a maioria dos valores obtidos para as cinzas estão dentro dos limites definidos. O valor médio obtido foi de $1,6\% \pm 0,2\%$ variando entre 1,1% a 1,9%. Os valores obtidos são semelhantes aos do *Ricotta* produzido em Itália, de forma tradicional com soro de leite de ovelha, onde Ziino *et al.* (1993) obtiveram uma percentagem de cinzas entre 1,0-1,5%.

De forma geral, a composição do requeijão é dependente de factores como a fonte de soro (caprinos ou ovinos), a composição do soro (que varia segundo a raça, fase de lactação, regime alimentar e tipo de queijo fabricado), proporção de soro (se é fabricado só com soro ou se é adicionado leite) e as práticas tecnológicas seguidas (tempo e temperatura de aquecimento) (Pintado, Macedo e Malcata, 2001).

3.2 - Optimização dos parâmetros físico-químicos do requeijão

Durante os ensaios laboratoriais, adicionando diferentes volumes de leite de ovelha ao soro, foi possível observar que a quantidade de massa de requeijão produzida é maior e mais coesa do que no fabrico de requeijão sem leite adicionado. Resultados semelhantes foram obtidos por Pintado *et al.* (1996).

Na figura 33 podemos observar os valores de humidade obtidos nos ensaios laboratoriais, para o requeijão produzido com 7, 8, 9 e 10% de leite, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

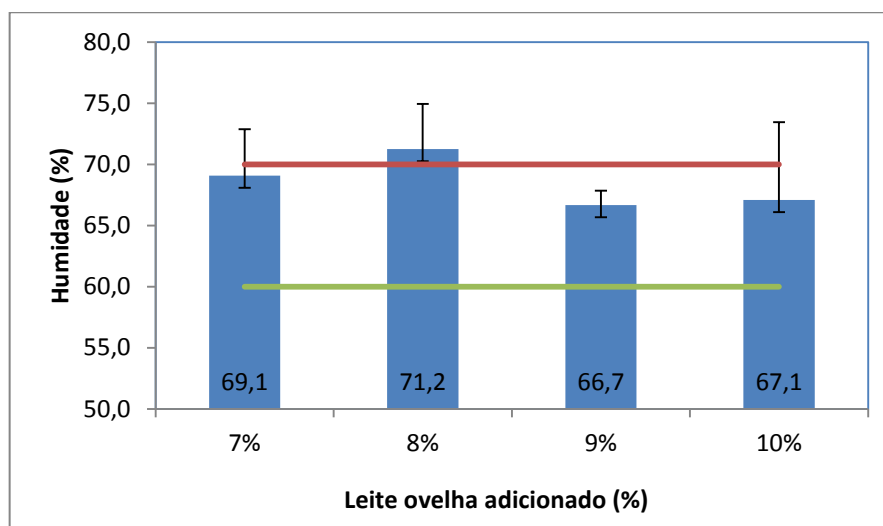


Figura 33 - Variação da percentagem de humidade do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha. (■) % humidade, (—) Limite superior definido pelo Despacho n.º 4184/2011, (—) Limite inferior definido pelo Despacho n.º 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve ter entre 60 a 70% de humidade. Através da figura 33 podemos observar que, com a adição de leite é possível diminuir o teor de humidade do requeijão, para que este cumpra os valores definidos. Na tabela 9 estão representados os valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e o nº total de amostras analisadas para a humidade do requeijão com 7, 8, 9 e 10% de leite.

Tabela 9 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de humidade, em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.

Humidade (%)	7% Leite	8% Leite	9% Leite	10% Leite
X ± δ	69,1 ± 3,8	71,2 ± 3,7	66,7 ± 1,2	67,1 ± 6,4
Mínimo	57,5	63,8	64,9	58,9
Máximo	73,6	78,0	68,5	76,1
N	20	28	8	10

Os valores médios obtidos para o requeijão com 7, 9 e 10% de leite adicionado estão dentro dos limites definidos para a humidade, mas o requeijão com adição de 8% de leite ultrapassou o limite superior definido (tabela 9). Este resultado pode dever-se a um menor tempo de drenagem a que o requeijão esteve sujeito ou a uma menor temperatura e tempo de aquecimento.

Na figura 34 podemos observar os valores de matéria gorda obtidos nos ensaios laboratoriais, para o requeijão com 7, 8, 9 e 10% de leite, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

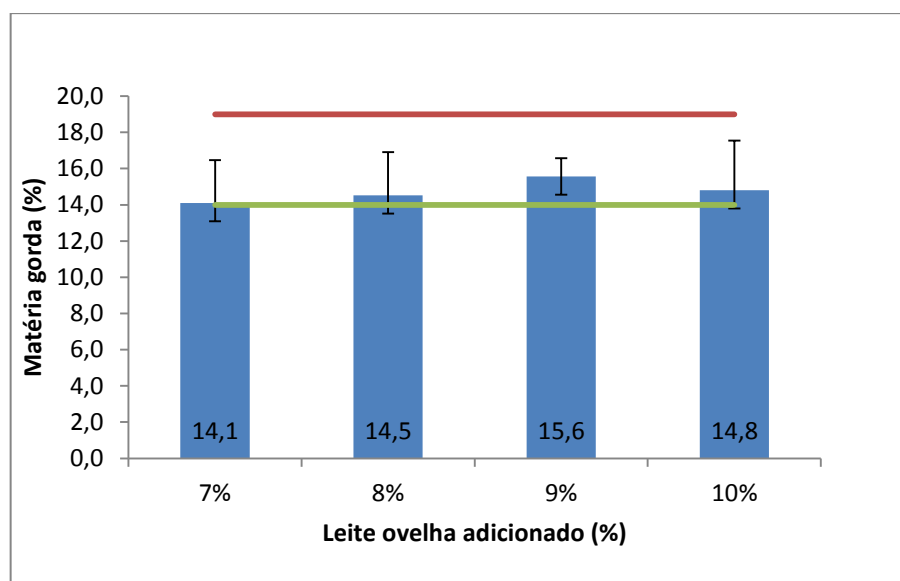


Figura 34 - Variação da percentagem de matéria gorda do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha. (■) % matéria gorda, (→) Limite superior definido pelo Despacho n.º 4184/2011, (—) Limite inferior definido pelo Despacho n.º 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve ter um teor de matéria gorda de 14g a 19g/100g de produto. Através da figura 34 podemos observar que a percentagem de matéria gorda do requeijão é afectada pela adição de leite no soro, verificando-se um aumento da matéria gorda do requeijão. Segundo Pintado *et al.* (1996) a percentagem de matéria gorda do requeijão é afectado não só pela adição de leite, como também pelo tempo e temperatura de aquecimento. Na tabela 10 estão representados os valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e o n.º total de amostras analisadas para a matéria gorda do requeijão com 7, 8, 9 e 10% de leite.

Tabela 10 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e n.º total de amostras analisadas para determinação da percentagem de matéria gorda, em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.

