

Otimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado

Ana Raquel Ferreira Rodrigues

Mestrado em Engenharia Agronómica

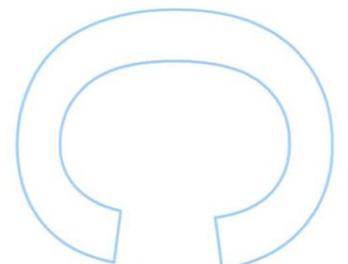
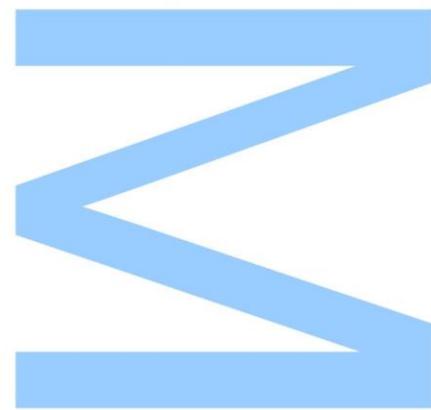
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território
2014

Orientador

Ana Rita Bentes Jordão Cabrita, ICBAS/UP

Coorientador

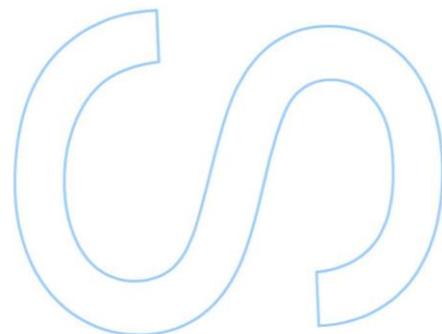
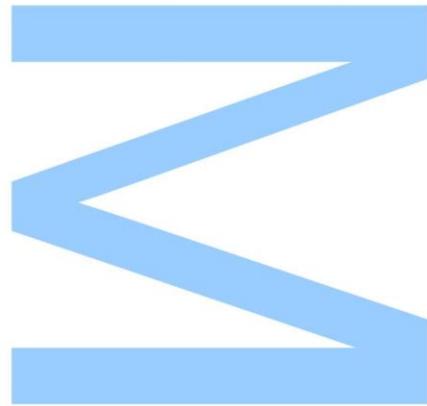
Vasco Augusto Pilão Cadavez, IPB





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A minha tese de Mestrado resulta do esforço e dedicação de várias pessoas, que gentilmente me acompanharam e me permitiram concluir com muita satisfação o Mestrado em Engenharia Agronómica.

À Professora Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita tenho a agradecer o exemplo de competência, empenho e motivação que teve como Professora na Faculdade de Ciências e como Diretora do Mestrado de Engenharia Agronómica. Como minha orientadora a Professora Doutora Rita correspondeu exatamente às expectativas por mim criadas de início. A atenção às minhas necessidades até ao momento de entrega da tese, rigor no planeamento da minha experiência, agilidade na resolução dos percalços que surgiram e o optimismo com que sempre encarou o meu trabalho valorizaram em muito este ano. Por toda a amizade, obrigada professora.

Ao Professor Doutor Vasco Augusto Pilão Cadavez, meu co-orientador, gostaria de agradecer o facto de me ter colocado em contacto com a Queijaria Vaz, onde pude realizar o meu trabalho. Agradeço ainda o apoio e ajuda que me deu nos oito meses que estive em Bragança.

Ao Sr. Arménio, proprietário da Queijaria Vaz, e a toda a sua família, agradeço a simpatia com que me receberam e trataram e todo o apoio que me deram para desenvolver o meu trabalho experimental.

Ao Professor Luís Miguel Soares Ribeiro Leite da Cunha agradeço a ajuda no planeamento das provas de análise sensorial, pela disponibilidade do espaço para a realização da mesma e pela ajuda na análise dos resultados das provas. Mas agradeço principalmente ao Professor Doutor Luís Cunha a estima, dedicação e boa vontade com que o fez. Obrigada professor.

A todos os colegas da Queijaria Vaz, em partícula à D. Alice e à D. Céu, agradeço os ensinamentos que me passaram no fabrico do queijo, as horas de

trabalho passadas com boa disposição e alegria características de quem trabalha com muito gosto. Foi um privilégio conhecê-las.

À Eng^a. Sílvia Azevedo e Doutora Margarida Maia gostaria de agradecer a simpatia, amizade e ajuda em todos os momentos.

A todos os funcionários do IPB, em particular à Professora Doutora Sância Pires, ao Luís, ao Eng^o. João David, Sr. José António e Sr. Mós agradeço a amizade e ajuda que me deram em Bragança.

Ao painel de provadores da prova de análise sensorial o meu agradecimento pela participação entusiasta, dedicada e profissional.

A todos os colegas do Mestrado, mas muito em particular à Helena, ao Paulo, ao Sérgio, à Umbelina, ao Cláudio e Gaspar, obrigada por todo o apoio ao longo destes dois anos.

Aos meus amigos, tão importantes na minha vida, agradeço os momentos que passamos, as alegrias. Ao Neca, à Nela, à Filipa, ao Hugo, à Eunice, ao Filipe, à Helena e ao Jorge, obrigada por nos terem visitado em Bragança. Ao João e ao Rafael, obrigada por terem sido tão prestáveis e por nos terem mostrado Zeive, a localidade mais bonita de Bragança!

Aos meus pais e ao meu irmão, os meus grandes pilares, agradeço o apoio e a motivação que me dão constantemente, o orgulho que mostram em tudo o que faço. O que eu sou deve-se essencialmente ao que me ensinam a ser.

Ao Ricardo agradeço ajuda que me deu na análise estatística deste trabalho, mas principalmente o companheirismo, a força que dedica aos nossos projetos e por fazer tudo parecer simples. Gosto muito de ti.

A todos os mencionados e os que ficaram por mencionar, mas que nunca são esquecidos, muito obrigada!

Resumo

A maior parte do leite de ovelha produzido destina-se ao fabrico de queijo. Dada a conjuntura atual, o elevado custo de produção e a valorização monetária da transformação do leite em queijo, é de todo relevante uma constante adaptação e inovação deste produto no sentido de responder às exigências do mercado.

O trabalho descrito na presente tese decorreu na Queijaria Vaz, na Quinta de Alvar, em Mirandela, produtora de queijo de ovelha e cabra curado, de queijo fresco de ovelha e requeijão. É vontade da empresa desenvolver um queijo de ovelha curado com características amanteigadas. Assim, definiu-se como objetivo geral, otimizar o processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado a partir de um protocolo estabelecido com base em trabalhos consultados na literatura, conjugados com a metodologia seguida no processo de fabrico dos queijos da Queijaria Vaz.

Desenvolveu-se e executou-se um plano experimental, para o fabrico de queijos de ovelha amanteigados, que consistiu em produzir queijos com dois tipos de coalhos comerciais (coalho vegetal e coalho animal) e duas temperaturas de coagulação (28 °C e 30 °C), repetindo-se o processo em dois dias. Durante a fase experimental efetuaram-se ensaios preliminares para avaliar o comportamento dos coalhos, do leite e da temperatura. Fabricaram-se um total de 16 queijos que, após 30 dias de cura, foram sujeitos a análises químicas, sensoriais e de textura, aos quais se juntaram um queijo comercial amanteigado e um queijo produzido na Queijaria Vaz.

As análises químicas revelaram diferenças significativas nos teores de gordura e proteína entre alguns queijos, mas não existiram diferenças significativas nos tempos decorridos até ao início e até ao final da coagulação entre os dois dias. Sensorialmente, os resultados obtidos por um painel de 12 provadores apontam para uma distinção entre os queijos experimentais e os restantes (queijo amanteigado comercial e queijo fabricado na Queijaria Vaz). O queijo amanteigado comercial destacou-se pela cremosidade, enquanto o queijo fabricado na Queijaria Vaz foi associado a um queijo semiduro, resultados corroborados pela análise da textura. O

queijo fabricado com coalho animal a 28 °C foi classificado como mais próximo do queijo amanteigado comercial, quer sensorialmente, quer em termos de textura.

O sucesso dos resultados obtidos não invalida, porém, a necessidade de replicar a experiência com outros coalhos comerciais de origem vegetal, analisando a sua força e centrando o foco do estudo na relação da variação do pH ao longo das várias fases de coagulação do leite, na temperatura de coagulação e na concentração do coalho.

Palavras-Chave:

Alimentação animal, Coalho animal, Coalho vegetal, Leite, Queijo, Temperatura

Abstract

The majority of the milk produced from sheep, is intended for the manufacture of cheese. Actually, the high cost of production and the economical valorisation of the transformation of milk into cheese, turn essential the constant adaptation and innovation of this product in order to respond to market demands.

The work described in this thesis took place at Queijaria Vaz, at Quinta de Alvar, in Mirandela, a cured sheep's and goat's cheese producer, and also of fresh sheep cheese and curd. The company intended to develop a cured sheep cheese with buttery characteristics. Thus, this thesis aimed to optimize the manufacturing process of a buttery sheep cheese from a protocol established based on studies reviewed in the literature, along with the methodology used in the cheese making process of the Queijaria Vaz.

It was developed and performed an experimental plan for the manufacture of buttery sheep cheese, that comprised the production of cheeses with two types of commercial curds (vegetable rennet and animal rennet) and two coagulation temperatures (28 °C and 30 °C), the process being repeated in two days. During the experimental phase, preliminary tests were developed to evaluate the behaviour of curds, milk and temperature. A total of 16 cheeses were produced and, after 30 days of curing, they were subjected to chemical, sensory and texture analysis, which joined a commercial buttery cheese and a cheese produced in the Queijaria Vaz.

Chemical analysis revealed significant differences in fat and protein contents from some cheeses, while no significant differences were found regarding the time elapsed until the beginning and until the end of the coagulation, between the two days. The results obtained by a 12 taste panellist, point a distinction between the experimental cheeses and others (commercial buttery cheese and cheese made in Quejaria Vaz). The commercial buttery cheese stood out for its creaminess, while the cheese made in Quejaria Vaz was associated with a semi-hard cheese, results corroborated by the analysis of texture. The cheese made with animal rennet at 28°C

was rated as closer to the commercial buttery cheese, both in sensory and texture levels.

The success of the results does not invalidate, however, the need to replicate the experience with other vegetable commercial curds, analysing their strength and focusing the study's effort on the relationship of pH variation throughout the several milk clotting phases, in the coagulation temperature and in concentration of the rennet.

Key-words:

Animal feed, Cheese, Coagulant rennet, Milk, Temperature, Vegetable rennet

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice	VII
Lista de Quadros	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos	2
Capítulo 2 Revisão bibliográfica “Do alimento ao queijo”	3
2.1 A alimentação dos ovinos.....	3
2.1.1 Necessidades alimentares	3
2.1.1.1 Cobrição.....	6
2.1.1.2 Gestação.....	6
2.1.1.3 Lactação.....	7
2.2 O leite	8
2.3 O queijo.....	11
2.3.1 Coagulação.....	13
2.3.1.1 Coalho vegetal e coalho animal	15
2.3.1.2 Temperatura de coagulação e pH.....	16
2.3.2 Maturação	17

2.3.2.1	Transformações gerais ao longo da maturação.....	17
2.4	O queijo amanteigado.....	19
Capítulo 3	Trabalho experimental.....	25
3.1	Enquadramento	25
3.1.1	Queijaria Vaz	25
3.2	Material e métodos	27
3.2.1	Amostragem e análises químicas da pastagem	27
3.2.1.1	Amostragem.....	27
3.2.1.2	Métodos de análise.....	27
3.2.2	Procedimento experimental.....	28
3.2.2.1	Ensaio preliminares.....	28
3.2.2.2	Ensaio principal.....	29
3.2.2.3	Ensaio complementar	32
3.2.3	Prova de análise sensorial e textura	33
3.2.4	Análise estatística.....	34
Capítulo 4	Resultados e discussão	37
4.1	Alimentação animal.....	37
4.2	Composição do leite	39
4.3	Composição do queijo	40
4.4	Ensaio preliminares.....	42
4.4.1	Ensaio 1	42
4.4.2	Ensaio 2	45
4.5	Ensaio principal.....	47
4.6	Ensaio complementar	49
4.7	Análise sensorial e textura.....	50
Capítulo 5	Conclusão.....	61
Referências.....		63

Lista de Quadros

Quadro 1 - Parâmetros definidos no processo de fabrico do queijo por alguns autores	19
Quadro 2 – Compilação das análises efetuadas aos queijos nos trabalhos de Tejada & Fernández-Salguero (2003), Prados <i>et al.</i> (2007), Galán <i>et al.</i> (2008, Galán <i>et al.</i> (2012).....	20
Quadro 3 - Tempos de coagulação (min) e temperatura de coagulação (°C) definidos por alguns autores.....	22
Quadro 4 – Siglas e números das amostras, para cada queijo, utilizados na prova de mapeamento projetivo.....	33
Quadro 5 – Siglas e números das amostras, para cada queijo, utilizados no teste triangular.....	34
Quadro 6 – Composição química dos alimentos	37
Quadro 7 - Composição do leite utilizado no fabrico dos queijos experimentais	39
Quadro 8 – Composição química dos queijos experimentais	40
Quadro 9 – Resultados do ensaio 1.....	43
Quadro 10 - Resultados do ensaio 2	45
Quadro 11 – Valores de pH dos 16 queijos experimentais medidos em 4 momentos do processo de fabrico	47
Quadro 12 – Tempo de início e tempo total de coagulação dos 16 queijos experimentais	48
Quadro 13 – Resultados dos testes <i>t</i> para comparação das médias das diferenças dos dois dias entre o tempo de início da coagulação e o tempo total de coagulação	49
Quadro 14 – Resultados do ensaio complementar	50
Quadro 15 – Somatório dos rankings por queijo por dia	55

Quadro 16 - Resultados do teste de Tukey para o 1º dia, com a respetiva análise por grupos	56
Quadro 17 – Resultados do teste de Tukey para o 2º dia, com a respetiva análise por grupos	56

Lista de Figuras

Figura 1 – Fases do ciclo reprodutivo, de ovelhas, onde a nutrição pode influenciar o sucesso reprodutivo	4
Figura 2 – Classificação da condição corporal das ovelhas	5
Figura 3 – Condição corporal da ovelha ao longo do ciclo de produção	5
Figura 4 – Etapas do fabrico do queijo	12
Figura 5 – Resumo das técnicas analíticas e de avanços tecnológicos que permitem avaliar a proteólise, a glicólise e a lipólise em produtos lácteos	18
Figura 6 – Concelho de Mirandela	26
Figura 7 - Pastagem de trigo (à esquerda), e de vegetação espontânea (à direita) na Quinta de Alvar	26
Figura 8 - Fases do primeiro ensaio preliminar	29
Figura 9 - Esquemática do fabrico dos queijos	29
Figura 10 – Várias fases do processo de fabrico dos queijos experimentais	30
Figura 11 – Banho-maria utilizado para a coagulação dos queijos	31
Figura 12 - Dessoração lenta da coalhada	31
Figura 13 – Queijos experimentais na prensa	32
Figura 14 - Queijo na câmara de maturação e a ser lavado	32
Figura 15 - Prova de análise sensorial realizada aos queijos	34
Figura 16 – Intervalos de confiança para as médias dos teores de gordura (%MS) nos queijos, para os dois dias	41
Figura 17 – Intervalos de confiança para as médias dos teores de proteína (%MS) nos queijos, para os dois dias	42

Figura 18 – Gráfico do tempo de início de coagulação em função da quantidade de leite utilizada	44
Figura 19 – Relação entre o peso da coalhada ao fim de 60 min e a quantidade de leite utilizada.....	44
Figura 20 – Valores de pH ao longo da coagulação do leite.....	46
Figura 21 – Mapeamento ao nível da discriminação.....	51
Figura 22 – Biplot das coordenadas dos produtos e dos atributos sensoriais.....	52
Figura 23 - Relação entre atributos sensoriais e análise de textura	54
Figura 24 – Coordenadas dos diferentes queijos	55
Figura 25 – Intervalo de confiança para a média do módulo de Young	58
Figura 26 – Força máxima em função do módulo de Young	59

Lista de Abreviaturas

AFR - Alimentos Alternativos

APG - Análise de Procrustes Generalizada

AAN - Azoto Aminoacídico

A28 - Queijo fabricado com coalho animal a 28 °C

A30 - Queijo fabricado com coalho animal a 30 °C

a_{30} - Consistência do gel 30 min depois da adição do coalho

a_w - atividade da água

ca. - cerca

CF - Firmeza da Coalhada

CS - Células Somáticas

GB - Gordura Bruta

GnRH - Gonadotrophin Releasing Hormone

HR - Humidade Relativa

INE - Instituto Nacional de Estatística

k_{20} - Agregação das micelas até atingirem 20 mm

LPL - Lipoproteína Lípase

MCP - Propriedades Coagulantes do Leite

MG- Matéria Gorda

MS - Matéria Seca

N - Azoto

NDF - Fibra de Detergente Neutro

NH_3N - Azoto Amoniacal

NPN - Azoto Não Proteico

pH 4.6 SN - Níveis de azoto solúvel a pH 4.6

PB - Proteína Bruta

PD - Queijo do Pingo Doce

PTA-SN - Azoto Solúvel em Ácido Fosfotúngstico

PV - Peso Vivo

QV - Queijo da Queijaria Vaz

QVC - Queijo produzido no ensaio complementar com coalho vegetal a 27 °C

RCT - Tempo de Coagulação

SN - Azoto Solúvel

TMR - Alimento completo

TN - Azoto Total

TCA-SN - Azoto Solúvel em Ácido Tricloroacético

V28 - Queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C

V30 - Queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C

Capítulo 1

Introdução

“Serra cheese has a buttery texture, which leads to spontaneous and rapid deformation upon slicing, and possesses a strong aroma and a clean, smooth, slightly acid flavor.” (Macedo et al, 1993)

1.1 Enquadramento

O sector da alimentação humana é um dos mais importantes setores económicos da Europa, sendo o leite e os seus derivados, alimentos comuns nas dietas Europeias (González-García *et al.*, 2013).