Matéria Gorda (%)	7% Leite	8% Leite	9% Leite	10% Leite
$X \pm \delta$	14,1 \pm 2,4	14,5 \pm 2,4	15,6 \pm 1,0	14,8 \pm 2,8
Mínimo	10,0	9,5	14,0	11,5
Máximo	18,5	18,0	17,0	20,0
N	20	28	8	10

Os valores médios obtidos para a percentagem de matéria gorda do requeijão com adição de leite estão dentro dos limites definidos, verificando-se um aumento gradual da percentagem de matéria gorda com a adição de 7, 8 e 9% de leite (tabela 10). O valor médio obtido para a percentagem de matéria gorda do requeijão com 10% de leite foi inferior aos valores obtidos para as outras percentagens de leite. Isto pode ser justificado pela menor percentagem de matéria gorda presente no leite, pela altura do ano em que o ensaio foi realizado e pela variação da percentagem de retenção da matéria gorda, tanto no fabrico do queijo como no fabrico do requeijão.

Na figura 35 podemos observar os valores de proteína total obtidos nos ensaios laboratoriais, para o requeijão com 7, 8, 9 e 10% de leite, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

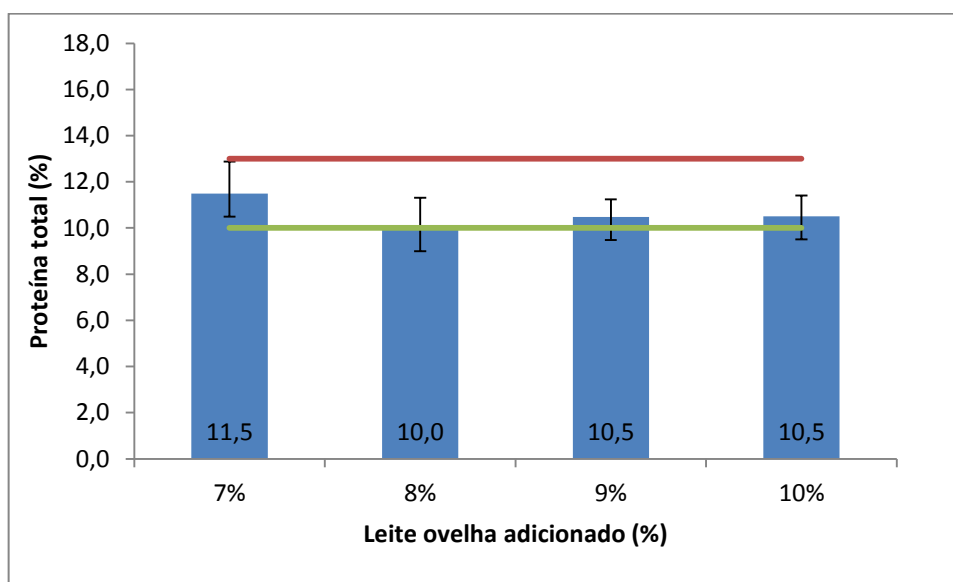


Figura 35 - Variação da percentagem de proteína total do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha. (■) % proteína total, (→) Limite superior definido pelo Despacho n.º 4184/2011, (—) Limite inferior definido pelo Despacho n.º 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve apresentar um teor de proteína total de 10g a 13g/100g de produto. Através da figura 35 podemos observar que os valores médios de proteína total se encontram dentro dos critérios estabelecidos, apesar de se encontrarem mais próximos do limite inferior. Na tabela 11 estão representados os valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e o n.º total de amostras analisadas para a proteína total do requeijão com 7, 8, 9 e 10% de leite.

Tabela 11 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e nº total de amostras analisadas para determinação da percentagem de proteína total, em requeijão com diferentes percentagens de leite adicionado.

Proteína Total (%)	7% Leite	8% Leite	9% Leite	10% Leite
X ± δ	11,5 ± 1,4	10,0 ± 1,3	10,5 ± 0,8	10,5 ± 0,9
Mínimo	8,6	8,3	9,7	9,1
Máximo	12,7	12,7	11,2	11,5
N	9	8	3	5

A percentagem de proteína total do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa já cumpria os limites definidos, uma vez que a média obtida foi de 10,9% ± 2,0% de proteína total, sem adição de leite. Com a adição de várias percentagens de leite, era esperado um aumento da percentagem de proteína total no requeijão. No entanto isto não se verificou (tabela 11). Resultados semelhantes foram obtidos por Modler e Emmons (1989) que mostraram que a percentagem de proteína total no rescaldão diminui quando é misturado leite no soro, o que sugere uma interação das proteínas do soro com as caseínas do leite. Pintado *et al.* (1996) referiram que embora as principais proteínas do soro precipitem durante o aquecimento, pequenas quantidades de α -Lactalbumina e β -Lactoglobulina podem permanecer no rescaldão, juntamente com as caseínas do leite. A temperatura e o tempo de aquecimento também influenciam a percentagem de proteína total que fica retida no requeijão.

Na figura 36 podemos observar a percentagem de cinzas obtidas nos ensaios laboratoriais, para o requeijão com adição de 7, 8, 9 e 10% de leite de ovelha, bem como os limites definidos pelo Despacho n.º4184/2011.

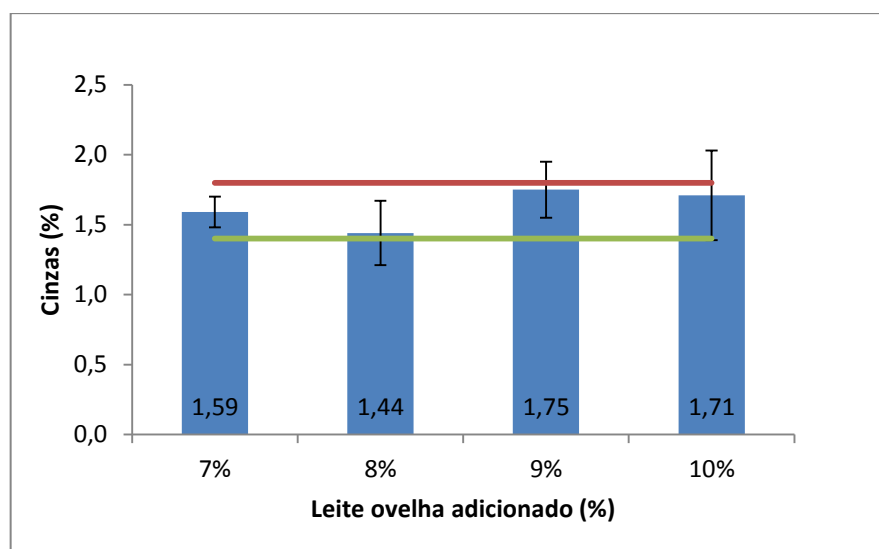


Figura 36 - Variação da percentagem de cinzas do requeijão com adição de diferentes percentagens de leite de ovelha. (■) % cinzas, (—) Limite superior definido pelo Despacho n° 4184/2011, (—) Limite inferior definido pelo Despacho n° 4184/2011.

Segundo o Despacho n.º4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve ter um teor de cinzas entre 1,4g a 1,8g/100g de produto. Através da figura 36 podemos observar que os valores médios obtidos para a percentagem de cinzas se encontram dentro dos critérios estabelecidos, apesar de se verificar uma grande variação com a adição de diferentes percentagens de leite. Na tabela 12 estão representados os valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e o n° total de amostras analisadas para a percentagem de cinzas do requeijão com adição de 7, 8, 9 e 10% de leite de ovelha.

Tabela 12 - Valores médios, desvio-padrão, máximos, mínimos obtidos e n° total de amostras analisadas para determinação da percentagem de cinzas, em requeijão com adição de leite de ovelha.

Cinzas (%)	7% Leite	8% Leite	9% Leite	10% Leite
$\bar{X} \pm \delta$	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,3
Mínimo	1,5	1,3	1,6	1,3
Máximo	1,8	2,0	1,9	2,0
N	9	8	3	5

A percentagem de cinzas do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa já cumpria os limites definidos, uma vez que a média obtida foi de 1,6% ± 0,2%. A percentagem de cinzas foi superior a este valor médio para os requeijões com 9 e 10% de leite mas foi inferior para os requeijões com 7 e 8% de leite adicionado (tabela 12).

Os valores obtidos para o pH encontram-se na tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios obtidos e respectivo desvio padrão para o pH do requeijão.

Requeijão	pH ($\bar{x} \pm \delta$)	N
Sem leite	6,3 \pm 0,3	59
7% leite	6,5 \pm 0,1	10
8% leite	6,5 \pm 0,1	28
9% leite	6,5 \pm 0,1	4
10% leite	6,6 \pm 0,1	5

Não se verificou uma grande variação dos valores de pH, uma vez que estes se situaram sempre entre 6-7 em todos os requeijões, com ou sem adição de leite.

O teste da fosfatase alcalina deu sempre negativo para todas as amostras de requeijão, o que indica que durante o processo de fabrico do requeijão, este atingiu as temperaturas de pasteurização durante tempo suficiente para inactivar a enzima.

3.2.1 - Taxas de recuperação

Na tabela 14 podemos observar a percentagem de matéria gorda presente no soro e no rescaldão após o fabrico do requeijão, bem como as respectivas taxas de recuperação para o requeijão sem leite e com diferentes percentagens de leite adicionado.

Tabela 14 - Matéria gorda presente no soro e no rescaldão para o requeijão sem leite e para os requeijões com diferentes percentagens de leite adicionado e respectivas taxas de Recuperação.

Requeijão	Matéria gorda	Matéria gorda	Taxa Recuperação	N
	Soro (%)	Rescaldão (%)	Matéria gorda (%)	
Sem Leite	0,7 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	78,2 \pm 21,0	45
7% Leite	0,5 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	79,2 \pm 14,1	10
8% Leite	0,8 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	79,1 \pm 14,6	14
9% Leite	0,7 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	69,1 \pm 10,6	4
10% Leite	0,6 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	75,7 \pm 14,8	5

A partir do conteúdo de matéria gorda do rescaldão, verificou-se que a taxa de recuperação de matéria gorda foi de 78,2% do total de matéria gorda contida no soro, sem adição de leite (tabela 14). Com adição de 7 e 8% de leite ao soro, verificou-se um aumento da taxa de recuperação de matéria gorda. No entanto, o mesmo não aconteceu para o requeijão com 9 e 10% de leite adicionado, onde a taxa de recuperação da matéria gorda foi

inferior. Este resultado pode ser devido a um menor tempo de aquecimento durante o fabrico, que provocou uma menor retenção da matéria gorda no requeijão.

Na tabela 15 podemos observar a percentagem de proteína total presente no soro e no rescaldão após o fabrico do requeijão, bem como as respectivas taxas de recuperação para o requeijão sem leite e com diferentes percentagens de leite adicionado.

Tabela 15 - Proteína total presente no soro e no rescaldão para o requeijão sem leite e para os requeijões com diferentes percentagens de leite adicionado e respectivas taxas de Recuperação.

Requeijão	Proteína total	Proteína total	Taxa Recuperação	N
	Soro (%)	Rescaldão (%)	Proteína Total	
Sem Leite	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	50,6 ± 10,0	45
7% Leite	1,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	52,9 ± 6,7	10
8% Leite	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	46,3 ± 9,2	14
9% Leite	1,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	52,9 ± 3,5	4
10% Leite	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	39,9 ± 11,2	5

A partir do conteúdo de proteína total do rescaldão, verificou-se que taxa de recuperação de proteína foi de 50,6% do total de proteína contida no soro, sem adição de leite. Este resultado é inferior ao obtido por Hill *et al.* (1982), que relatou que a recuperação máxima teórica de proteína a partir do soro varia de 55-65% de proteína total. Através da tabela 15 podemos observar que com adição de 7 e 9% de leite ao soro, verifica-se um aumento da taxa de recuperação de proteína total, no entanto, isto não se verificou para o requeijão com 8 e 10% de leite adicionado. Com a adição de 10% de leite obteve-se uma taxa de recuperação de proteína total de 39,9% e sem adição de leite, uma taxa de recuperação de proteína total de 50,6%. Estes valores são inferiores aos referidos por Pintado *et al.* (1996) que obtiveram uma taxa de recuperação de proteína de 53,7% para requeijão com adição de 10% de leite de cabra e uma taxa de recuperação de proteína de 32,7% para requeijão sem adição de leite. Este facto pode ser justificado pela precipitação das proteínas do soro com as caseínas do leite e com a pouca eficiência na retenção das proteínas no requeijão.

3.2.2 - Validação do método

Os resultados médios obtidos para o ensaio à escala industrial com adição de 8% de leite e para o requeijão usado como controlo estão na tabela 16.

Tabela 16 - Valores médios obtidos para a percentagem de humidade, matéria gorda, proteína total e cinzas do requeijão (controlo) e do requeijão com 8% de leite. (N=2)

Parâmetros	Requeijão (controlo)	Requeijão com 8% leite
Humidade (%)	70,9	66,0
Matéria gorda (%)	10,0	13,3
Proteína total (%)	10,5	11,4
Cinzas (%)	1,8	1,9

O pH do requeijão produzido na Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa e do requeijão com 8% de leite foi de 6,7 e 6,6 respectivamente. A prova da fosfatase alcalina foi negativa e não se verificou a presença de microrganismos patogénicos nas amostras.