A produção de leite de ovelha, na Europa, tem vindo a ganhar importância em relação ao leite de vaca. O leite de vaca produzido em 2012 representou 89% do produzido em 1992, sendo notória uma redução acentuada entre 1992 e 2000 (FAOSTAT, 2014). Entre o ano 2000 e o ano 2012, a produção de leite de vaca manteve-se estável (~210 Mton). Quanto à produção do leite de ovelha, este aumentou 2,5% de 1992 a 2012, embora com grandes oscilações. Em Portugal, a produção de leite de ovelha em 2012 foi de 76,7% da produção verificada em 1992. Quanto à produção de leite de vaca, este aumentou 26% de 1992 a 2012 (FAOSTAT, 2014). Ressalve-se que, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE, IP, 2014) as produções de leite de vaca e de ovelha em 2013 foram respetivamente 95% e 98% do ano anterior (2012). Embora analisando as quantidades de leite produzidas em 2013, por ambas as espécies, seja claro que as quantidades de leite de vaca produzidas são muito maiores do que as de ovelha (1,8 Mton e 0,069 Mton, respectivamente), proporcionalmente denota-se, neste último ano, uma diminuição menos acentuada na produção de leite de ovelha do que no leite de vaca, em Portugal.

Devido à sua localização geográfica e condições climáticas favoráveis, em Portugal, os pequenos ruminantes, em particular os ovinos, têm um papel importante nas explorações animais tradicionais. O queijo de ovelha é fabricado em Portugal há muitos anos e é cada vez mais apreciado devido às suas características únicas de textura e *flavor*, sendo considerado um produto *gourmet* (Reis & Malcata, 2011a).

Contudo, em Portugal, um dos maiores problemas no fabrico do queijo com leite cru é o agravamento da microflora presente, uma vez que o leite normalmente não sofre pasteurização e a maior parte dos utensílios não é esterilizada, embora sejam esses mesmos microrganismos, em parte, responsáveis pelas características únicas dos queijos tradicionais Portugueses (Pereira, *et al.*, 2008).

O presente trabalho decorreu na Queijaria Vaz, na Quinta de Alvar, em Mirandela. A Queijaria, de momento, fabrica queijo de ovelha curado de pasta dura e semidura, pelo que o fabrico de um queijo de características amanteigadas é uma mais-valia para esta empresa, pelo potencial de produção de um novo produto para o mercado, havendo uma diversificação dos produtos da empresa, importante a nível económico e, ao mesmo tempo, pela valorização dos produtos lácteos da Região Transmontana. Este desafio responde às exigências de consumidores cada vez mais atentos às características organolépticas e às condições de fabrico dos produtos alimentares, e contribui para a otimização do processo produtivo do queijo, desde a alimentação ovina, até às características do leite e à composição do queijo resultante.

1.2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral, a otimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado na Queijaria Vaz, uma empresa do sector que não fabrica queijo amanteigado de ovelha. A partir de um protocolo estabelecido com base em trabalhos consultados na literatura, conjugados com a metodologia seguida no processo de fabrico dos queijos da Queijaria Vaz, pretendeu-se produzir queijos com coalho vegetal comercial de *Cynara cardunculus* e com coalho animal comercial, tendo em vista a definição do diagrama de fabrico de todo o processo conducente a um queijo com as características pretendidas.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

“Do alimento ao queijo”

“Portugal é um país de bom pasto e onde o pastoreio sempre esteve presente, seja como um meio de subsistência ou como atividade tradicional importante. Tem uma enorme variedade de queijos, de qualidade similar aos melhores do mundo, e são produzidos em todo o seu território.” (Tradifoods, 2014)

2.1 A alimentação dos ovinos

2.1.1 Necessidades alimentares

As necessidades alimentares da ovelha leiteira, à semelhança de qualquer outro animal, dependem da fase do ciclo produtivo e reprodutivo em que se encontra e dos objetivos de produção. Dado o objetivo principal ser o da produção de leite para o fabrico de queijo, o ciclo produtivo ideal consiste na obtenção de um parto por fêmea e por ano, sendo os borregos desmamados precocemente.

O ciclo reprodutivo inicia-se com o ciclo éstrico que apresenta uma duração média de 17 dias. As ovelhas apresentam o primeiro cio por volta dos 7 a 8 meses de idade, embora apenas seja recomendável a sua cobrição entre os 10 a 12 meses de idade, dependendo da condição corporal da malata (Jarrige, 1988). Os ovinos são considerados reprodutores sazonais de dias curtos, ou seja, as fêmeas apresentam ciclicidade ovárica quando o fotoperíodo diminui (Rosa & Bryant, 2003). Com efeito, a taxa de segregação da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH) aumenta com o decréscimo do fotoperíodo e, assim, aumenta a segregação das hormonas folículo-

estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que iniciam a função reprodutiva (Walton *et al.*, 2011). Contudo, a sazonalidade reprodutora depende da latitude, sendo as raças portuguesas autóctones consideradas fêmeas de ciclicidade contínua. A gestação da ovelha dura, em média, cinco meses (Blache *et al.*, 2008), sendo as necessidades alimentares mais elevadas no final da gestação, aquando do crescimento exponencial do feto, e nas gestações múltiplas. No final da gestação e nos primeiros dias após o nascimento dos borregos, ocorre a segregação do colostro, pela glândula mamária, que é essencial nas primeiras horas de vida do borrego pelas suas características imunitárias e por ser uma fonte de calor, evitando, assim, a hipotermia (Górová *et al.*, 2011). A lactação tem uma duração média de sete meses, sendo atingido o pico de produção de leite entre o primeiro e o segundo mês de lactação. O período seco dura ca. cinco meses, até ao próximo parto.

Para o sucesso de qualquer exploração de ovinos, é essencial assegurar a cobertura das necessidades alimentares dos animais de acordo com a fase do ciclo produtivo em que se encontram (Figura 1) e da sua condição corporal.

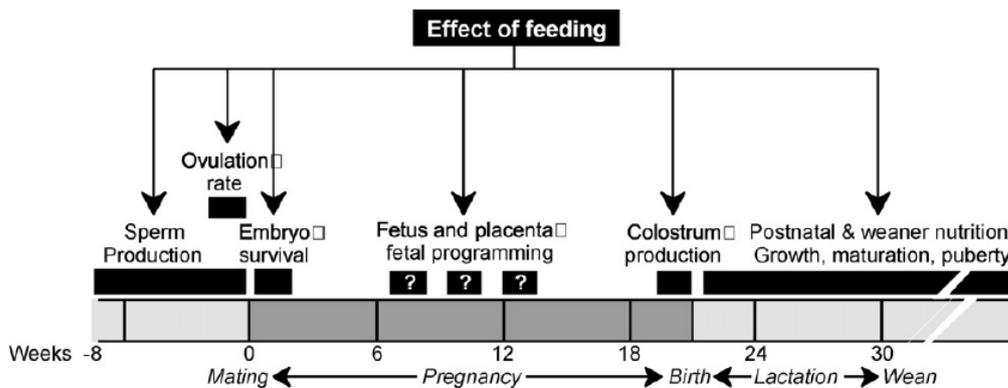


Figura 1 – Fases do ciclo reprodutivo, de ovelhas, onde a nutrição pode influenciar o sucesso reprodutivo

Fonte: Blache *et al.*, 2008

A avaliação do desenvolvimento muscular e de gordura das ovelhas é realizada, comumente, pela estimativa da sua condição corporal através da observação e palpação da zona lombar do animal, fornecendo uma ideia mais clara do seu estado físico, do que apenas através da medição do seu peso (Figura 2; Vatankhah & Salehi, 2010).

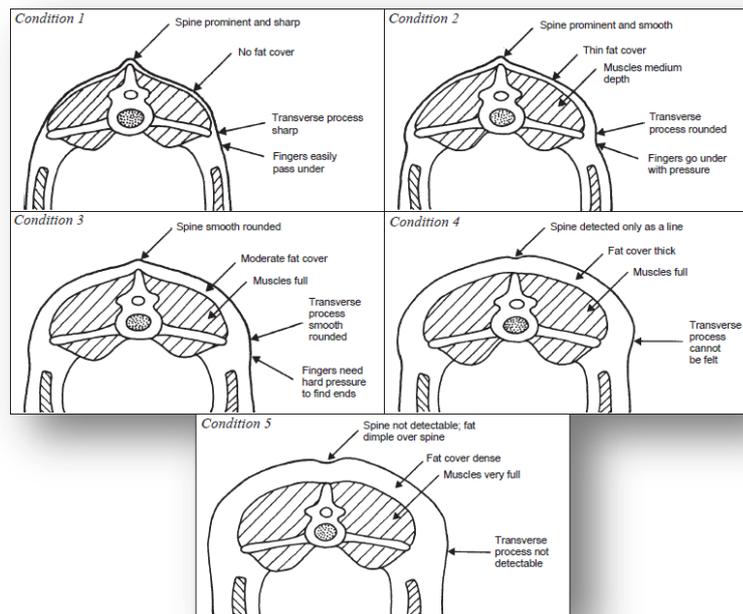


Figura 2 – Classificação da condição corporal das ovelhas

Adaptado de: Thompson & Meyer (1994)

Embora seja bem conhecido que a condição corporal ótima para cada ovelha, mediante as fases do ciclo anual em que se encontra, varia de acordo com a raça (Vatankhah *et al.*, 2012), na Figura 3 apresenta-se um esquema geral de evolução da condição corporal ao longo do ciclo produtivo.

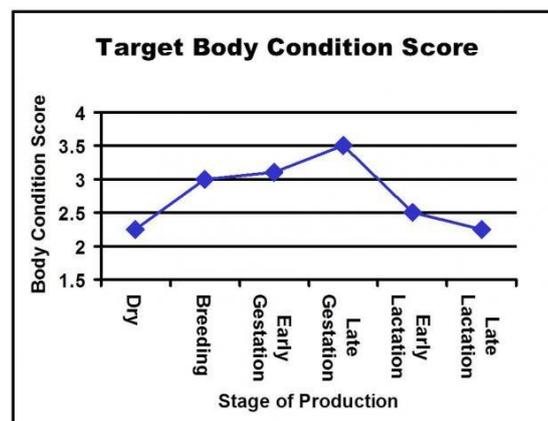


Figura 3 – Condição corporal da ovelha ao longo do ciclo de produção

Fonte: <http://www.extension.org>

A cobertura das necessidades alimentares da ovelha permite minimizar os custos de produção, garantindo a produção ótima de leite e de borregos viáveis e vigorosos na altura do desmame; tudo isto, contribuindo para uma maior rentabilidade económica da exploração (Jarrige, 1988; Abdel-Mageed & El-Maaty, 2012).

As necessidades nutricionais de ovelhas leiteiras estão amplamente descritas na literatura (e.g., AFRC, 1993; INRA, 1997), não sendo objetivo deste trabalho detalhá-las. Assim sendo, nas secções revistas passar-se-ão em revista, de forma breve, as necessidades alimentares em fases críticas do ciclo produtivo da ovelha.

2.1.1.1 Cobrição

A condição corporal da ovelha nas semanas que antecedem a época de cobrição e na época de cobrição propriamente dita, relaciona-se com o seu desempenho reprodutivo, uma vez que influencia a sua fertilidade e produtividade (Njoya *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006; Vatankhah & Salehi, 2010; Abdel-Mageed & El-Maaty, 2012) e a taxa de ovulação (Robinson *et al.*, 2006; Abdel-Mageed & El-Maaty, 2012), aumentando a probabilidade de ocorrência de partos múltiplos (McWilliam *et al.*, 2004).

Se as ovelhas se encontram em balanço energético negativo, nas semanas que antecedem a época de cobrição, é recorrente o uso do “*flushing*” que consiste num reforço da alimentação das ovelhas, melhorando a sua condição corporal (Blache *et al.*, 2008). Um suplemento nutricional afeta diretamente a fertilidade, pelo fornecimento de nutrientes necessários à produção de oócitos, ovulação e sobrevivência do embrião com o conseqüente estabelecimento da gestação, e indiretamente através da ação que os nutrientes têm na circulação de hormonas e em outros metabolitos necessários à reprodução (Robinson *et al.*, 2006). Realce-se, no entanto, que os ovários só são estimulados através da dieta desde que esta consiga aumentar a quantidade de energia e/ou proteína imediatamente antes da ovulação (Blache *et al.*, 2008).

Com vista ao aumento da eficiência reprodutiva é, então, essencial garantir uma condição corporal ótima no momento da cobrição que, segundo alguns autores é de 3 (Figura 2).

2.1.1.2 Gestação

Os cinco meses de gestação das ovelhas podem ser divididos em três períodos distintos, quanto às necessidades nutritivas, correspondendo a diferentes fenómenos fisiológicos (Jarrige, 1988).

Na fase inicial da gestação (primeiro mês), o embrião desenvolve-se livremente na cavidade uterina, fixando-se por volta do 16º dia à parede deste órgão. Qualquer alteração do ambiente pode levar à morte do embrião pelo que deve ser mantida a dieta alimentar que acompanha a ovelha na fase de cobrição. No segundo e terceiro

meses, o feto prossegue o seu desenvolvimento, mas, como o seu crescimento diário é pequeno, as necessidades correspondentes são negligenciáveis. É, no entanto, durante estes dois meses que se forma e se desenvolve definitivamente a placenta e que os tecidos nervosos e ósseos do feto têm um crescimento mais elevado, razão pela qual a alimentação da ovelha deve ser ligeiramente superior às suas necessidades, prolongando-se assim a duração do período de reconstituição das reservas. Os maiores cuidados alimentares surgem nos últimos meses, onde as necessidades da ovelha aumentam e a sua capacidade de ingestão decresce devido ao crescimento exponencial do(s) feto(s) (Jarrige, 1988). A alimentação deve, assim, ser adequada em energia e em proteína para que se garanta o ótimo crescimento do feto e se assegurem as necessidades da fêmea, o crescimento da glândula mamária e um bom rendimento em colostro e leite (Ocak *et al.*, 2005).

Com efeito, no final da gestação, o tecido secretor da mama desenvolve-se ou regenera-se. É do sangue que são retirados os nutrientes necessários à formação dos constituintes do leite, tais como a glucose para formação da lactose, os ácidos aminados para as proteínas, o acetato, o butirato e os ácidos gordos de cadeia longa para as matérias gordas, a água e os sais minerais (Jarrige, 1988).