De acordo com a tabela 16, podemos observar que apenas a percentagem de humidade e matéria gorda, do requeijão usado como controlo, está fora dos limites impostos pelo Despacho n.º4184/2011. Com a adição de 8% de leite a percentagem de humidade aumenta e fica dentro dos limites impostos (60-70%), no entanto esta quantidade de leite não é suficiente para atingir os limites definidos para a matéria gorda (14-19%). A percentagem de proteína está dentro dos parâmetros (10-13%) e verificou-se um aumento do teor de cinzas ultrapassando o limite definido (1,4-1,8%).

3.3 - Controlo microbiológico

Na figura 37 podemos observar a contagem de Microrganismos totais (ufc/g) no requeijão produzido pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa.

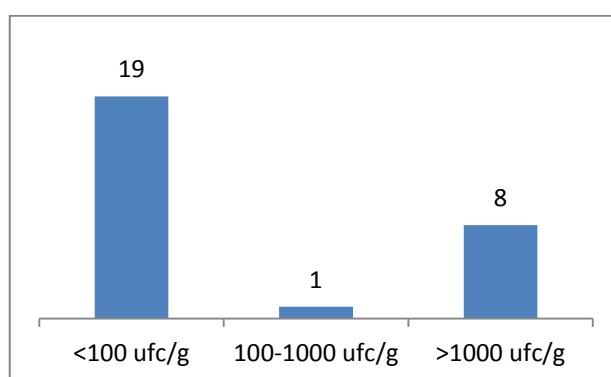


Figura 37 - Distribuição dos valores de contagem de Microrganismos totais (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. (■) Contagem de Microrganismos totais no requeijão sem adição de leite (N=28).

Para a contagem de Microrganismos Totais não existe um limite definido pela legislação. No requeijão produzido pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa em 67,9% das amostras

verificou-se um crescimento de Microrganismos totais inferior a 100 ufc/g e em 28,6% das amostras um crescimento superior a 1000 ufc/g. Na figura 38 podemos observar a contagem de Microrganismos totais (ufc/g) nos requeijões com adição de 7, 8, 9,10% de leite.

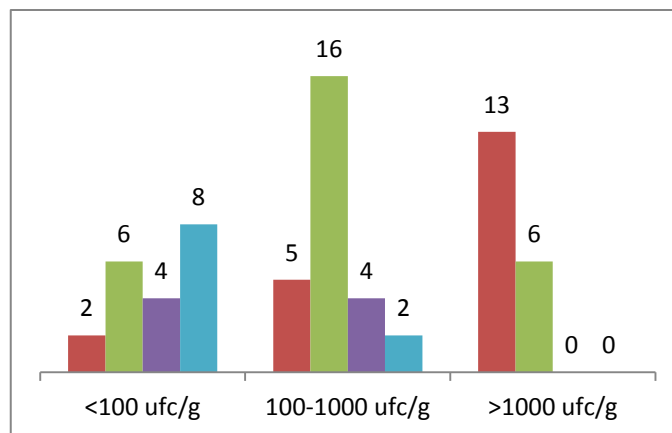


Figura 38 - Distribuição dos valores de contagem de Microrganismos totais (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado. (■) requeijão com 7% de leite adicionado (N=20); (■) requeijão com 8% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 9% de leite adicionado (N=8); (■) requeijão com 10% de leite adicionado (N=10).

Nos requeijões com 9 e 10% de leite verificou-se crescimento de Microrganismos totais inferior a 1000 ufc/g enquanto que, nos requeijões com 7 e 8% de leite verificou-se um crescimento de Microrganismos totais superior a 1000 ufc/g. O número de ufc/g está dependente da qualidade microbiológica do soro, do leite adicionado e dos cuidados de higiene tidos durante o fabrico do requeijão. Uma hipótese que pode justificar este número elevado de microrganismos totais pode ser a possível contaminação das formas onde o requeijão fica a drenar.

Na figura 39 podemos observar a contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva (ufc/g) no requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.

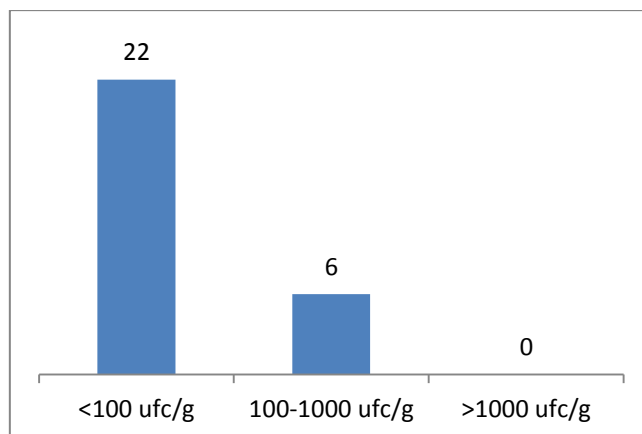


Figura 39 - Distribuição dos valores de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. (■) Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva no requeijão sem adição de leite (N=28).

Segundo o Regulamento (CE) N° 1441/2007 o número de colónias de *Staphylococcus* coagulase positiva deve ser inferior a 100 ufc/g sendo o máximo permitido de 1000 ufc/g. Verificou-se um crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva inferior a 100 ufc/g em 78,6% das amostras produzidas pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa e um crescimento de 100-1000 ufc/g em 21,4% das amostras. Não se verificou um crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva superior ao máximo permitido. Pintado, Macedo e Malcata (2001) não obtiveram contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva no dia de fabrico do requeijão, no entanto, relataram que 2 dias após o armazenamento do requeijão obtiveram uma contagem de *Staphylococcus* de $7,2 \times 10^3$ ufc/g. Neste trabalho, as análises microbiológicas foram sempre feitas no próprio dia de fabrico do requeijão. Na figura 40 podemos observar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (ufc/g) nos requeijões com adição de 7, 8, 9,10% de leite.

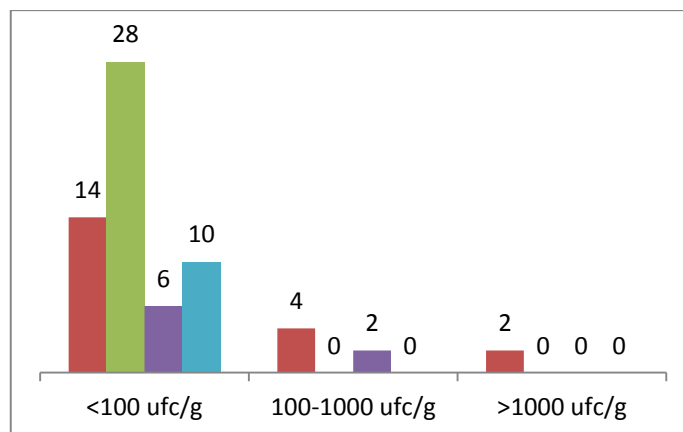


Figura 40 - Distribuição dos valores de contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado. (■) requeijão com 7% de leite adicionado (N=20); (■) requeijão com 8% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 9% de leite adicionado (N=8); (■) requeijão com 10% de leite adicionado (N=10).

Apenas no requeijão com adição de 7% de leite houve crescimento de *Staphylococcus coagulase* positiva superior a 1000 ufc/g. Nos requeijões com 7 e 9% de leite houve crescimento de *Staphylococcus* entre 100-1000 ufc/g. Nos restantes requeijões o crescimento de *Staphylococcus* foi sempre inferior a 100 ufc/g. Uma hipótese que pode justificar a existência de contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, tanto no requeijão produzido pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa como nos ensaios a nível laboratorial com adição de leite, é uma possível contaminação das mãos dos colaboradores que manusearam o requeijão e dos utensílios usados no fabrico do requeijão.

Na figura 41 podemos observar a contagem de *Escherichia coli* (ufc/g) no requeijão produzido pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa.

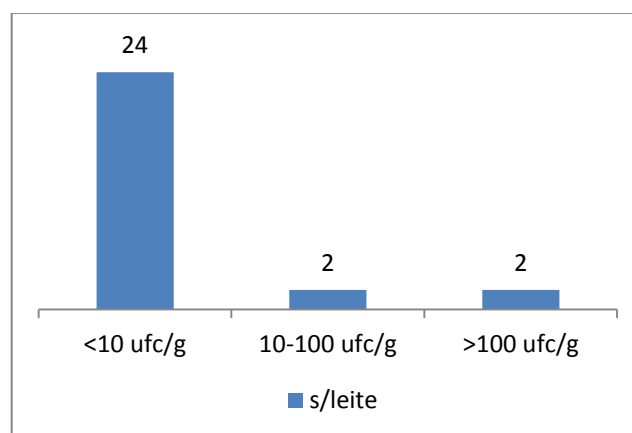


Figura 41 - Distribuição dos valores de contagem de *Escherichia coli* (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. (■) Contagem de *Escherichia coli* no requeijão sem adição de leite (N=28).

Segundo o Regulamento (CE) N° 1441/2007 o n° de colónias de *Escherichia coli* deve ser inferior a 100 ufc/g sendo o máximo permitido de 1000 ufc/g. Verificou-se um crescimento de *Escherichia coli* inferior a 10 ufc/g em 85,8% das amostras produzidas pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa e um crescimento superior a 100 ufc/g apenas em 7,1% das amostras. Não se verificou um crescimento de *Escherichia coli* superior ao máximo permitido. Estes resultados não estão de acordo com os referidos por Pintado, Macedo e Malcata (2001) que não obtiveram contagem de *Escherichia coli* no dia de fabrico do requeijão, no entanto, dois dias após o armazenamento do requeijão obtiveram uma contagem de Enterobacteriaceae de $8,7 \times 10^3$ ufc/g. Na figura 42 podemos observar as unidades formadoras de colónias (ufc/g) de *Escherichia coli* nos requeijões com adição de 7, 8, 9,10% de leite.

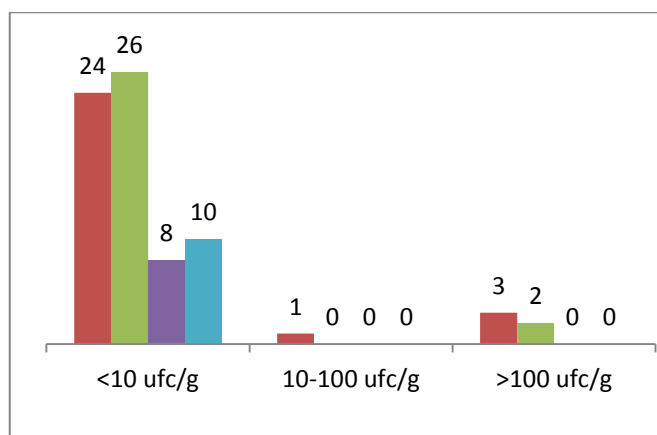


Figura 42 - Distribuição dos valores de contagem de *Escherichia coli* (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado. (■) requeijão com 7% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 8% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 9% de leite adicionado (N=8); (■) requeijão com 10% de leite adicionado (N=10).

Na maior parte dos requeijões analisados, a presença de *Escherichia coli* foi inferior a 10 ufc/g. Contudo, nos requeijões com 7 e 8% de leite houve crescimento de *Escherichia coli* superior a 100 ufc/g. A *Escherichia coli* pode provir de contaminação de utensílios ou manipulação do requeijão. Também se pode colocar a hipótese de crescimento durante o armazenamento do requeijão a uma temperatura inferior a 6°C.

Na figura 43 podemos observar a contagem de Coliformes totais (ufc/g) no requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa.

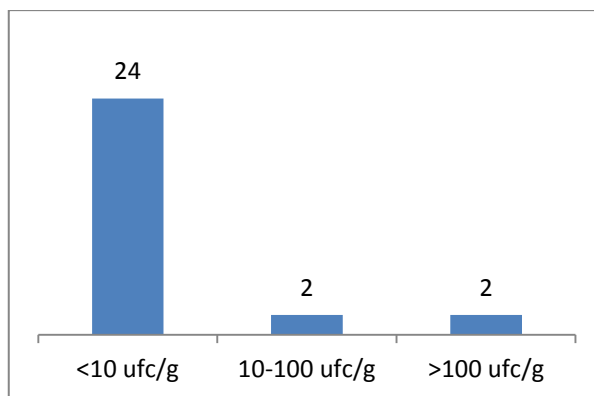


Figura 43 - Distribuição dos valores de contagem de Coliformes totais (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. (■) Contagem de Coliformes totais no requeijão sem adição de leite (N=28).

Para a contagem de Coliformes Totais não existe um limite definido pela legislação. Verificou-se uma contagem de Coliformes Totais inferior a 10 ufc/g em 85,8% das amostras produzidas pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa e um crescimento superior a 100 ufc/g apenas em 7,1% das amostras. Estes resultados não estão de acordo com os referidos por Pintado, Macedo e Malcata (2001) que não obtiveram contagem de Coliformes totais no dia de fabrico do requeijão, no entanto, dois dias após o armazenamento do requeijão obtiveram uma contagem de Enterobacteriaceae de $8,7 \times 10^3$ ufc/g. Na figura 44 podemos observar a contagem de Coliformes totais (ufc/g) nos requeijões com adição de 7, 8, 9, 10% de leite.

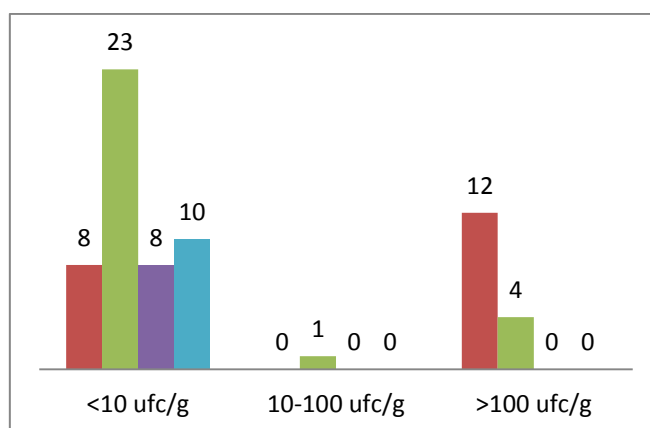


Figura 44 - Distribuição dos valores de contagem de Coliformes totais (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado. (■) requeijão com 7% de leite adicionado (N=20); (■) requeijão com 8% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 9% de leite adicionado (N=8); (■) requeijão com 10% de leite adicionado (N=10).