2.1.1.3 Lactação

A lactação representa a fase do ciclo produtivo onde as necessidades das ovelhas são mais elevadas (Jarrige, 1988). As necessidades em proteína e energia durante a lactação são determinadas considerando as necessidades para manutenção, para produção de leite e para a eventual reposição das reservas corporais (Sormunen-Cristian *et al.*, 1997). As necessidades alimentares variam no decurso da lactação, acompanhando a curva de produção de leite que atinge o pico de produção entre o primeiro e o segundo mês. Na fase inicial da lactação, a capacidade de ingestão da ovelha não é máxima, promovendo a mobilização de reservas corporais para manter a crescente produção de leite. A excessiva mobilização de reservas deve ser evitada para diminuir a incidência de patologias, tais como a cetose. Para isso, é importante garantir que a ovelha não chegue ao parto com uma condição corporal excessiva que, a ocorrer, provocará uma diminuição ainda mais acentuada da sua capacidade de ingestão. Adicionalmente, para assegurar um maior fornecimento de nutrientes a um animal com diminuída capacidade de ingestão, a dieta a fornecer deve apresentar uma densidade energética mais elevada (Jarrige, 1988).

A partir do pico de produção de leite, as necessidades alimentares da ovelha diminuem em simultâneo com o aumento da sua capacidade de ingestão. Assim,

nesta fase, o regime alimentar pode apresentar uma densidade energética mais baixa, mas deve permitir a reposição das reservas corporais que foram utilizadas no início da lactação. Saliente-se, também, que a cobertura deve ser realizada no final da lactação, início do período seco de modo a ser cumprido o objetivo de obtenção de um parto por ano (Jarrige, 1988).

Caso as reservas corporais não tenham sido repostas até ao final da lactação, deverão sê-lo no período seco. Contudo, muita atenção deve ser dada à condição corporal no final do período seco. Isto porque na fase final da gestação, a capacidade de ingestão da ovelha diminui e a precoce mobilização de reservas pode aumentar a probabilidade de ocorrência de toxémia de gestação, sobretudo em partos gemelares (Duehlmeier *et al.*, 2011). Por outro lado, a condição corporal ao parto, como já referido, não deve ser elevada para não prejudicar a capacidade de ingestão após o parto.

2.2 O leite

Quase a totalidade do leite de ovelha produzido, na União Europeia, tem como finalidade o fabrico de queijo. Por este facto, uma boa caracterização do leite de ovelha cru permite aos produtores de queijo otimizarem o processo de fabrico do queijo de acordo com as características tecnológicas do leite e as características pretendidas do queijo (Amigo *et al.*, 2000).

A composição do leite depende de fatores como a raça do animal, a alimentação e o meio ambiente (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Os teores em gordura, proteína e células somáticas (CS) do leite, são os principais responsáveis pelas suas propriedades de coagulação (Pulina *et al.*, 2006).

É bem conhecido que a gordura é o componente do leite que mais alteração sofre com a manipulação da dieta alimentar (Jenkins & McGuire, 2006), podendo o teor em gordura variar entre 3,60 g/100g e 9,97 g/100g (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

Ao longo da lactação, o teor em gordura do leite varia. No início da lactação, o teor em gordura é, geralmente, menor devido à maior quantidade de leite produzido e à maior proporção de alimentos concentrados na dieta. No final da lactação, quando os níveis de produção de leite diminuem e a dieta se torna mais fibrosa, o teor em gordura aumenta (Sampelayo *et al.*, 2007).

Sendo a ovelha um animal ruminante, o seu leite apresenta uma elevada percentagem de ácidos gordos saturados (65% dos ácidos gordos totais), podendo ser visto por alguns consumidores como um alimento menos saudável (Zhang *et al.*, 2006). Contudo, além do teor em gordura, é possível, ainda, com recurso a determinadas estratégias alimentares, alterar o perfil em ácidos gordos da gordura do leite (Pulina *et al.*, 2006). A título de exemplo, dietas com maior teor em ácidos gordos polinsaturados, (alcançado pela incorporação de *Camelina sativa*, Szumacher-Strabel *et al.*, 2011), podem aumentar a proporção de ácidos gordos insaturados e dos seus isómeros e diminuir o teor em ácidos gordos saturados.

A gordura encontra-se presente no leite sob a forma de glóbulos em suspensão, que podem variar entre 0,1 e 10 μm no seu diâmetro e a sua estabilidade depende da membrana desses glóbulos. Esta membrana é composta, principalmente, por fosfolípidos e proteínas e pode apresentar uma espessura de 8 a 10 μm (Ye *et al.*, 2011). Tratamentos como pasteurização, ultrafiltração, aquecimento, entre outros, alteram o tamanho dos glóbulos de gordura e modificam as suas membranas. Por este facto, a quantidade de gordura no leite interfere na textura do queijo, e a cinética de interação entre a gordura-proteína na membrana dos glóbulos de gordura e o seu aspeto estrutural influenciam as propriedades reológicas da coalhada e o seu comportamento durante a sinérese (exsudação do soro durante o processo de gelificação) (Lopez & Dufour, 2001).

As proteínas do leite, devido ao seu importante papel na alimentação e fisiologia humanas, sempre foram alvo de grande interesse e estudo (Michaelidou, 2008). A proteína mostra uma variação muito menor com a natureza da dieta em comparação com a gordura (Jenkins & McGuiret, 2006). Os produtos lácteos são associados a um produto com elevado teor de proteína, sendo que o conteúdo em proteína bruta no leite de ovelha pode variar de 4,75 g/100g a 7,20 g/100g. Cerca de 95% do azoto (N) no leite apresenta-se na forma de proteína, sendo que o restante se encontra sob a forma de ureia, creatina, glucosamina e amónia, filtradas diretamente do sangue para o leite. A síntese proteica ocorre na glândula mamária a partir dos aminoácidos absorvidos (McDonald *et al.*, 2011).

A fração proteica do leite é constituída pelas caseínas ou proteínas insolúveis, e pelas proteínas do soro ou proteínas solúveis. As proteínas insolúveis são a caseína α e suas variantes (α_{s1} , α_{s2} , α_{s3} ,... α_{s6}), a caseína β , a caseína k e a caseína y, que se apresentam sob a forma de micelas de fosfocaseinato de cálcio, e que são facilmente degradadas por todas as enzimas proteolíticas. As proteínas solúveis dividem-se em

albuminas (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e seroalbumina), globulinas e enzimas (Sá & Barbosa, 1990).

Variações nas proteínas do soro e nas caseínas podem alterar as propriedades nutricionais do leite e dos subprodutos lácteos. Vários estudos têm sido feitos no sentido de averiguar as consequências do polimorfismo genético das proteínas sobre a digestão gastrointestinal (Michaelidou, 2008) e sobre as características tecnológicas do leite no sentido de melhorar a qualidade do queijo de ovelha (Amigo et al., 2000). O comportamento das caseínas na coagulação do leite será detalhado na secção 2.3 do presente trabalho.

A mastite é uma infeção da glândula mamária com um efeito negativo no rendimento e composição do leite (Forsbäck *et al.*, 2011), sendo considerada a patologia com maior impacto económico negativo nas explorações leiteiras (Spanu *et al.*, 2011). Dependendo da sua natureza, as mastites podem ser detetadas por alterações visuais no leite ou no úbere, ou pelo aumento de CS no leite (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007; Spanu *et al.*, 2011).

Para além do aumento de CS no leite, que contribui para o aumento da proteólise e da lipólise durante a ordenha e durante o armazenamento do leite, a mastite é também responsável pelo aumento da proteína do soro e pela diminuição dos teores em lactose e em caseína (Forsbäck *et al.*, 2011). Ressalve-se que a lactose é o principal hidrato de carbono do leite de ovelha (Park *et al.*, 2007), sintetizada a partir da glucose na glândula mamária (Park *et al.*, 2007), com participação da α -lactoalbumina (Moioli *et al.*, 1998). Adicionalmente, a lactose favorece a absorção intestinal de cálcio, magnésio e fósforo e a utilização de vitamina D (Campbell & Marshall, 1975).

A contagem de CS do leite possibilita a distinção de glândulas mamárias saudáveis de infecionadas, sendo cada vez mais usada como indicador da higiene e saúde do animal e do rebanho (Jaeggi *et al.*, 2003). O teor em CS no leite de ovelha pode variar de $(0,25 \text{ a } 1,0) \times 10^6$ células/mL (Berthelot *et al.*, 2006).

Relativamente ao queijo, pouco se sabe da relação que o teor em CS do leite tem na qualidade do produto final (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007). Pulina *et al.* (2006) referem que um aumento das CS no leite de ovelha origina uma acentuada redução do rendimento queijeiro, com aumento da humidade presente na coalhada e no próprio queijo e diminuição da quantidade de caseína presente. Raynal-Ljutovac *et al.* (2007) fizeram uma revisão de trabalhos experimentais que estabelecem a relação entre o teor em CS e a composição e características sensoriais de queijos. Esses autores

verificaram algumas diferenças entre trabalhos, para os mesmos parâmetros. Por exemplo, Pirisi *et al.* (2000) não obtiveram relação entre o teor em CS do leite e as características reológicas, a lipólise e a proteólise secundária em queijos tipo semiduro fabricados com leite cru. Por outro lado, Jaeggi *et al.* (2003) verificaram diferenças na composição de queijos fabricados a partir de leites com diferentes teores em CS. A nível sensorial, Pirisi *et al.* (2000) não encontraram diferenças entre os queijos, mas Jaeggi *et al.* (2003) reportaram um maior número de defeitos texturais nos queijos fabricados com um conteúdo em CS mais elevado.

2.3 O queijo

É a riqueza da composição do leite que determina a sua capacidade de transformação em queijo sendo um fator importante na exploração ovina dado que o rendimento queijeiro é um parâmetro com peso económico (Othmane *et al.*, 2002).

A variação sazonal da composição do leite de ovelha, sobretudo gordura e proteína, deve-se, maioritariamente, à fase da lactação, ao regime alimentar (Perea *et al.*, 2000, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008) e à raça do animal, tornando difícil a padronização dos queijos (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Comparativamente ao leite de vaca e cabra, o leite de ovelha apresenta um teor mais elevado em sólidos totais, em geral, e em gordura, em particular, tornando-o mais adequado para o fabrico de queijo (Zhang *et al.*, 2006).

De uma forma geral para se fabricar queijo seguem-se várias etapas representadas na Figura 4. Inicia-se com a receção do leite de ovelha cru que sofre filtração, para lhe serem retirados quaisquer resíduos indesejáveis. O leite é posteriormente transferido para a(s) cuba(s) de coagulação e será aquecido até se atingir a temperatura pretendida, e na qual se adiciona o coalho e ocorre a devida coagulação. Após a adição do coalho o leite mantém-se em repouso até se formar a coalhada. Neste ponto dá-se o corte da coalhada e novo repouso, de duração curta. No final deste período de descanso faz-se a dessoração da coalhada, ou seja, retirar-lhe o soro (que poderá ser aproveitado para fabrico de requeijão). Transfere-se a coalhada, já sem soro, para a mesa de apoio onde é colocada em moldes, levando-os posteriormente à prensa. Os moldes são prensados de ambos os lados, virando-se portanto a coalhada a meio do tempo definido para a prensagem.

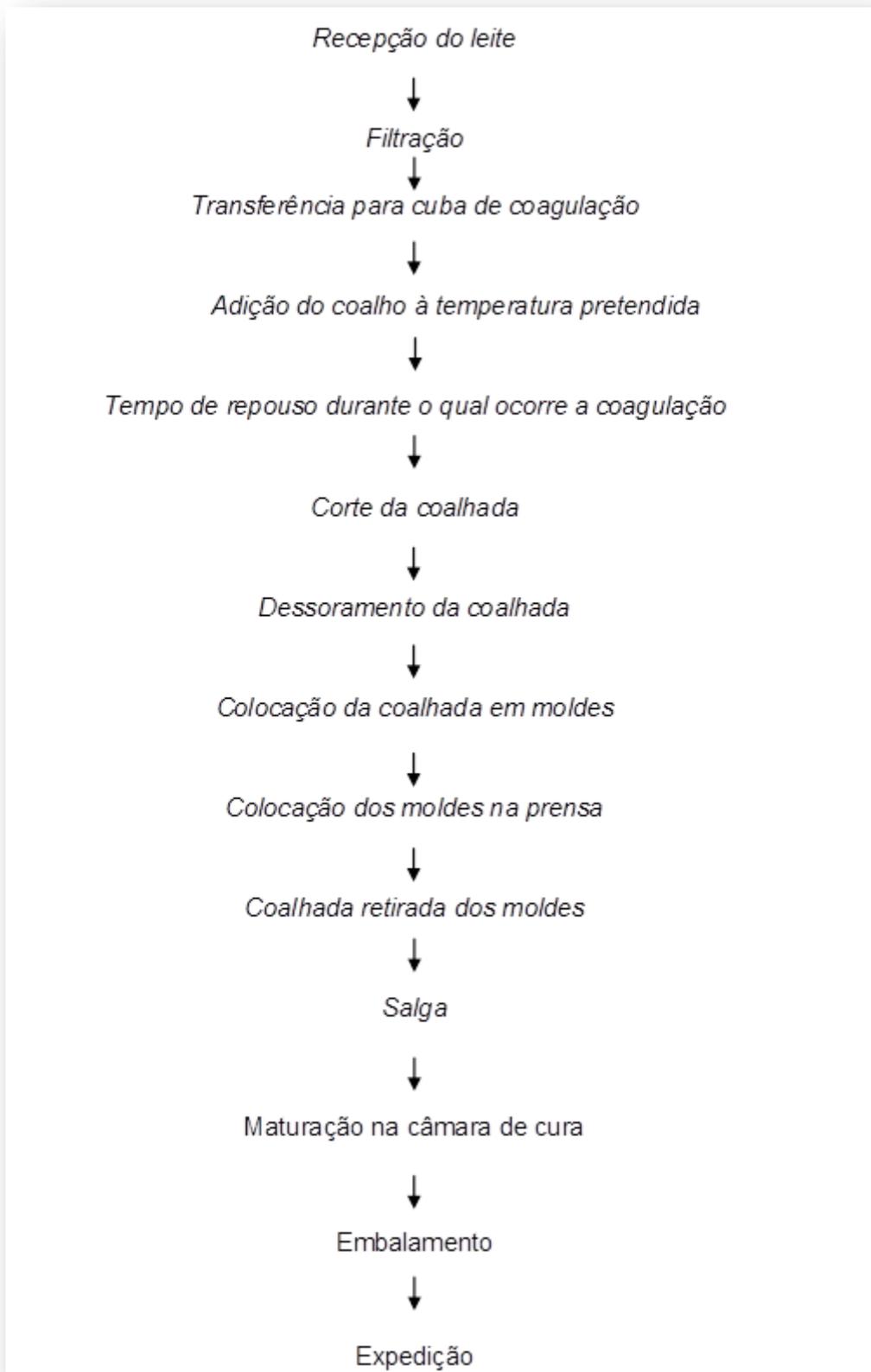


Figura 4 – Etapas do fabrico do queijo

Adaptado de: Reis & Malcata (2007)

Após esta etapa a coalhada já bem compacta é retirada dos moldes, envolvida em sal e colocada nas câmaras de cura, onde ocorre a maturação dos queijos. Consoante o tipo de queijo que se pretende e o método utilizado, o queijo pode ser lavado e virado várias vezes por semana, podendo ainda ser colocado em diferentes câmaras de cura, submetidas a diferentes temperaturas e humidades relativas.

2.3.1 Coagulação

As proteínas presentes no leite encontram-se sob a forma de uma solução coloidal. A fração proteica envolvida na coagulação do leite é a fração de caseínas, e representam ca. de 80% das proteínas do leite. São as únicas com capacidade coagulante e o rendimento em queijo depende não só da sua quantidade, como do tipo de caseína (Moioli *et al.*, 1998). Numa revisão de vários trabalhos científicos que analisaram o genoma como forma de melhorar as produções de leite em ovelhas e cabras, verificou-se que o leite de ovelha com o genótipo AB da β -lactoglobulina tem um conteúdo maior de proteínas e gordura enquanto que o alelo D da caseína α_{s1} , variante “Welsh”, contém um teor de proteína e gordura mais baixo (Moioli *et al.*, 1998). Essa revisão aponta, ainda, menores teores de N total e de caseínas no leite, maior tempo de coagulação do leite e coalhadas mais suaves em ovelhas com a variante “Welsh”. Já a variante A da β -lactoglobulina apresenta uma maior aptidão para o fabrico de queijo, no entanto a variante B também tem efeito no tempo de coagulação.