Apenas nos requeijões com 7 e 8% de leite houve crescimento de coliformes totais superiores a 100 ufc/g. Nos restantes requeijões o crescimento de Coliformes totais foi sempre inferior a 10 ufc/g. Os Coliformes totais incluem os Coliformes fecais (*Escherichia coli*) e outros coliformes como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. A sua presença nos produtos pasteurizados indica contaminação por utensílios, trabalhadores ou ambiente no qual o produto foi produzido, não representando perigo para a saúde pública.

Na figura 45 podemos observar a contagem de *Pseudomonas spp.* (ufc/g) no requeijão produzido pela Cooperativa de Queijos da Beira Baixa.

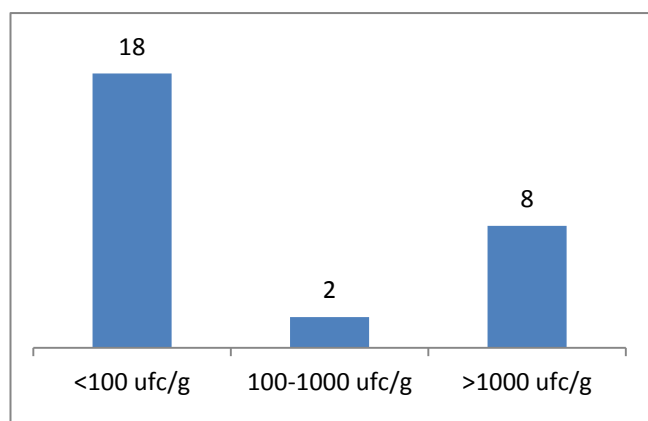


Figura 45 - Distribuição dos valores de contagem de *Pseudomonas spp.* (ufc/g) do requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa. (■) Contagem de *Pseudomonas spp.* no requeijão sem adição de leite (N=28).

Para a contagem de *Pseudomonas spp.* não existe um limite definido pela legislação, sendo a sua contagem um parâmetro interno da Cooperativa de Queijos da Beira Baixa, indicador de contaminação ambiental. Verificou-se um crescimento de *Pseudomonas spp.* inferior a 100 ufc/g em 64,3% das amostras e um crescimento superior a 1000 ufc/g em 28,6% das amostras. Estes resultados não estão de acordo com os referidos por Pintado, Macedo e Malcata (2001) que não obtiveram contagem de *Pseudomonas spp.* no dia de fabrico do requeijão, no entanto, dois dias após o armazenamento do requeijão obtiveram uma contagem de *Pseudomonas* de $4,3 \times 10^3$ ufc/g. Na figura 46 podemos observar a contagem de *Pseudomonas spp.* (ufc/g) nos requeijões com adição de 7, 8, 9,10% de leite.

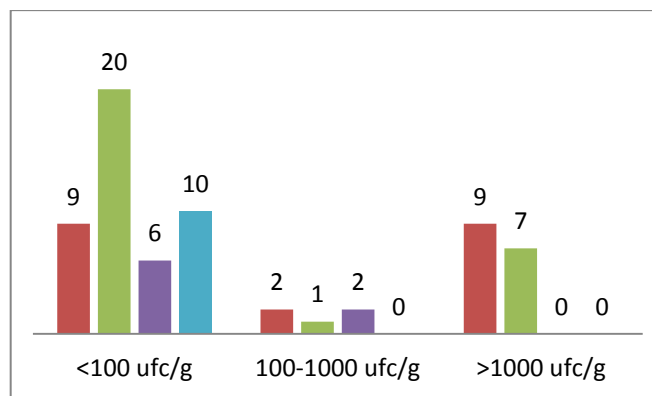


Figura 46 - Distribuição dos valores de contagem de *Pseudomonas* spp. (ufc/g) em requeijão com diferentes percentagens de leite de ovelha adicionado. (■) requeijão com 7% de leite adicionado (N=20); (■) requeijão com 8% de leite adicionado (N=28); (■) requeijão com 9% de leite adicionado (N=8); (■) requeijão com 10% de leite adicionado (N=10).

Nos ensaios laboratoriais com diferentes percentagens de leite adicionado, o crescimento de *Pseudomonas* spp. foi superior a 1000 ufc/g nos requeijões com 7 e 8% de leite. Nos restantes requeijões verificou-se um crescimento de *Pseudomonas* spp. inferior a 1000 ufc/g. As *Pseudomonas* spp. podem contaminar os produtos durante o processo de fabrico, pois conseguem formar biofilmes em superfícies de ácido inoxidável. A resistência das *Pseudomonas* spp. aos desinfectantes usados na industria alimentar agrava o problema da presença de biofilmes em superfícies em contacto directo com os produtos alimentares (Chmielewski e Frank, 2003).

Segundo o Regulamento (CE) N° 1441/2007 a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* deve ser ausente em 25,0 g de amostra. Tanto para o requeijão sem leite como para os requeijões com leite adicionado, a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* foi sempre negativa. Estes resultados estão de acordo com os referidos por Angelidis *et al.* (2012) que obtiveram sempre resultados negativos para *Listeria monocytogenes* em todos os requeijões gregos analisados.

De forma geral, podemos observar que não foram encontrados microrganismos patogénicos no requeijão, sendo que os microrganismos que mais frequentemente estão presentes no requeijão são os Microrganismos Totais e as *Pseudomonas* spp.

Segundo Pintado, Macedo e Malcata (2001) o crescimento de microrganismos depende de factores como a disponibilidade de nutrientes, actividade da água, pH, força iónica e temperatura.

3.4 - Análise sensorial

Nas figuras 47 a 50 apresentam-se os resultados dos atributos analisados, após a prova sensorial dos dois requeijões em estudo, um com 8% de leite adicionado e o outro sem adição de leite. Para cada parâmetro pode ter sido escolhido mais do que um atributo.

Através da análise sensorial observou-se que a massa do requeijão sem leite se apresentava mais granulosa e mole do que a massa do requeijão com leite (figura 47).