As micelas de caseína têm, na sua constituição, submicelas de caseína agregadas entre si por meio de ligações de cálcio e fosfato. A estrutura da micelas é composta no seu interior pelas α - e β -caseínas hidrofóbicas e na superfície pela k-caseína (Osintsev & Qvist, 2004).

A coagulação, isto é, a mudança na estrutura das micelas de caseína (Benedito *et al.*, 2002), pode ser enzimática (pelas enzimas proteolíticas), ácida (através da diminuição do pH do leite) ou mista (conjugação das duas). Dado que na componente experimental do presente trabalho foi utilizada a coagulação enzimática, será, apenas, esta que se detalhará.

A coagulação enzimática é composta por três fases distintas que se sobrepõem, a proteólise, a agregação e a gelificação (McMahon & Brown, 1984). As duas primeiras fases são compostas pela destabilização da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da k-caseína libertando o segmento 106-169 hidrofílico caseinomacropéptido (Cooper *et al.*, 2010) que irá fazer parte do soro. O segmento 1-105 ou para-caseína agrega-se formando o gel ou coalhada (Sá & Barbosa, 1990). A gelificação do leite é uma fase

muito importante no fabrico do queijo. Marca o final da coagulação do leite com o momento do corte da coalhada, podendo influenciar o rendimento em queijo de uma forma bastante significativa (Budelli *et al.*, 2014). Se a coalhada é cortada quando se encontra muito mole, a perda de gordura e formação de partículas finas de coalhada resultam num baixo rendimento em queijo. Se, pelo contrário, a coalhada é cortada muito firme, a sinérese é atrasada, resultando num queijo com elevado teor de humidade, obrigando a um maior tempo de maturação do queijo (Benedito *et al.*, 2002).

Nájera *et al.* (2003) referem que o processo de coagulação do leite depende da concentração de coalho utilizada, da temperatura, do pH e da concentração em cálcio. O aumento da temperatura torna mais rápida a formação da coalhada, com maior interação da parte hidrofóbica nas fases de agregação, gelificação e sinérese da coagulação do leite (McMahon *et al.*, 1984). O cálcio tem um papel importante na coagulação enzimática, uma vez que esta só acontece na presença de sais de cálcio (Sá & Barbosa, 1990). Com efeito, na indústria queijeira, é recorrente a adição de cloreto de cálcio ao leite, uma vez que melhora a sua textura e o seu rendimento. A adição de cálcio ao leite provoca a redução do pH no leite devido à troca de Ca^{2+} por H^+ , aumenta a taxa de reação enzimática e reduz o tempo de coagulação do leite (Lucey & Fox 1993; Sandra *et al.*, 2012). No fabrico de queijos com conteúdo de cálcio elevado e elevado valor de pH ocorre um nível de agregação de proteínas mais elevado do que em queijos com conteúdo baixo em cálcio e baixo valor de pH (Pastorino *et al.*, 2003). À medida que o conteúdo em cálcio aumenta, estes agregados tornam-se maiores e mais densos, aumentando a quantidade de soro na matriz proteica. Porém a valores de pH superiores a 5,0 o conteúdo em cálcio controla a funcionalidade do queijo, que a baixas concentrações originam queijos mais suaves e moles (McMahon *et al.*, 2005).

As propriedades coagulantes do leite (MCP) têm sido alvo de estudo, principalmente no sentido de melhorar as suas características e, por conseguinte, a eficiência das explorações leiteiras nos países onde uma grande parte da produção de leite se destina ao fabrico de queijo (Geary *et al.*, 2010; Bittante, 2011). As MCP dos pequenos ruminantes, principalmente do leite de ovelha, são pouco conhecidas, embora a produção de leite de ovelha tenha grande importância económica. As MCP são utilizadas para conhecer a aptidão do leite para o fabrico de queijo, as suas características tecnológicas e prever o seu rendimento em queijo (Pazzola *et al.*, 2014)

As principais MCP estudadas são o tempo de coagulação (RCT), que se define pelo tempo que decorre desde a adição do coalho ao leite até ao início da coagulação,

a firmeza da coalhada (CF), a consistência do gel 30 minutos depois da adição do coalho (a_{30} , mm) e o tempo de agregação das micelas até atingirem 20 mm (k_{20} , min) (Pretto *et al.*, 2011; Bittante *et al.*, 2012; Pazzola *et al.*, 2014).

2.3.1.1 Coalho vegetal e coalho animal

O extrato bruto enzimático extraído do abomaso dos animais jovens foi o primeiro coalho utilizado no fabrico do queijo (Tavaria *et al.*, 2001). É, principalmente, constituído por duas enzimas ácidas proteolíticas, a quimosina e a pepsina (Moschopoulou, 2011). A quimosina (EC 3.4.23.4) foi a primeira enzima estudada seguida da pepsina (EC 3.4.23.1). Quanto mais novo for o animal, mais elevado é o teor de quimosina presente no coalho, sendo este influenciado pela dieta (Férrandez-Salguero *et al.*, 2003).

Com o aumento significativo da produção de queijo em todo o mundo, a diminuição de bezerros abatidos nos anos 70 e o conseqüente aumento do preço do coalho animal, muitos trabalhos de investigação procuraram proteases de fontes alternativas com potencial uso no fabrico de queijo (Férrandez-Salguero *et al.*, 2003; Bornaz *et al.*, 2010).

Os coalhos de origem vegetal têm sido bastante usados, principalmente a um nível artesanal (Silva & Malcata, 2005), em pequenas explorações leiteiras e quintas agrícolas (Roseiro *et al.*, 2003). Extratos de *Cynara spp.* (vulgo cardo) são utilizados há séculos na Península Ibérica, no fabrico de queijo, e aparentam uma afinidade específica para o leite de ovelha (Roseiro *et al.*, 2003). Sabe-se que, apesar da sua elevada atividade proteolítica, *Cynara cardunculus* pode ser um substituto dos coalhos de origem animal, para o fabrico de queijos amanteigados (Sá & Barbosa, 1990). Com efeito, das flores de *Cynara cardunculus*, é possível isolar cardosinas (proteases aspárticas) que apresentam o mesmo comportamento do que outras enzimas coagulantes do leite, na clivagem da k-caseína (Macedo *et al.*, 1993b; Picon *et al.*, 1999).

Hoje em dia, são vários os coalhos comerciais existentes que diferem na origem (animal, vegetal, microbiana ou recombinante de microrganismos geneticamente modificados) e no seu estado físico (líquido, pó ou sólido; Addis *et al.*, 2008). Este forte aumento de disponibilidade de coalhos e coagulantes de leite comerciais, torna necessário o conhecimento da sua força de modo a adequar o tipo e a concentração de enzimas consoante o tipo de queijo que se pretende fabricar (Tabayehnejad *et al.*, 2012). Com efeito, a concentração de coalho, mediante as

características do leite a utilizar no fabrico dos queijos, é uma das principais dificuldades a ajustar numa queijaria.

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar o conteúdo total de proteases dos coalhos (Addis et al., 2008). Soxhlet (1877) definiu a força do coalho como o volume de leite que pode ser coalhado por uma unidade de volume de coalho em 40 min a 35 °C. Dada a dependência da força do coalho com a variação da qualidade do leite, a força de coalho assim determinada apresentava algumas limitações. Posteriormente, Berridge (1957) propôs a determinação da força do coalho como a quantidade capaz de coagular 10 mL de leite padrão em 100 s a 30 °C. Recentemente, foi aprovada uma norma para a determinação da força de coalho de origem animal, de cordeiro ou cabrito (IDF, 2006), e desenvolvido um biossensor, que apresentaram bons resultados na análise da força de coalhos de origem animal (Panagopoulou *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Temperatura de coagulação e pH

A temperatura de coagulação influencia significativamente o tempo de coagulação, a CF, a consistência do gel e a taxa de formação do gel (Nájera *et al.*, 2003).

Estudos realizados mostram que o aumento da temperatura aumenta a taxa de coagulação, com o aumento da taxa de proteólise da k-caseína, taxa de incremento da CF e taxa de formação do gel (Kowalchuk & Olson, 1977; Gunasekaran & Ay, 1995).

Bencini (2002) estudou os fatores que afetam as MCP no leite de ovelha e comparou-os com o leite de vaca. Concluiu que, o aumento da temperatura aumenta a taxa de coagulação e a k_{20} em ambos os leites, mas a a_{30} mantém-se igual na ovelha e aumenta na vaca, podendo esta observação dever-se ao facto do coalho ter atividade máxima quando a temperatura se aproxima da temperatura corporal dos vitelos e dos cordeiros. Relativamente à redução do pH, o mesmo autor verificou que a taxa de coagulação diminui e o a_{30} aumenta no leite de ambos os animais; a k_{20} mantém-se igual no leite de ovelha e diminui no leite de vaca. Bencini (2002) justifica este resultado referindo que k_{20} representa o tempo de agregação das micelas após a clivagem da k-caseína pelo coalho, e esta velocidade de agregação depende da concentração molar de micelas de caseína que, por sua vez, aumenta a probabilidade das micelas se agregarem. Uma vez que o leite de ovelha apresenta maior concentração de micelas de caseína, a k_{20} foi mais rápida e menos afetada pelo pH neste leite.

2.3.2 Maturação

2.3.2.1 Transformações gerais ao longo da maturação

O sabor e textura finais do queijo devem-se a um conjunto de acontecimentos bioquímicos, químicos e microbiológicos ocorridos durante a fase de maturação (Irigoyen *et al.*, 2001). Os processos bioquímicos são: (1) proteólise; (2) lipólise; e (3) glicólise (Trujillo *et al.*, 2002).

A proteólise é o processo bioquímico mais importante da maturação (Fox, 1989), contribuindo para uma textura mais macia nos queijos (McSweeney, 2004). Este processo inicia-se com a coagulação do leite e continua até a maturação do queijo (Rodrigues *et al.*, 2012).

Ao longo da maturação ocorre a degradação de proteínas, lípidos e lactose residual em produtos primários (péptidos, aminoácidos, tióis, tioéster, ácidos gordos, ésteres, ácido láctico, acético e propiónico, dióxido de carbono e álcoois) e posteriormente em secundários (Sousa *et al.*, 2001). Durante a proteólise, as peptidases quebram as ligações peptídicas e os fragmentos de proteínas, ocorre uma diminuição da atividade da água (a_w) com formação de grupos amina e carboxilo, e dá-se um aumento dos valores de pH que gera a libertação de compostos sápidos aquando da mastigação (Barrett *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2001). Fox (1989) refere que “a proteólise pode ser avaliada pela monitorização da libertação dos grupos amina e carboxilo”.

As peptidases e as proteases, enzimas que catalisam a proteólise durante a maturação dos queijos, podem ter proveniência do coalho, do leite, de culturas de bactérias lácticas de arranque, culturas de bactérias lácticas adjuntas, culturas secundárias e peptidases e proteases adicionadas ao leite ou à coalhada para acelerar a maturação dos queijos (Sousa *et al.*, 2001; McSweeney, 2004).

É comum considerar a proteólise como proteólise primária e proteólise secundária. A proteólise primária, no queijo, pode ser definida como as alterações que ocorrem na β -, α_1 -, α_2 - e γ - caseína e nos peptídeos que podem ser detetadas por métodos eletroforéticos. Os produtos resultantes da proteólise secundária incluem os peptídeos, proteínas e aminoácidos solúveis na fase aquosa do queijo e são extraídos como a fração solúvel em água (Rank *et al.*, 1985).

A glicólise é definida como a degradação da lactose. Esta depende das bactérias lácticas de arranque e da sua via fermentativa. A lactose é degradada originando pequenos ácidos orgânicos como, por exemplo, ácido láctico, ácido

propiónico, ácido cítrico e ácido acético. Outros açúcares, também presentes no leite, são usados como substratos fermentativos, nomeadamente a galactose, a glucose e a sacarose (Rodrigues *et al.*, 2012). A glucose é oxidada em piruvato pela rota glicolítica de *Embden Meyerhof* (Marilley & Casey, 2004).

A lipólise pode ser compreendida como a acumulação de ácidos gordos livres durante a maturação dos queijos, com a maior parte dos ácidos gordos a ser libertada a partir dos triglicerídeos (Murtaza *et al.*, 2014). A lipólise é um importante acontecimento bioquímico que ocorre na maturação do queijo. Os ácidos gordos livres são percursores importantes das reações catabólicas que originam compostos voláteis e contribuem para o *flavor* do queijo. As lipases e esterases são as enzimas responsáveis pela lipólise e podem ser distinguidas (1) pelo comprimento da cadeia de acil-éster hidrolisado, (2) natureza físico-química do substrato e pela (3) cinética enzimática. Jensen (1964) refere que a lipólise pode provocar sabor a ranço nos queijos, derivado da acumulação de ácidos gordos de cadeia curta, como o ácido butírico, aquando da hidrólise dos triglicerídeos pelas lipases.

Na Figura 5 apresenta-se, de forma esquemática, um resumo das técnicas analíticas mais comuns e dos avanços tecnológicos mais recentes, para a avaliação de parâmetros que permitam descrever a proteólise, glicólise e lipólise em produtos lácteos.

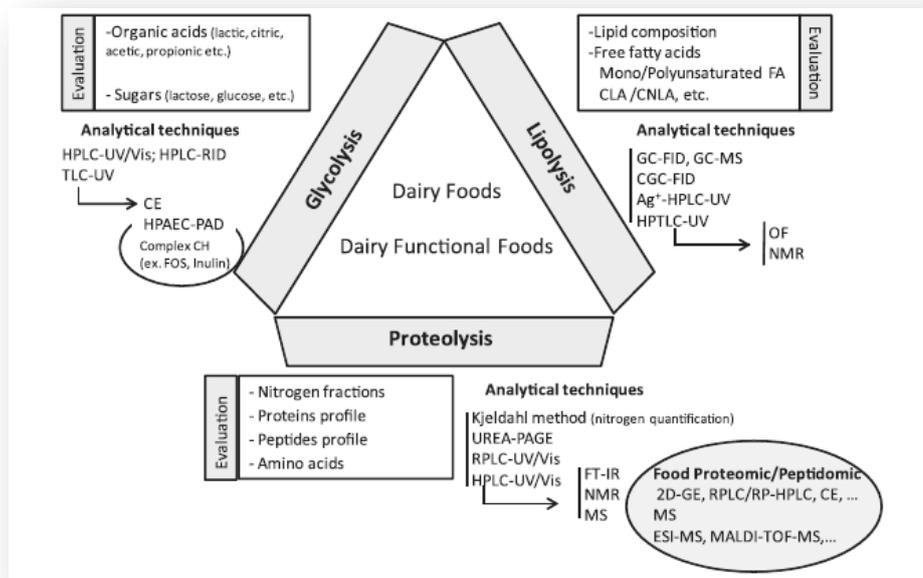


Figura 5 – Resumo das técnicas analíticas e de avanços tecnológicos que permitem avaliar a proteólise, a glicólise e a lipólise em produtos lácteos

2.4 O queijo amanteigado

Embora o objetivo principal não seja o fabrico de queijo amanteigado, na literatura encontram-se vários trabalhos desenvolvidos para avaliar o efeito da origem do coalho (animal ou vegetal) nas características químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais dos queijos produzidos, havendo sempre uma referência ao queijo amanteigado produzido no nosso país. Assim, no sentido de conhecer as características das etapas do fabrico de queijo que promovem uma textura amanteigada, far-se-á um resumo da metodologia e resultados obtidos nesses trabalhos. No Quadro 1 apresentam-se os parâmetros definidos no processo de fabrico do queijo por alguns autores.