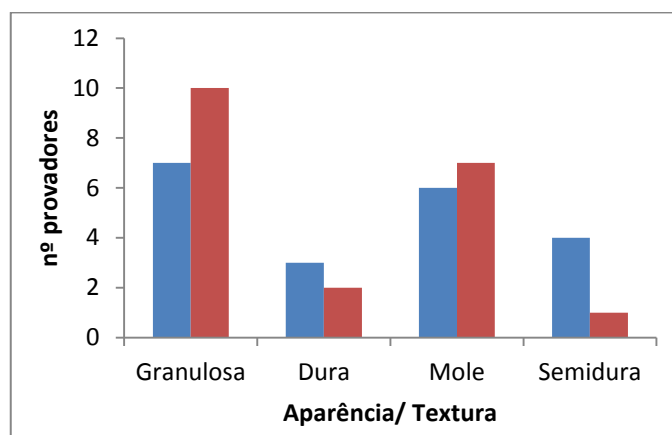


Figura 47 - Resultados da prova sensorial para a aparência/ textura do requeijão. (■) requeijão com adição de 8% de leite; (■) requeijão sem adição de leite.

Como era de esperar, o requeijão com leite apresentou um sabor láctico superior ao requeijão sem leite (figura 48).

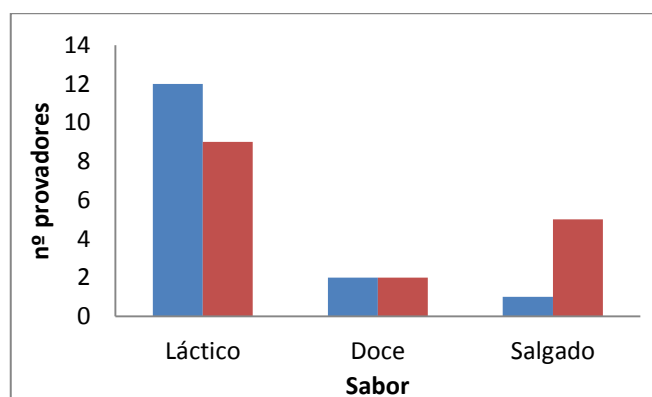


Figura 48 - Resultados da prova sensorial para o sabor do requeijão. (■) requeijão com adição de 8% de leite; (■) requeijão sem adição de leite.

Os dois requeijões apresentam um odor láctico e agradável (figura 49).

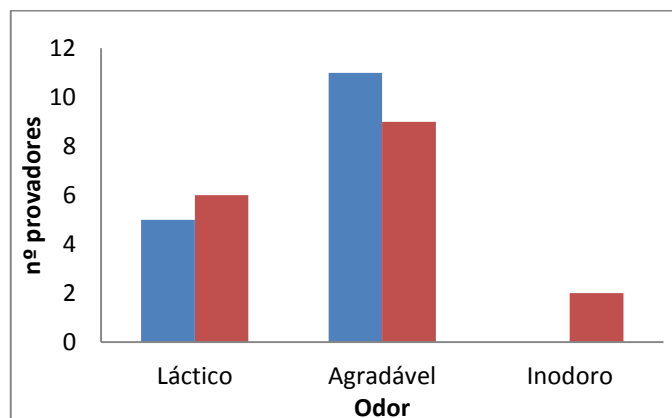


Figura 49 - Resultados da prova sensorial para o odor do requeijão. (■) requeijão com adição de 8% de leite; (■) requeijão sem adição de leite.

Tanto o requeijão com leite como o requeijão sem leite apresentavam uma coloração branca (figura 50).

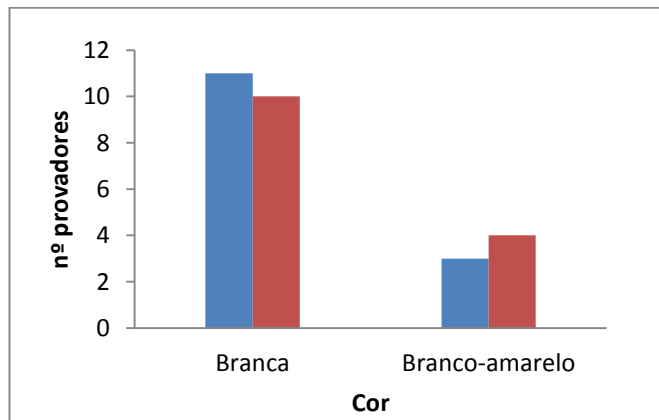


Figura 50 - Resultados da prova sensorial para a cor do requeijão. (■) requeijão com adição de 8% de leite; (■) requeijão sem adição de leite.

Na análise sensorial, 57,1% dos provadores preferiu o requeijão com adição de leite e 42,9% preferiu o requeijão sem qualquer adição de leite, o que mostra que a adição de leite não condiciona a comercialização do requeijão.

Capítulo 4 - Conclusões

4.1 - Conclusões Gerais

Para que o Requeijão da Beira Baixa possa ser considerado Denominação de Origem (DO) tem de respeitar os limites impostos pelo Despacho n.º4184/2011.

Assim, obtiveram-se as seguintes conclusões gerais:

A percentagem de matéria gorda e de proteína total do soro está dependente do tipo de leite, do tipo de queijo fabricado e da época do ano, sofrendo oscilações diárias.

O requeijão apresentou valores médios de 74,5% de humidade e 10,5% de matéria gorda, que estão fora dos limites especificados para o Requeijão da Beira Baixa DO, mas os valores obtidos para a proteína total (10,9%) e para as cinzas (1,6%) estão dentro dos limites.

Com a adição de leite verifica-se um aumento da percentagem de matéria gorda e uma diminuição da percentagem de humidade sem afectar a percentagem de proteína total e a percentagem de cinzas, que é semelhante à do requeijão sem leite.

Não foram detectados microrganismos patogénicos no requeijão. O requeijão produzido pela Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa e os ensaios com adição de leite obedecem à legislação vigente no que respeita às características microbiológicas dos produtos à base de leite, nomeadamente para *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*.

Através da validação do método podemos concluir que a adição de 8% de leite ainda não é suficiente para que a percentagem de matéria gorda esteja dentro dos limites impostos, devido à variação natural da composição do soro proveniente do fabrico dos queijos da Beira Baixa DOP.

Na análise sensorial 57,1% dos provadores preferiu o requeijão com adição de leite em vez do requeijão sem leite, o que mostra que a adição de leite não condiciona a comercialização do requeijão.

Das percentagens de leite adicionadas, foi entre 9-10% de leite que se obteve os melhores resultados, desde que o soro contenha 0,38-0,86% de matéria gorda e 1,28-1,76% de proteína total.

4.2 - Perspectivas futuras

Para controlar o processo de fabrico do requeijão é necessário fazer um controlo das matérias-primas utilizadas relativamente à percentagem de matéria gorda e à percentagem de proteína total.

Será também interessante efectuar um estudo ao soro e comparar a composição do soro de ovelha com a composição do soro de ovelha e cabra.

De acordo com a percentagem de matéria gorda e de proteína total do soro é possível criar uma tabela, de forma a saber qual a percentagem correcta de leite a adicionar de forma a atingir os limites impostos pelo Despacho n.º4184/2011.

Pode ser realizado um estudo ao tempo e à temperatura de coagulação no processo de fabrico do requeijão de forma a saber em que medida afectam o produto final.