Quadro 1 - Parâmetros definidos no processo de fabrico do queijo por alguns autores

Autor	Preparado enzimático	Coalho	Concentração (g/100L)	Tempo de coagulação	Temp. de coagulação (°C)	Condições da câmara de maturação		Dias de análise			
						Temp. (°C)	Humidade relativa (%)				
Tejada & Fernández-Salguero (2003)	Sim	Vegetal	20	60	29±1°C	11	85	2, 25, 30, 60, 90			
		Animal	2,5								
Prados <i>et al.</i> (2007)		Vegetal	n.d.	60							
		Animal									
Galán <i>et al.</i> (2008)		Animal	2,5	55							
		Vegetal (PVC)	21								
		Vegetal (2PVC)	42					40			
Galán <i>et al.</i> (2012)		Vegetal	21	n.d.				10	29±1°C	85	2, 30, 60, 120, 180, 240
		Animal	2,5								
		Mistura	50:50								

n.d.- não definido

Todos os autores avaliaram o efeito da natureza do coalho – animal e vegetal -, mas a concentração utilizada variou muito entre estudos, desde cerca de 2 g até 42 g de coalho por 100 L de leite, sendo que Galán *et al.* (2012) avaliaram, também, a mistura de coalhos de diferente origem. De igual modo, o tempo de coagulação definido não foi igual entre estudos, embora a variação não tenha sido elevada (60 min, Tejada & Fernández-Salguero (2003) e Prados *et al.* (2007); 55 min para o coalho animal e para o coalho vegetal (21 g/100 L; PVC) e 40 min para o coalho vegetal (42 g/100 L; 2PVC; Galán *et al.*, 2008). A temperatura de coagulação foi, em todos os estudos, de 29±1 °C, sendo a temperatura e a humidade relativa da câmara de

maturação de 11 °C (10 °C no estudo de Galán *et al.*, 2012) e 85%, respetivamente. Os dias de recolha e análise dos queijos durante o período de maturação variaram entre estudos. Prados *et al.* (2007) e Galán *et al.* (2008) analisaram os queijos nos dias 2, 15, 30, 60, 90, 120 e 180; Tejada & Fernández-Salguero (2003) analisaram nos dias 2, 25, 30, 60 e 90; e Galán *et al.* (2012) nos dias 2, 30, 60, 120, 180 e 240 de maturação. Os parâmetros químicos, reológicos e sensoriais analisados nos queijos dos referidos trabalhos encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Compilação das análises efetuadas aos queijos nos trabalhos de Tejada & Fernández-Salguero (2003), Prados *et al.* (2007), Galán *et al.* (2008, Galán *et al.* (2012)

Autor	Análises	
Tejada & Fernández-Salguero (2003); Prados <i>et al.</i> (2007); Galán <i>et al.</i> (2008); Galán <i>et al.</i> (2012)	Químicas	TCA-SN
		SN
		AAN
		NPN
		NH ₃ N
		TN
		Gordura
		Proteína
		pH 4.6 SN
		pH
	a _w	
	Sal	
	Reológicas	Textura
	Sensoriais	Odor
Cor		
Firmeza		

pH 4.6 SN - níveis de azoto solúvel a pH 4.6; SN-azoto solúvel; AAN-azoto aminoacídico; NPN-azoto não proteico; NH₃N-azoto amoniacal; TN-azoto total; TCA-SN-azoto solúvel em ácido tricloroacético;

Os valores de pH foram muito semelhantes entre os queijos fabricados com coalho animal e vegetal, não tendo sido verificada uma alteração significativa ao longo do processo de maturação (Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Galán *et al.*, 2012). Relativamente à a_w, Tejada & Fernández-Salguero (2003) obtiveram resultados muito semelhantes nos dois coalhos e, em ambos os casos, observaram alterações significativas ao longo da maturação. A humidade apresentou um decréscimo durante o processo de maturação causado pela diminuição da a_w e aumentos da gordura, proteína e sal (Galán *et al.*, 2012). Os valores de azoto solúvel (SN) foram aumentando nos queijos produzidos com os dois coalhos ao longo da maturação, tendo os de coalho vegetal, no final da maturação, valores muito superiores aos

observados com coalho animal (Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008). Os valores de azoto não proteico (NPN), azoto aminoacídico (AAN) e azoto amoniaco (NH_3N) e de azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCA-SN) aumentaram ao longo do processo de maturação (Tejada & Fernández-Salguero 2003; Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008), tendo sido observadas diferenças significativas, em algumas amostras, para os dois coalhos (Tejada & Fernández-Salguero 2003; Galán *et al.*, 2008), e diferenças não significativas (Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008) mas com valores ligeiramente superiores para o coalho vegetal (Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008). Relativamente aos níveis de azoto solúvel a pH 4,6 (pH 4,6 SN), Galán *et al.* (2012), verificaram um aumento ao longo do processo de maturação dos queijos. Nos fabricados com coalho vegetal e com a mistura dos dois coalhos (vegetal e animal) a evolução do pH 4.6 SN apresentou-se semelhante e significativamente elevada, quando comparada com os queijos fabricados com coalho animal.

Relativamente às características sensoriais, o *flavor* aumentou com a maturação dos queijos, tendo sido mais intenso nos queijos fabricados com coalho vegetal do que com coalho animal (Tejada & Salguero, 2003). A intensidade do cheiro ácido (Galán *et al.*, 2012), o odor e a cor (Prados *et al.*, 2007) também aumentaram significativamente ao longo da maturação. Quanto à firmeza, os queijos produzidos com coalho animal mostraram-se significativamente mais firmes do que os queijos produzidos com coalho vegetal e com mistura de coalhos (Galán *et al.*, 2012). Os valores médios de cremosidade foram mais elevados nos queijos feitos com coalho vegetal e mistura dos dois coalhos, do que nos queijos feitos com coalho animal (Galán *et al.*, 2008, Galán *et al.*, 2012). A intensidade de sabor alterou-se significativamente com o processo de maturação dos queijos, tendo-lhe sido atribuída, pelo painel de provadores, uma pontuação mais elevada para os queijos feitos com coalho vegetal e de mistura de coalhos comparativamente aos queijos feitos com coalho animal (Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008; Galán *et al.*, 2012).

Sendo um dos objetivos do presente trabalho o fabrico de queijos de ovelha com características amanteigadas, descrevem-se de seguida as várias fases do fabrico de um queijo amanteigado baseado nalguns trabalhos que utilizaram na produção dos seus queijos apenas coalho vegetal de *Cynara cardunculus*, o coalho tradicionalmente utilizado no fabrico do queijo da Serra, referência dos queijos amanteigados produzidos no nosso País.

O processo de coagulação tem início com a adição ao leite de um preparado de *Cynara cardunculus*, que é feita empiricamente pelo queijeiro. Para simular o processo tradicional, Reis & Malcata (2007 e 2011b) utilizaram, nos seus trabalhos, 0,2 g de *Cynara cardunculus* e 20 g de sal por litro de leite. O leite é aquecido por um certo período de tempo, definido pelo fabricante, e a coagulação termina pela avaliação da consistência do gel formado (Macedo *et al.*, 1993a). Nos seus trabalhos, Reis & Malcata (2007 e 2011b) definiram 32 °C para a temperatura de coagulação e 45 min para o tempo de coagulação. Outros trabalhos experimentais realizados, compilados por Macedo *et al.* (1993a), definiram tempos e temperaturas de coagulação diferentes (Quadro 3).

Quadro 3 - Tempos de coagulação (min) e temperatura de coagulação (°C) definidos por alguns autores

Autor	Tempo de coagulação (min)	Temperatura de coagulação (°C)
Cruz & Borrego (1948)	30-40	20-30
Antunes & Santos (1943)	28 – 240	17-40
Saramago <i>et al.</i> (1975)	25-63	28-32
Cruz (1945)	37-90	27-31
Barbosa (1986)	60	27-29
Antunes (1948)	20-360	n.d.
Santos (1957)	45-240	n.d.
Martinho (1980)	30-40	n.d.

n.d.- não definido

Fonte: Macedo *et al.* (1993a)

No final da coagulação, a coalhada é trabalhada manualmente (Reis & Malcata, 2007) ou cortada de forma circular com uma faca (Reis & Malcata, 2011b) e deixada a repousar 10 min (Reis & Malcata, 2007 e 2011b). Posteriormente, procede-se à dessoração da coalhada, que pode ser colocada diretamente em moldes onde, através de pressão manual, lhe é retirado o soro (Reis & Malcata, 2011b) ou colocada em panos e lentamente espremida e trabalhada manualmente, retirando-lhe o soro e depois colocada em moldes. Os moldes são posteriormente colocados na prensa a 25 N cm⁻² (Reis & Malcata, 2007) ou 250 kPa (Reis & Malcata, 2011b) durante 4 h (Reis & Malcata, 2007 e 2011b). Durante as 4 h de prensagem, os moldes são virados várias vezes para que o queijo seja o mais homogéneo possível (Reis & Malcata, 2007). Terminada a prensagem, o queijo é envolvido em sal (Macedo *et al.*, 1993a). Depois de prensado e salgado, o queijo é levado para as câmaras de maturação. O queijo é virado todos os dias e lavado quando necessário. Nesta fase, pode ser colocada, em volta do queijo, uma cinta de pano para que este não perca a forma com o avançar da maturação. Numa segunda fase de maturação, o queijo é colocado numa câmara mais

quente, virado todos os dias e lavado uma vez por semana (Macedo *et al.*, 1993a). Reis & Malcata (2007 e 2011b) definiram como 60 dias o tempo de maturação dos queijos, em que, nas primeiras 3 semanas, são mantidos a uma temperatura de 8 °C e a uma humidade relativa de 99%, e, nas restantes semanas, a 11 °C de temperatura e 85% de humidade relativa.

Capítulo 3

Trabalho experimental

“Um queijo é um intenso mundo vital, um laboratório de transformação onde operam miríades de seres em labores numa complexidade extrema. Na medida em que estas múltiplas atividades são conduzidas e disciplinadas resulta o tipo de queijo que se quer fabricar e a sua qualidade” (Sá & Barbosa, 1988)

3.1 Enquadramento

3.1.1 Queijaria Vaz

A componente experimental do presente trabalho decorreu na Queijaria Vaz, na Quinta de Alvar, situada na freguesia de Navalho, no concelho de Mirandela (Figura 6).

Na queijaria trabalha uma pessoa a tempo inteiro e nas alturas onde há maior quantidade de leite e queijo para ser lavado são contratadas mais funcionárias. Nos meses onde há maior produção de leite as quantidades que chegam à queijaria variam entre os 500 L e os 1000 L /dia.

Os queijos fabricados são de ovelha curado (apimentado, com malagueta e com orégãos), fresco e requeijão, e queijo de cabra curado. O leite utilizado no fabrico dos queijos é proveniente de ovinicultores da região e de ovinos e caprinos da própria exploração. A exploração tem um efetivo de ca. 180 ovelhas adultas cruzadas Lacaune x Holandesas, e estão separadas em dois grupos, sendo que um apenas se alimenta da pastagem e outro que, para além da pastagem, é suplementado com feno e alimento concentrado na manjedoura.

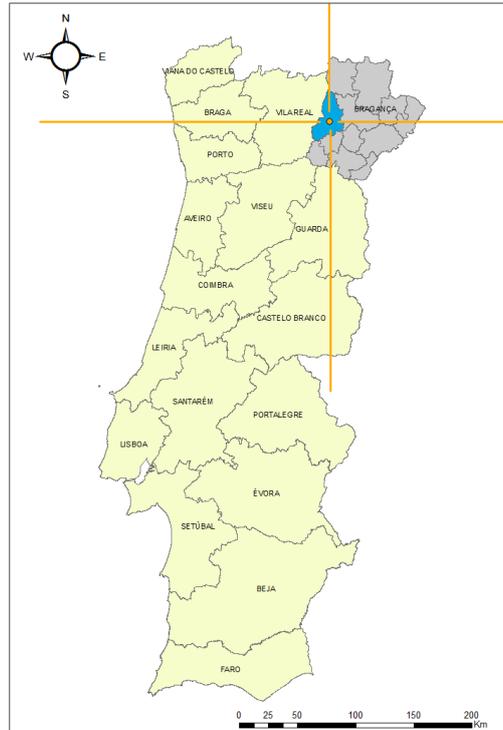


Figura 6 – Concelho de Mirandela

Fonte: Carta Administrativa Oficial de Portugal, 2014

Os animais pastoreiam durante todo o ano, das 7 h às 21 h (no inverno são recolhidos às 17 h). Nos dias em que neva não pastoreiam e é-lhes fornecido feno. Os terrenos dedicados ao pastoreio têm cerca de 200 ha e apresentam vegetação espontânea, como aveia brava (*Avena spp*), ou semeada com “Extensivo Fertiprado AC 500”, composto por *Trifolium subterraneum spp. subterraneum*, *Trifolium subterraneu spp. yanninicum*, *Trifolium subterraneum spp. brachycalycinum*, *Trifolium balansae*, *Trifolium resupinatum*, *Trifolium vesiculosum*, *Trifolium incarnatum*, *Ornithopus sativus*, *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*. As ovelhas pastoreiam ainda no restolho do trigo (*Triticum spp.*), aveia (*Avena spp.*) e sorgo (*Sorghum spp.*) (Figura 7).



Figura 7 - Pastagem de trigo (à esquerda), e de vegetação espontânea (à direita) na Quinta de Alvar

Na Quinta de Alvar, os machos estão em contacto com as fêmeas durante todo o ano, sendo os meses de outubro e novembro, aqueles onde ocorre o maior número de partos e os meses de fevereiro, março e abril onde há maior produção de leite. As ovelhas da exploração são ordenhadas duas vezes ao dia, manualmente, às 6h e às 18h.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Amostragem e análises químicas da pastagem

3.2.1.1 Amostragem

A recolha das amostras das pastagens (de aveia brava, semeada AC500 e de restolho de trigo e aveia) para análise química foi realizada de acordo com Rayburn (2003). De uma forma geral, recolheram-se entre 30 a 50 amostras de cada tipo de pastagem cortando-a com o polegar e o dedo indicador, simulando o corte da vegetação pela ovelha.

3.2.1.2 Métodos de análise

Para a determinação da matéria seca (MS), as amostras de alimentos foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, durante 48 h para as amostras de alimento completo (TMR).

Para as determinações analíticas a seguir referidas, as amostras foram moídas num moinho equipado com crivo de 1 mm. O teor em cinza foi determinado após 3 h em mufla a 500 °C (AOAC, 1990; ID 942.05). O teor em N foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990; ID 954.01) e o teor em proteína bruta (PB) calculado como $N \text{ Kjeldahl} \times 6,25$ (AOAC, 1990). A fibra de detergente neutro (NDF) foi determinada de acordo com Van Soest *et al.* (1991) tendo sido adicionada α -amilase durante a determinação da fração NDF; não foi utilizado sulfito de sódio. A fração NDF foi expressa isenta de cinza residual. A gordura bruta (GB) foi determinada após hidrólise ácida (GB-H), por extração com éter de petróleo utilizando um sistema Gerhardt Soxtec 2000 automatic (AOAC, 1990; ID 920.39).

O teor em nutrientes digestíveis totais (TDN) foi estimado através da equação proposta por Owens *et al.* (2010) em que $TDN = 105,2 - 0,667 \times NDF$.

3.2.2 Procedimento experimental

3.2.2.1 *Ensaios preliminares*

Os queijos fabricados na Queijaria Vaz têm uma grande procura pelo que a quantidade fabricada, muitas das vezes, não é suficiente para a procura. A quantidade de leite produzido pela própria exploração é um fator limitante, obrigando à compra de leite a ovinicultores da região. Este facto condicionou a quantidade de leite disponível para realizar o presente trabalho.

Uma vez que se pretendia testar um coalho de origem vegetal comercial, que nunca tinha sido utilizado na Queijaria Vaz, optou-se por se realizar ensaios preliminares que tiveram como objetivo conhecer o comportamento deste coalho de origem vegetal e ajustar certas condições do procedimento experimental com base em estudos já efetuados e no processo de fabrico da Queijaria Vaz.

3.2.2.1.1 Ensaio 1

O primeiro ensaio decorreu em laboratório utilizando 5 L de leite e testando os dois coalhos líquidos comerciais, de origem vegetal (fabricante “abiasa”, Tui, Espanha) e origem animal (fabricante “BioRen”, Tirol, Áustria) a $28\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

As concentrações utilizadas tiveram por base as indicações do fabricante, no caso do coalho de origem vegetal, e as concentrações utilizadas na Queijaria Vaz, no caso do coalho de origem animal, 20 e 10 mL/100 L de leite, respetivamente.

Visualmente verificou-se o tempo decorrido entre a adição do coalho e o início da coagulação e após 60 min a coalhada foi cortada, deixada em repouso durante 10 min, coada e pesada. A Figura 8 ilustra os vários passos seguidos no ensaio experimental.

3.2.2.1.2 Ensaio 2

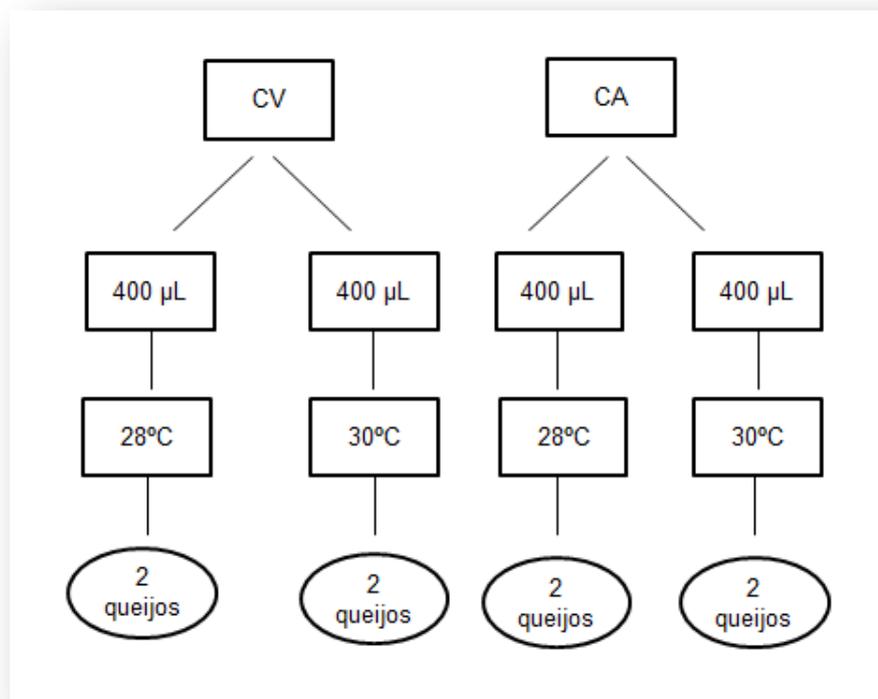
O fabrico de queijo na Queijaria Vaz segue o método tradicional, sendo por isso empírica e visual a monitorização do leite durante este processo. Tendo por base a informação recolhida, estabeleceram-se, inicialmente, três temperaturas de coagulação ($26\pm 1\text{ °C}$, $28\pm 1\text{ °C}$ e $30\pm 1\text{ °C}$) e uma concentração de coalho (10 mL/100 L de leite para o coalho de origem animal e 20 mL/100 L de leite para o coalho de origem vegetal) tendo por base, como já referido, o utilizado na Queijaria Vaz e o sugerido pela empresa.



Figura 8 - Fases do primeiro ensaio preliminar

3.2.2.2 Ensaio principal

Os queijos experimentais foram fabricados em dois dias diferentes sendo que os queijos do segundo dia são réplicas do primeiro dia. Foram, assim, fabricados oito queijos em cada dia, quatro com coalho de origem vegetal e quatro com coalho de origem animal, com as variáveis apresentadas na Figura 9.



Legenda: CV: Coalho vegetal; CA: Coalho animal

Figura 9 - Esquematização do fabrico dos queijos

As temperaturas de coagulação utilizadas foram de $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 20 mL de coalho por 100 L de leite (concentração de 400 μL).

O procedimento experimental seguido foi semelhante para os dois tipos de queijo, o fabricado a partir de coalho de origem animal e o de origem vegetal. Este delineamento teve por base estudos revistos na literatura (Macedo *et al.*, 1993a; Macedo *et al.*, 1993b; Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Prados *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008; Galán *et al.*, 2012; Reis & Malcata, 2007 e 2011b), bem como no processo de fabrico de queijos com coalho de origem animal seguido pela Queijaria Vaz, sendo o diagrama de fabrico dos queijos apresentado na Figura 10.

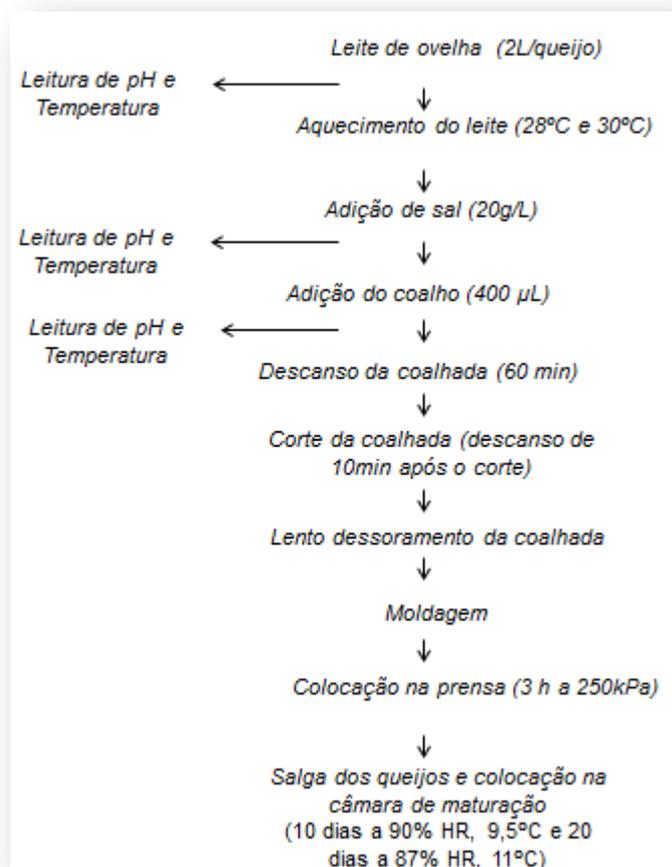


Figura 10 – Várias fases do processo de fabrico dos queijos experimentais

Adaptado de: Reis & Malcata (2007)

O leite recebido foi transferido e filtrado para uma cuba de armazenamento onde se procedeu à leitura da temperatura e do pH. Foi recolhida uma amostra do leite para posterior análise dos teores em matéria gorda (% m/m), matéria proteica (% m/m), extrato seco desengordurado (% m/m), contagem de células somáticas (cel/mL), contagem total de microrganismos (col/mL)*1000, pesquisa de inibidores

(Delvotest), ureia (ppm), lactose (% m/m) e ponto de congelação (-m °C) no laboratório ALIP-Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios, Lousada, Portugal.

Cada queijo experimental foi fabricado com 2 L de leite que foram colocados em goblés e posteriormente aquecidos até à temperatura pretendida, em banho-maria (Figura 11).



Figura 11 – Banho-maria utilizado para a coagulação dos queijos

Quando o leite atingiu a temperatura pretendida, foi determinado o pH, adicionou-se 40 g de sal, homogeneizou-se o leite e voltou-se a determinar o pH. Adicionou-se o coalho e foi lido, novamente, o pH. Quando a coagulação teve início, o pH foi de novo determinado. O método seguido para verificar se a coagulação estava a ocorrer foi o método empírico seguido pela queijaria que consiste em colocar uma gota de água no leite e verificar o seu comportamento. Após 60 min da adição do coalho, definido como o tempo de coagulação para os dois tipos de coalho, procedeu-se ao corte da coalhada. Deixou-se em repouso durante 10 min e após esse tempo procedeu-se à dessoração lenta da coalhada (Figura 12).



Figura 12 - Dessoração lenta da coalhada

A coalhada foi colocada em moldes e esses moldes levados à prensa (Figura 13) durante 3 h, a 250 kPa, tendo sido virados 90 min depois de terem sido colocados na prensa.



Figura 13 – Queijos experimentais na prensa

Ao fim das 3 h, os queijos foram retirados da prensa, envolvidos em sal e colocados na primeira câmara de maturação. Os queijos permaneceram 10 d nessa câmara (90% HR, 9,5 °C) e 20 dias na segunda câmara (87% HR, 11 °C). Durante o tempo de maturação, começaram por se colocar os queijos nas prateleiras de baixo e, a cada dois dias, viraram-se e subiram-se, uma vez que nas câmaras de cura a temperatura aumenta ligeiramente em altura. Foram lavados duas vezes por semana, ou quando era visualmente necessário (Figura 14).



Figura 14 - Queijo na câmara de maturação e a ser lavado

Depois de retirados das câmaras de maturação, os queijos foram analisados quanto à sua composição química e submetidos a prova de análise sensorial e de textura.

3.2.2.3 *Ensaio complementar*

No segundo dia do ensaio experimental, o leite disponível foi ligeiramente superior tendo havido um excesso de cerca de 8 L. Recorrendo à cuba de coagulação da Queijaria Vaz fabricaram-se quatro queijos com coalho de origem vegetal a uma temperatura de 27 °C \pm 1 °C com 17 mL de coalho por 100L de leite (1360 μ L).

A temperatura nestas cubas de coagulação é difícil de controlar, funcionando por abertura das torneiras de água quente e água fria. A temperatura de coagulação

foi monitorizada manualmente. Quanto à concentração de coalho utilizada, teve por base, como já referido, as indicações do fabricante do coalho vegetal, que indica, como ótimo, um intervalo de 15-20 mL/100 L de leite. O procedimento de fabrico foi o apresentado na Figura 10.

Este ensaio teve como objetivo simular o fabrico dos queijos em condições reais da queijaria, por forma a ser um ponto de partida para trabalhos futuros.

3.2.3 Prova de análise sensorial e textura

As provas de análise sensorial decorreram nas instalações do Campus Agrário de Vairão em Vairão, Vila do Conde. Foram realizadas nos dias seguintes a serem retirados os queijos das câmaras de maturação, ou seja, nos dias 14 e 18 de julho de 2014. O painel da prova era constituído por 12 provadores *naive*, sendo 67% do sexo feminino e 33% do sexo masculino, com média de idades de 37±13,5 anos.

No dia 14 e no dia 18 fez-se um mapeamento projetivo (ou Napping) com comentários (ou Ultra Flash Profile), com 6 amostras de queijo apresentadas em simultâneo. Estas amostras foram compostas pelos 4 queijos experimentais, 1 queijo de ovelha curado da Queijaria Vaz e 1 queijo de ovelha amanteigado marca Pingo Doce. O Quadro 4 resume os números das amostras, gerados aleatoriamente, para cada queijo, bem como a sigla utilizada na análise de dados.

Quadro 4 – Siglas e números das amostras, para cada queijo, utilizados na prova de mapeamento projetivo

Sigla	Tipo de Queijo	Nº da Amostra	
		1º dia	2º dia
V28	Coalho vegetal a 28°C	197	055
V30	Coalho vegetal a 30°C	770	436
A28	Coalho animal a 28°C	377	151
A30	Coalho animal a 30°C	544	702
QV	Queijaria Vaz	862	580
PD	Pingo Doce	241	900

Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Em ambos os dias, após a realização do mapeamento projetivo com comentários, foi pedido ao painel que ordenasse as amostras apresentadas por ordem de preferência, de 1 a 6, sendo 1 a amostra “menos preferida” e 6 a amostra “mais preferida”.

No dia 18 fez-se ainda um teste triangular entre o queijo experimental do ensaio complementar e o queijo de ovelha curado da Queijaria Vaz cujas siglas e números das amostras estão resumidos no Quadro 5.

Quadro 5 – Siglas e números das amostras, para cada queijo, utilizados no teste triangular

Sigla	Tipo de Queijo	Nº das Amostras
QC	Coalho vegetal a 27°C (ensaio complementar)	001 e 391
QV	Queijaria Vaz	654 e 660

Legenda: QC: queijo produzido no ensaio complementar com coalho vegetal a 27°C; QV: queijo da Queijaria Vaz.

Na Figura 15 é possível visualizar algumas fases do decorrer da prova.



Figura 15 - Prova de análise sensorial realizada aos queijos

Após a análise sensorial os queijos foram submetidos a análises de textura, realizadas com recurso ao texturómetro “Instrom 3342”. As amostras de queijo foram cortadas em cubos com 2 cm de largura e submetidas a um teste de perfuração com uma sonda plana cilíndrica de $\frac{3}{4}$ de polegada. A velocidade de perfuração utilizada foi de 1 mm/s e o registo da força exercida à cadência de 10 pontos/s. Para cada queijo fizeram-se 4 repetições sendo possível auferir, com estes resultados, o módulo de Young (Dimitreli & Thomareis, 2007).

3.2.4 Análise estatística

Para se compararem as médias (1) dos teores de gordura e proteína nos diferentes queijos, entre os dois dias (Composição do queijo), (2) do tempo decorrido até ao início da coagulação e tempo total de coagulação, entre os dois dias e entre tipos de coalho (Ensaio principal), e (3) dos módulos de Young dos diferentes queijos (Análise sensorial e textura), determinaram-se os respetivos intervalos de confiança

assintótico (nível de confiança de 95%) para as médias, assumindo que os dados seguem uma distribuição normal.

Efetuarão-se regressões lineares para averiguar eventuais correlações entre (1) a quantidade de leite utilizada e o tempo decorrido até ao início da coagulação (Ensaio preliminar 1), (2) a quantidade de leite utilizada e o peso da coalhada após 60 minutos de coagulação (Ensaio preliminar 1), e (3) o módulo de Young e a força máxima exercida pela sonda (Análise sensorial e textura).

O teste t foi utilizado para comparar as médias do tempo de início de coagulação e do tempo total de coagulação (Ensaio principal), entre os dois dias, com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre médias.

O teste de Tuckey foi utilizado na comparação de rankings de preferência global para avaliar a existência de diferenças significativas nas preferências globais das amostras de queijo (Análise sensorial e textura).

Efetuuou-se um teste Chi Quadrado (χ^2), com base nos resultados obtidos na prova triangular, com o objetivo de avaliar se havia diferenças perceptíveis (com 95% de confiança) entre as amostras de queijo, considerando como respostas de sucesso as respostas corretas (Análise sensorial e textura).

Para a interpretação dos resultados obtidos na prova sensorial de mapeamento projetivo, recorreu-se à Análise de Procrustes Generalizada (APG) para gerar gráficos biplot (Análise sensorial e textura).

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no software MATLAB R2013a, exceptuando a APG que foi executada no software XLSTAT.

Capítulo 4

Resultados e discussão

“...O fabrico de queijos de qualidade uniforme não constitui tarefa fácil quando limitada apenas a por em execução uma dada receita, mesmo suficientemente esclarecida.” (Rebello, 1994)

4.1 Alimentação animal

A composição química das amostras de pastagens recolhidas encontra-se no Quadro 6.

Quadro 6 – Composição química dos alimentos

Alimento	MS (%)	Cinza (%MS)	GB (%MS)	PB (%MS)	NDF (%MS)	TDN* (%MS)
Aveia brava	75,8	7,7	1,1	6,4	72,0	57,2
AC500	61,5	6,8	1,5	7,6	71,1	57,8
Trigo + aveia	90,3	5,9	1,2	5,3	65,2	61,7

*Estimado de acordo com equação proposta por Owens *et al.* (2010).

MS – Matéria seca, GB – Gordura bruta, PB – Proteína bruta, NDF – Fibra em detergente neutro, TDN - Nutrientes digestíveis totais

Relativamente à composição química dos alimentos, verifica-se que o teor em MS é mais elevado no trigo+aveia (90,3%), seguido da aveia brava (75,8%) e, por fim, do AC500 (61,5%) cuja composição já fora previamente referida. Em termos de proteína bruta (em %MS), observa-se um teor mais elevado (em %MS) no AC500 em relação aos restantes alimentos. Porém, o teor de TDN (em %MS) é praticamente semelhante entre todos os alimentos, realçando-se o trigo+aveia com o valor mais elevado (61,7%).

Assume-se que, em média, as ovelhas têm 60 kg de peso vivo (PV), estão entre as 6 e as 8 semanas de lactação e encontram-se em balanço nulo. Nestas condições a capacidade diária de ingestão de MS por animal é de 2,3 kg,

correspondendo a 3,9% do PV. As necessidades de um animal nestas condições, com um cordeiro, segundo o National Research Council (NRC, 1985), são de 0,295 kg de PB e de 1,54 kg de TDN, aumentando consideravelmente no caso de dois cordeiros (0,336 kg de PB e de 1,75 kg de TDN). Com base na dieta alimentar referida, verifica-se que a média de PB é de 6,4% de MS que, refletindo-se numa quantidade máxima de PB ingerida por animal de 0,148 kg. Em relação ao TDN, cuja média da composição da dieta é de 58,9% de MS, verifica-se que a quantidade máxima ingerida por animal é de 1,35 kg.