Pode ser estudado o efeito da embalagem a vácuo na preservação das propriedades físico-químicas e microbiológicas do requeijão

Pode também ser realizado um estudo aprofundado dos parâmetros físico-químicos do requeijão, candidato a DO, como base de uma proposta de alteração dos limites definidos no caderno de especificações do Requeijão da Beira Baixa, tendo em conta a evolução tecnológica do fabrico dos queijos da Beira Baixa.

Bibliografia

Addis, Z., Kebede, N., Worku, Z., Gezahegn, H., Yirsaw, A. e Kassa, T. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. *BMC Infectious Diseases*. 11:222.

Angelidis, A.S., Georgiadou, S.S., Zafeiropoulou, V., Velonakis, E.N., Papageorgiou, D.K. e Vatopoulos, A. (2012). A survey of soft cheeses in Greek retail outlets highlights a low prevalence of *Listeria* spp. *Dairy Science & Technology*. 92:189-201.

Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer. Heidelberg, Germany.

Bendahou, A., Lebbadi, M., Ennane, L., Essadqui, L. e Abid, M. (2008). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2: 218-225.

Bridson, E.Y. (1998). *The Oxoid Manual*. 8th Edition, Oxoid Limited. Hampshire, UK.

Casal, M., Nobre, A., Ribeiro, A., Pais, C., Schuller, D., Rodrigues, G., Cardoso, H. (2004). *Microbiologia e Genética Molecular Microbiana - Manual de Laboratório*. (Vol 1). Universidade do Minho. Braga, Portugal.

Cecchi, H.M. (2003) *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2^a Edição, Unicamp. São Paulo, Brasil.

Chauret, C. (2011). Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Landes Bioscience Journals: Virulence*. 2:6 593-601.

Chmielewsky, R.A.N. e Frank, J.F. (2003) Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 22-32.

Comunicação pessoal por Dr.^a Patrícia Dinis, Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa/Idanha-a-Nova, CRL.

Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T. e Bava, U. (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*. 145: 4366-4374.

Ferreira, W. e Sousa, J.C. (2000). *Microbiologia*. Volume 2, Lidel. Lisboa, Portugal.

Fonseca, V.D., Haminiuk, C.W.I., Izydor, D.R., Waszczynskyj, N., Scheer, A.D. e Sierakowski, M.R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 777-783.

Fox, P.F. e McSweeney, P.L.H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. First Edition, Blackie Academic & Professional. London, UK.

Guenther, S. e Loessner, M. (2011). Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Landes Bioscience: Bacteriophage*. 1:2 94-100.

Hakkak, R., Korourian, S., Martin, S., Ronis, J.J., Johnston, J.M. e Badger, T.M. (2001). Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumours in male rats. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 10: 555-558.

Hill, A.R., Irvinc, D.M. e Bullock, D.H. (1982). Precipitation and recovery of whey proteins. A review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 15: 155-160

Hui, Y.H. (2006). *Food Biochemistry and Food Processing*. First Edition, Blackwell Publishing. Aimes, USA.

Khoshgozaran, S., Azizi, M.H. e Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. *Dairy Science & Technology*. 92: 1-24.

Madureira, A.R., Soares, J.C., Pintado, M.E., Gomes, A.P., Freitas, A.C. e Malcata, F.X. (2008). Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI (R) L26. *Dairy Science & Technology*. 88: 649-665

Merck (2000). *Microbiology Manual*. 12th Edition. French & European Pubns. Darmstadt, Germany.

Modler, H.W. e Emmons, D.B. (1989). Production and yield of whole milk ricotta manufacture by a continuous processo. II. Results and discussion. *Milchwissenschaft*. 44: 753-757.

NP 2105 (1983). *Determinação do teor de matéria gorda. Técnica de Van Gulik. Processo corrente*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

Philson, S.B. e Llinás, M. (1982). Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry*. 257: 8081-8085.

Pintado, M.E., Silva, J.A. e Malcata, F.X. (1996). Characterization of Requeijão and Technological Optimization of its Manufacturing Process. *Journal of Food Engineering*. 30: 363-376.

Pintado, M.E. e Malcata, F.X. (1999). Estudos descritivos e tecnológicos sobre Requeijão: caracterização e conservação. *Boletim de Biotecnologia*. 62: 19-25.

Pintado, M.E. e Malcata, F.X. (2000). Optimization of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão. *Food Research International*. 33: 821-832.

Pintado, M. E., Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (2001) Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International*. 7: 105-116.

Prekoppova, J. e Krcal, Z. (1990). Composition of ewe's whey. *International Dairy Federation*. 38.

Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A. (2002) *Microbiology*. 5th Edition, The McGraw-Hill Companies. New York, USA.

Regulamento (CE) N° 510/2006 de 20 de Março. *Jornal oficial da União Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CE) N° 1441/2007 de 5 de Dezembro. *Jornal oficial da União Europeia*. Bruxelas.

Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações. (2011). Associação de Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco. Castelo Branco, Portugal.

Robinson, R.K. (1994). *Modern Dairy Technology: Advances in Milk Products*. Vol. 1, 2nd Edition. Elsevier. New York, USA.

Rodrigues, F. (2005). *Manual de Bancada para laboratório*. Parte II, Instituto Adolfo Lutz . São Paulo, Brasil.

Sant'Ana, A.S. e Azaredo, D.P. (2005). Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25: 531-535.

Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins - From "gutter-to-gold". *International Dairy Journal*. 18: 695-704.

Tavares, T.G. e Malcata, F.X. (2011). The Portuguese Paradox: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chemistry*. 131: 727-729.

Tranjan, B.C., Cruz, A.G., Walter, E.H.M., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Moura, M.R.L. e Carvalho, L.M.J. (2009). Development of goat cheese whey-flavoured beverages. *International Journal of Dairy Technology*. 62: 438-443

Vodret, A. (1970). La ricotta pecorina sarda. *Scienza ed Tecnologia Lattiero Casearia*. 21: 310-313.

Zenebon, O., Pascuet, N.S. e Tiglea, P. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4ª Edição (1ª Edição Digital), Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, Brasil.

Ziino M., Salvo F., Stagno-d`Acontres I. e Chiofalo B. (1993). Composition of ricotta cheese from Pinzirita sheep bred in the areas surrounding Mt. Etna volcano (Catania, Italy). *Scienza ed Tecnologia Lattiero Casearia*. 44: 217-231.

Anexo 1



Análise Sensorial
Requeijão da Beira Baixa DO

Nome: _____

Este teste sensorial é constituído por duas amostras diferentes. Prove as amostras e escolha os parâmetros correctos.

Amostra 1 Amostra 2

Aparência / textura

Granulosa		
Dura		
Mole		
Semidura		

Cor

Amarela		
Branca		
Branco-Amarela		

Sabor

Láctico		
Doce		
Salgado		

Odor

Láctico		
Agradável		
Inodoro		

Qual das amostras gostou mais? Porquê?