Em suma, a dieta alimentar proporcionada aos animais não cobre as suas necessidades, uma vez que há um claro défice em PB (ingerem 0,148 kg de PB e necessitam entre 0,295 kg e 0,336 kg de PB) e em TDN (ingerem 1,35 kg e necessitam entre 1,54 kg e 1,75 kg). Ressalva-se que apenas se consideraram estes macronutrientes, podendo haver défice em cálcio e fósforo, entre outros. O teor em MS variou entre 90,3% na pastagem de restolho de trigo e aveia e 61,5% na pastagem semeada AC500. O teor em GB de todas as pastagens foi extremamente reduzido. De igual modo, o teor em PB foi baixo para todas as pastagens, tendo sido o valor mais elevado observado na pastagem AC500. O teor estimado em TDN foi relativamente baixo para todas as pastagens, tendo sido a pastagem trigo+aveia a que apresentou um valor mais elevado (61,7%).

Para verificar se a alimentação fornecida satisfazia as necessidades alimentares dos animais, assumiu-se que, em média, as ovelhas tinham 60 kg de peso vivo (PV), se encontravam entre as seis e as oito semanas de lactação e em balanço energético nulo (i.e., sem mobilização e reposição de reservas corporais). Nestas condições, a capacidade diária de ingestão de MS por animal é, em média, de 2,3 kg/animal/dia, correspondendo a 3,9% do seu PV. As necessidades diárias de uma fêmea nestas condições e a amamentar um cordeiro são, de acordo com o NRC (1985), de 0,295 kg de PB e de 1,54 kg de TDN, aumentando consideravelmente no caso de dois cordeiros (0,336 kg de PB e de 1,75 kg de TDN). Em termos médios, as pastagens apresentavam 6,4% de PB (na MS), o que, considerando a estimativa de capacidade máxima de ingestão destes animais, se refletiria numa quantidade máxima de PB ingerida por animal de 0,148 kg, valor bem abaixo do necessário (0,295 kg/animal/dia). Em relação ao TDN, cujo valor média das pastagens é de 58,9% (na MS), verifica-se que a quantidade máxima ingerida por animal seria de 1,35 kg, valor ligeiramente abaixo do necessário (1,54 kg/animal/dia) se apenas estiver a amamentar um cordeiro.

Em suma, a dieta alimentar proporcionada aos animais não cobre as suas necessidades em PB e em TDN, pelo que o seu nível de produção de leite real estará abaixo do potencial e o seu desempenho reprodutivo poderá, também, estar comprometido dada a eventual mobilização de reservas corporais que, em determinadas fases do ciclo, deverá ser considerável. Ressalve-se, ainda, que apenas se consideraram estes macronutrientes, podendo haver défice em outros, tais como cálcio e fósforo.

4.2 Composição do leite

Os resultados da composição do leite das amostras recolhidas nos dois dias em que se fabricaram os queijos experimentais estão apresentados no Quadro 7.

Quadro 7 - Composição do leite utilizado no fabrico dos queijos experimentais

Amostra	MG (%, m/m)	MP (%, m/m)	ESD (%, m/m)	CS (Cel/mL)x1000	Microrg. (Col/mL) x1000	P. Inb	Ureia (ppm)	Lac (% m/m)	PC (-m °C)	Cálcio (%, m/m)
1	7,3	5,3	10,7	2151	1727	Negativo	225	4,6	553	0,180
2	6,3	5,7	11,0	2306	2224	Negativo	202	4,5	551	0,183

Legenda: MG: Matéria gorda; MP: Matéria proteica; ESD: Extrato seco desengordurado; CS: Células somáticas; Microrg.: Microrganismos; P. Inb.: Pesquisa de Inibidores; Lac: Lactose; PC: Ponto de congelação;

Os resultados obtidos para a matéria gorda (MG, 7,3% e 6,3%) em ambos os dias não diferem muito dos valores encontrados na literatura, que mencionam valores médios de 6,5% (Zervas & Tsiplakou, 2011), 6,8% (Sá & Barbosa, 1990; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008), e 7,9% (Park, *et al.*, 2007), sendo que Raynal-Ljutovac *et al.*, (2008), como já referido, através da compilação que realizaram, verificaram valores de MG entre 3,6% e 9,97%.

Quanto à matéria proteica (5,3% e 5,7%) também não se evidenciam grandes diferenças entre os valores médios presentes na literatura que são de 5,5% (Zervas & Tsiplakou, 2011), de 5,6% (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008), de 6,2% (Park, *et al.*, 2007) e de 6,8% (Sá & Barbosa, 1990), tendo Raynal-Ljutovac *et al.* (2008) verificado que os valores de MP variam entre 4,75% e 7,20%.

Raynal-Ljutovac *et al.* (2008) compilaram também os resultados obtidos em vários estudos para os valores de cálcio no leite de ovelha. Concluíram que estes

valores variavam entre 0,195% e 0,200%, ligeiramente superiores aos valores obtidos nas amostras de leite recolhidas no trabalho experimental (0,180% e 0,183%).

Relativamente à lactose os valores obtidos no leite recolhido foram de 4,6% e 4,5%, um pouco abaixo dos valores obtidos por Park *et al.* (2007), 4,9%, e Zervas & Tsiplakou (2011), 4,8%.

A concentração de células somáticas das amostras de leite recolhidas ($2,2 \times 10^6$ cel/mL e $2,3 \times 10^6$ cel/mL) são alarmantes uma vez que, segundo Berthelot *et al.* (2005) *apud* Fragkou *et al.* (2014) e Pirisi *et al.* (2000), valores inferiores a $0,5 \times 10^6$ cel/mL indicam uma glândula mamária saudável, valores entre 0,5 e $1,0 \times 10^6$ cel/mL podem assinalar indícios de doença e valores superiores a $1,0 \times 10^6$ cel/mL indicam mastite e mau estado sanitário.

4.3 Composição do queijo

Todos os queijos utilizados nas provas de análise sensorial e nas análises de textura, quer os queijos experimentais, quer os queijos de compra (Pingo Doce) e do fabricante (Queijaria Vaz), foram submetidos a análises químicas, cujos valores obtidos se apresentam no Quadro 8.

Quadro 8 – Composição química dos queijos experimentais

Amostra	pH		MS (%)		Cinza (%MS)		GB (%MS)		PB (%MS)	
	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
V28	5,12	5,11	54,1	49,3	9,9	9,2	42,0	41,6	45,0	46,4
V30	5,24	5,13	56,8	50,4	8,6	9,0	50,3	45,3	39,3	42,5
A28	5,07	5,07	49,7	48,7	9,1	10,1	44,8	41,2	42,5	46,2
A30	5,13	5,12	53,7	48,4	8,3	10,2	49,6	39,2	40,0	58,2
QV	5,14	4,87	58,4	59,5	6,6	6,4	51,9	50,9	52,7	35,8
PD	5,11	4,94	54,9	54,6	6,4	6,1	53,8	54,0	35,3	40,3
QC	5,19		52,7		9,1		41,6		45,2	
QVC	4,90		58,9		5,6		51,8		40,5	

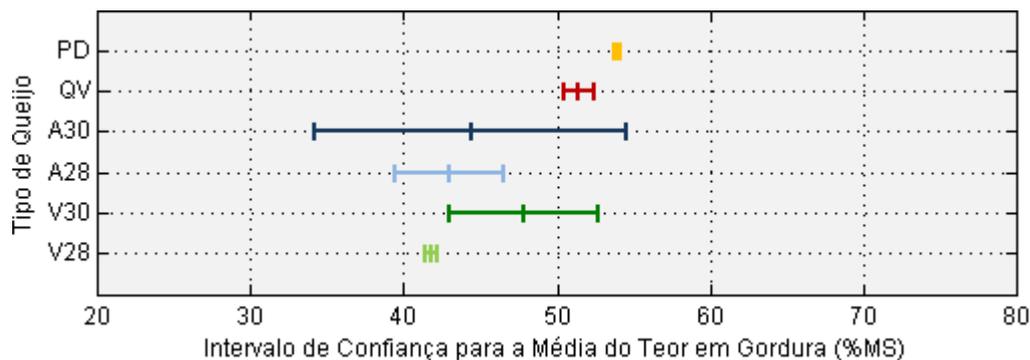
Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28°C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30°C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28°C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30°C; QV e QVC: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce; QC: queijo produzido no ensaio complementar com coalho vegetal a 27°C. MS – Matéria seca, GB – Gordura bruta, PB – Proteína bruta.

Os valores de pH dos queijos experimentais foram semelhantes entre si, sendo, em média de $5,1 \pm 0,05$. As análises efetuadas ao pH nos vários estudos presentes na literatura apresentam a evolução do pH ao longo do processo de

maturação dos queijos. Uma vez que esta avaliação da evolução do pH não foi realizada no presente estudo, os resultados obtidos serão, apenas, comparados aos valores obtidos na literatura no final da maturação ou aos valores obtidos ao fim de 30 dias de cura. Para queijos fabricados a partir de coalho vegetal *Cynara cardunculus* ao fim de 30 dias de cura, foram referidos valores de pH de 5,00 (Galán *et al.*, 2008), 5,51 (Roa *et al.*, 1999), 4,78 (Prados *et al.*, 2007) e 4,9 (queijo Serra da Estrela, Reis & Malcata, 2011b). Já para queijos produzidos com coalho animal, Prados *et al.* (2007) obtiveram um valor de pH de 4,76, ao fim de 30 dias de cura.

Comparando com os teores de humidade requeridos para a classificação de queijo DOP da Serra da Estrela (61% a 69%), todos os queijos analisados têm teores de humidade inferiores. Os teores de humidade obtidos nos queijos experimentais vão de acordo com o obtido por Galán *et al.* (2008) e por Tejada & Fernández-Salguero (2003), que verificaram que os teores de humidade presentes nos queijos feitos a partir de coalho vegetal são inferiores aos teores de humidade dos queijos fabricados a partir de coalho animal.

Através dos resultados obtidos para os valores GB (%MS) calcularam-se os intervalos de confiança para a média, para os dois dias e por tipo de queijo (Figura 16). Assume-se que a GB (%) segue uma distribuição normal.



Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28°C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30°C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28°C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30°C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

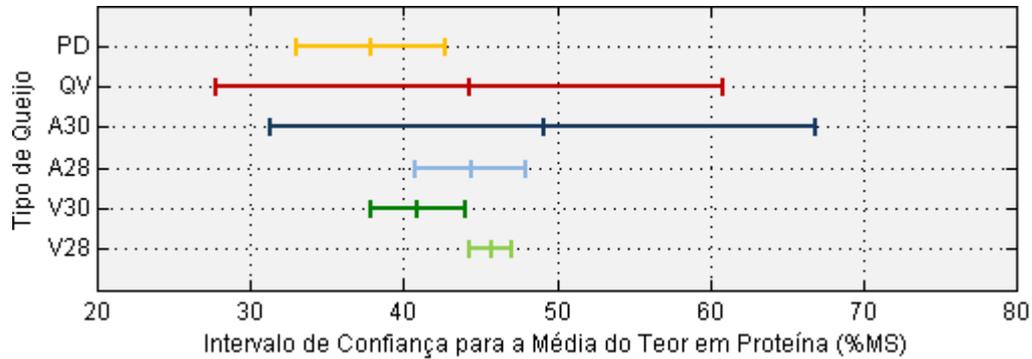
Figura 16 – Intervalos de confiança para as médias dos teores de gordura (%MS) nos queijos, para os dois dias

É possível verificar que não existem diferenças significativas, com um nível de confiança de 95%, entre os queijos experimentais, com exceção dos queijos V28 (coalho vegetal 28°C) e do V30 (coalho vegetal 30°C).

O teor de GB (%MS) do queijo fabricado na Queijaria Vaz mostra que somente não existem diferenças significativas (95% de confiança) entre este e os queijos fabricados a 30°C, nomeadamente A30 e V30. Relativamente ao Queijo Pingo Doce

verificam-se diferenças significativas no teor de GB (%MS) deste com todos os queijos, com exceção do queijo A30.

Recorrendo aos resultados obtidos para os valores PB (%MS) foi possível calcular os intervalos de confiança para a média, para os dois dias e por tipo de queijo (Figura 17). Assume-se que a PB (%MS) segue uma distribuição normal.



Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28°C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30°C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28°C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30°C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Figura 17 – Intervalos de confiança para as médias dos teores de proteína (%MS) nos queijos, para os dois dias

Relativamente aos queijos experimentais não foram verificadas diferenças significativas (95% de confiança) entre estes, com exceção dos queijos V28 e V30.

O queijo da Queijaria Vaz não apresenta diferenças significativas com nenhum dos queijos analisados. O queijo do Pingo Doce só apresenta diferenças significativas com o queijo V28.

Diferenças significativas nos teores de gordura e proteína, entre queijos fabricados com coalho vegetal e coalho animal e retirados para análise ao fim de 30 dias de cura, foram também verificadas por Galán *et al.* (2008) e Prados *et al.* (2007).

4.4 Ensaios preliminares

4.4.1 Ensaio 1

O ensaio 1 teve como objetivo avaliar o tempo de início de coagulação e o peso da coalhada mediante diferentes quantidades de leite, fixando-se a origem do leite, concentração de coalho, a temperatura e o tempo máximo de coagulação. O leite teve proveniência da Queijaria Vaz, sendo a mistura de leites dos vários ovicultores, que a mesma utiliza no fabrico dos seus queijos. A concentração de coalho utilizada foi de 20 mL e 10 mL por 100 L de leite, de coalho vegetal e animal, respetivamente, a

temperatura de coagulação adotada foi de 28 ± 1 °C e o tempo de coagulação estabelecido foi de 60 min. Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se compilados no Quadro 9.

Quadro 9 – Resultados do ensaio 1

Tipo de Coalho	Quantidade de Leite (L)	Concentração de Coalho (mL/100 L)	Tempo início da coagulação (min)	Peso da Coalhada (g) (após 60 min)
Vegetal	0,1	20	6	39,95
	0,1	20	3	25,34
	0,2	20	11	49,44
	0,5	20	9	166,13
	1	20	8	344,77
Animal	0,1	10	19	42,74
	0,1	10	6	31,09
	0,2	10	22	63,98
	0,5	10	15	167,45
	1	10	17	308,32

É possível verificar que, como seria expectável, o tempo de início de coagulação não varia em função da quantidade de leite utilizado, uma vez que todas as restantes variáveis se mantiveram constantes (origem do leite, a concentração de coalho e a temperatura de coagulação). A Figura 18 representa a dispersão dos valores obtidos para o tempo de início de coagulação em função da quantidade de leite utilizada.

Apesar de se verificar uma enorme amplitude de valores para o mesmo tipo de coalho, quer se trate de coalho animal ou vegetal, sendo o declive das retas de ajustamento muito ténue, o que significa a não evidência estatística de qualquer relação entre o tempo de início de coagulação e a quantidade de leite utilizada. De facto, os coeficientes de determinação das retas de ajustamento, para os coalhos vegetal e animal, são, respetivamente, 10,8% ($P=0,588$) e 2,2% ($P=0,812$).

Relativamente ao peso da coalhada ao fim de 60 min de tempo de coagulação seria expectável que este dependesse da quantidade de leite utilizada. Analisando os valores obtidos, para ambos os coalhos, pode-se verificar que existe um aumento do peso da coalhada concordante com o aumento do volume de leite utilizado. A Figura 19 representa a dispersão entre o peso da coalhada ao fim de 60 min de tempo de coagulação e a quantidade de leite utilizada, e respetivas retas de regressão linear.

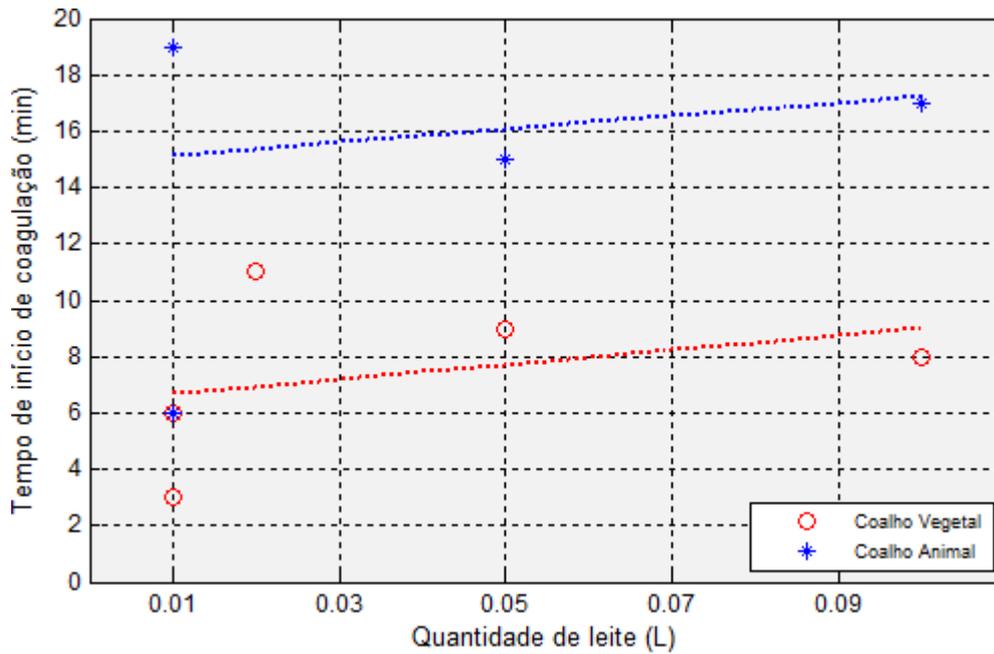


Figura 18 – Gráfico do tempo de início de coagulação em função da quantidade de leite utilizada

O coeficiente de determinação para o ajustamento linear do peso da coalhada em função da quantidade de leite, para os coalhos vegetal e animal, foi, respetivamente, 99,5% ($P < 0,001$) e 99,7% ($P < 0,001$), o que mostra uma relação perfeitamente linear entre a quantidade de leite utilizada e o rendimento final em queijo.

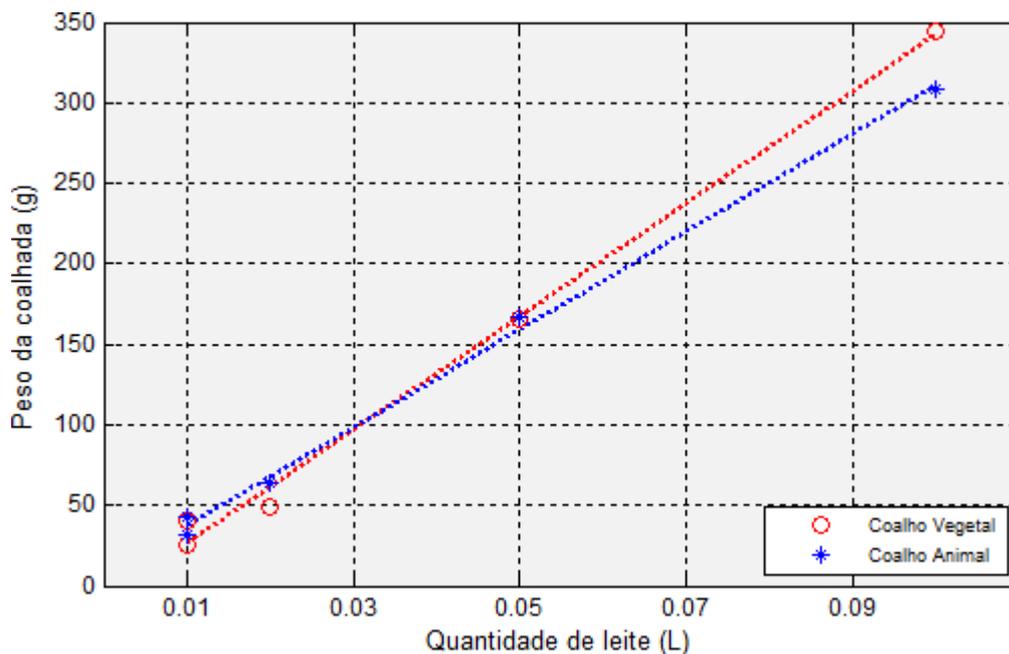


Figura 19 – Relação entre o peso da coalhada ao fim de 60 min e a quantidade de leite utilizada

Apesar de não terem sido efetuadas réplicas no decorrer deste ensaio preliminar, os valores obtidos permitem concluir que o peso da coalhada ao fim de 60

min de tempo de coagulação é bastante dependente da quantidade de leite utilizada. Em relação ao tempo de início de coagulação os resultados mostram variações grandes de valores e permitem concluir que não existe qualquer relação linear entre esta variável e a quantidade de leite utilizada. Não obstante, o facto do trabalho se ter efetuado com volumes de coalho na ordem dos μL , poderá ser uma justificação para a grande variação de tempos de início de coagulação.

4.4.2 Ensaio 2

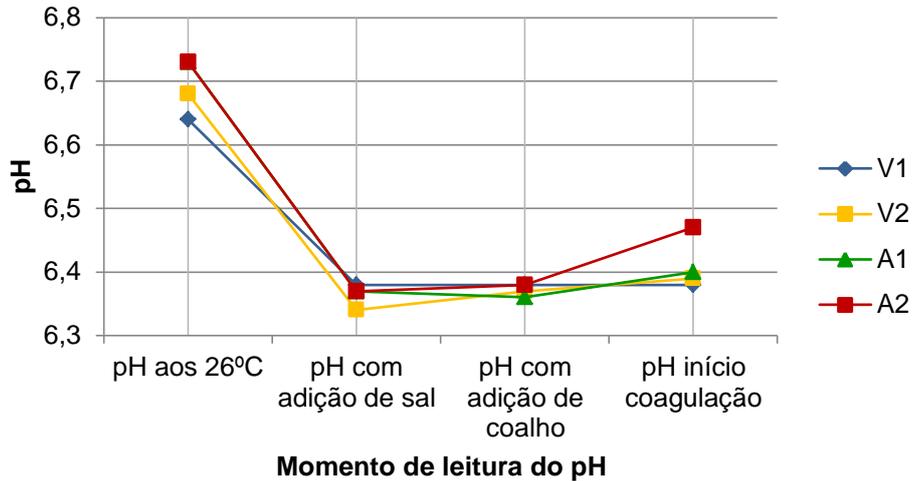
O ensaio 2 teve como objetivo avaliar o comportamento de coagulação do leite, para os dois tipos de coalho, através da monitorização do pH e do tempo de coagulação, replicando os métodos de fabrico utilizados na Queijaria Vaz e fixando a temperatura de coagulação em 26 ± 1 °C. Foram fabricados 4 queijos, 2 para cada tipo de coalho cujos resultados obtidos estão apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 - Resultados do ensaio 2

Tipo de coalho	Temperatura (°C)	Sal (g/L)	Concentração de coalho (mL/100 L)	pH aos 26 °C	pH com adição de sal	pH com adição de coalho	Tempo início coagulação (min)	pH início coagulação	Tempo decorrido fim coagulação
Vegetal	26°C	20	20	6,64	6,38	6,38	28	6,38	1h45min
				6,68	6,34	6,37	23	6,39	1h30min
Animal			10	6,73	6,37	6,36	18	6,40	4h
				6,73	6,37	6,38	29	6,47	3h35min

O pH ao longo de todo o processo mantém-se constante em todos os queijos, excepto no momento de adição de sal (Figura 20), e entre queijos denota-se semelhança nos valores de pH.

Com efeito, no momento de adição de sal, é notória uma diminuição do valor de pH em todos os queijos, tendo-se mantido sensivelmente constante até ao início da coagulação, com exceção do segundo queijo fabricado com coalho animal cujo pH aumentou ligeiramente (0,09) entre o momento de adição do coalho e o início da coagulação.



Legenda: V1: Queijo nº 1 fabricado com coalho vegetal a 26°C; V2: Queijo nº. 2 fabricado com coalho vegetal a 26°C; A1: Queijo nº 1 fabricado com coalho animal a 26°C; A2: Queijo nº 2 fabricado com coalho animal a 26°C

Figura 20 – Valores de pH ao longo da coagulação do leite

Relativamente ao tempo de início da coagulação os valores obtidos nos vários queijos são da mesma ordem de grandeza, iniciando-se a coagulação, em média, após $24,5 \pm 5$ min. Contudo, o tempo total de coagulação difere bastante entre os queijos fabricados com coalho vegetal e os queijos fabricados com coalho animal, verificando-se que o tempo total de coagulação para os queijos fabricados com coalho animal ultrapassa as 3,5 h, ou seja, mais do dobro do tempo de coagulação dos queijos fabricados com coalho vegetal. Segundo o protocolo de produção seguido pela Queijaria Vaz, não eram esperados tempos de coagulação tão elevados.

A Queijaria Vaz segue um processo tradicional no fabrico do queijo dependendo bastante de conhecimentos empíricos e de monitorização visual do estado de coagulação do leite. Este facto leva a erros não contemplados de leitura das temperaturas desejadas para a adição de coalho. Mediante o estado do leite na altura esperada da coagulação a quantidade de coalho é adulterada, havendo nova adição de coalho acelerando o processo de coagulação. Este facto só foi constatado após a realização do 2º ensaio.

Assim, como é possível visualizar no Quadro 10, o tempo decorrido entre a adição do coalho de origem animal e a coagulação total foi de 4 h. Este valor é muito díspar do definido no procedimento experimental, pelo que a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ foi excluída do ensaio principal.

4.5 Ensaio principal

No decorrer do ensaio principal, para os dois dias de fabrico dos queijos experimentais, foram medidos os valores de pH, em 4 momentos distintos, o tempo decorrido entre a adição de coalho e o início da coagulação, e o tempo total de coagulação. No Quadro 11 apresentam-se os valores de pH medidos para os 16 queijos experimentais.

Quadro 11 – Valores de pH dos 16 queijos experimentais medidos em 4 momentos do processo de fabrico

Tipo de Coalho	Temp.	pH à temperatura desejada		pH adição de sal		pH adição de coalho		pH início da coagulação	
		1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
Vegetal	28°C	6,83	6,67	6,44	6,41	6,44	6,41	6,43	6,45
		6,77	6,68	6,45	6,40	6,41	6,39	6,50	6,49
	30°C	6,70	6,86	6,44	6,48	6,43	6,47	6,50	6,53
		6,72	6,75	6,45	6,43	6,40	6,44	6,45	6,49
Animal	28°C	6,77	6,74	6,48	6,42	6,46	6,42	6,47	6,46
		6,78	6,73	6,43	6,40	6,44	6,40	6,52	6,50
	30°C	6,80	6,73	6,46	6,41	6,44	6,42	6,48	6,49
		6,79	6,71	6,45	6,40	6,43	6,40	6,46	6,45

O pH, para todas as combinações de factores (tipo de coalho, temperatura e dia de fabrico), manteve-se constante ao longo de todo o processo de fabrico dos queijos, excepto no momento de adição do sal, onde se observou uma redução de $0,32 \pm 0,04$, facto concordante com o resultado obtido no ensaio preliminar 2. O pH obtido no momento de adição do coalho foi, em média, de $6,4 \pm 0,02$ para o primeiro dia e de $6,4 \pm 0,03$ para o segundo dia.

No Quadro 12 estão sumarizados os valores obtidos para o tempo decorrido entre a adição de coalho e o tempo de início de coagulação e o tempo total de coagulação do leite nos diferentes queijos experimentais.

Observando os valores obtidos para o tempo decorrido até ao início da coagulação, verificou-se que os valores não apresentam grandes variações, quer entre queijos fabricados em dias diferentes, quer entre diferentes tipos de queijos fabricados no mesmo dia. Relativamente ao tempo total de coagulação verificou-se que todos os queijos fabricados com coalho vegetal coalharam totalmente em 60 min, contrariamente aos queijos fabricados com coalho animal cuja coagulação total

ultrapassou bastante o limite dos 60 min. Entre os queijos fabricados a partir de coalho animal às duas diferentes temperaturas não se verificaram diferenças significativas (nível de confiança de 95% assumindo que os valores seguem uma distribuição normal). Quando se comparam os valores obtidos entre os dois tipos de coalho verificam-se diferenças significativas entre os valores obtidos para o tempo total de coagulação (nível de confiança de 95% assumindo que os valores seguem uma distribuição normal).

Quadro 12 – Tempo de início e tempo total de coagulação dos 16 queijos experimentais

Tipo de coalho	Temp.	Tempo decorrido até ao início da coagulação (min)			Tempo decorrido até ao final da coagulação (min)		
		1º dia	2º dia	$\mu \pm \sigma$	1º dia	2º dia	$\mu \pm \sigma$
Vegetal	28°C	32	25	26,5±3,9	60	60	60±0,0
		26	23		60	60	
	30°C	30	30	29,5±1,0	60	60	60±0,0
		30	28		60	60	
Animal	28°C	22	30	30,5±6,6	90	120	101,3±14,4
		38	32		90	105	
	30°C	31	35	31,8±4,3	80	75	83,8±11,1
		26	35		80	100	
$\mu \pm \sigma$	-	29,4±4,8	29,8±4,3	29,6±4,4	72,5±13,9	80±24,6	76,3±19,7

μ - média

σ - desvio padrão

Não obstante, denota-se também uma variação de tempos de coagulação entre os queijos fabricados no primeiro dia e as réplicas do segundo dia.

Perante estes resultados, efetuaram-se testes t para comparação de médias dos tempos de início de coagulação e tempos totais de coagulação entre os vários queijos e respetivas réplicas. Nestes testes assumiu-se que o tempo de início de coagulação (X_1) e o tempo total de coagulação (X_2) para os 4 modos de fabrico ($k = 4$) seguem distribuições normais com médias $\mu_{X_i,k}$ e desvios padrão $\sigma_{X_i,k}$. O teste t , para cada um dos 4 modos de produção, foi calculado com base na equação seguinte:

$$T_{i,k} = \frac{\bar{D}_{i,k} \sqrt{n_{i,k}}}{\sigma_{D_{i,k}}}$$

Onde $\bar{D}_{i,k}$ é a média das diferenças das variáveis X_i (X_1 : tempo de início de coagulação; X_2 : tempo total de coagulação) entre os dois dias para o modo de produção para o tipo de queijo (k), $\sigma_{D_{i,k}}$ representa o desvio padrão da média das diferenças das variáveis X_i entre os dois dias para o tipo de queijo (k), $n = 2$ refere-se

ao número de observações (queijos) para cada um dos tipos de queijo (k). Os resultados dos testes t estão resumidos no Quadro 13.

Quadro 13 – Resultados dos testes t para comparação das médias das diferenças dos dois dias entre o tempo de início da coagulação e o tempo total de coagulação

Tipo de Coalho	Temp.	k	X_1 : tempo decorrido até ao início da coagulação (min)			X_2 : tempo decorrido até ao final da coagulação (min)		
			$\bar{D}_{1,k}$	$\sigma_{D_{1,k}}$	$T_{1,k}$	$\bar{D}_{2,k}$	$\sigma_{D_{2,k}}$	$T_{2,k}$
Vegetal	28°C	1	-5,0	2,8	2,5	0	0	0
	30°C	2	-1,0	1,4	1,0	0	0	0
Animal	28°C	3	1,0	9,9	0,1	22,5	10,6	3
	30°C	4	6,5	3,5	2,6	7,5	17,7	0,6

Considerando o número de graus de liberdade igual a 1, em todos os testes t , o limite da área de rejeição da hipótese nula (H_0 : a diferença das médias entre os dois dias é nula), para um nível de confiança de 95%, é dado por $t_{0,95;1} = 6,314$.

Analisando os valores obtidos para os testes t , e comparando-os com o valor do quantil de 95% com um grau de liberdade (6,314), verifica-se que nenhuma das diferenças das médias entre os dois dias, quer para o tempo de início de coagulação, quer para o tempo total de coagulação, se situa acima do valor do quantil, ou seja, nenhum dos valores calculados está na área de rejeição, o que significa que, com 95% de confiança, não se rejeita a hipótese nula, assumindo-se que não existem diferenças significativas das médias entre dias de fabrico diferentes.

De uma forma global, pode-se concluir, através destes resultados, que o processo de fabrico dos queijos experimentais não variou entre os dois dias, ou seja, os queijos foram produzidos de igual forma, entre os dois dias, de tal modo que não existem evidências estatisticamente significativas entre queijos do mesmo processo de fabrico. Assim, espera-se que os queijos produzidos no segundo dia obtenham classificações idênticas nas provas de análise sensorial e valores significativamente semelhantes na análise da textura, validando cada um dos diferentes modos de fabrico dos queijos.

4.6 Ensaio complementar

O ensaio complementar teve como objetivo testar a produção de queijos com coalho vegetal em condições reais de fabrico, ou seja, produzir queijos com os

equipamentos disponíveis na queijaria, utilizando apenas coalho vegetal e fixando a temperatura e a concentração do coalho. O Quadro 14 contempla os resultados obtidos para este ensaio.

Quadro 14 – Resultados do ensaio complementar

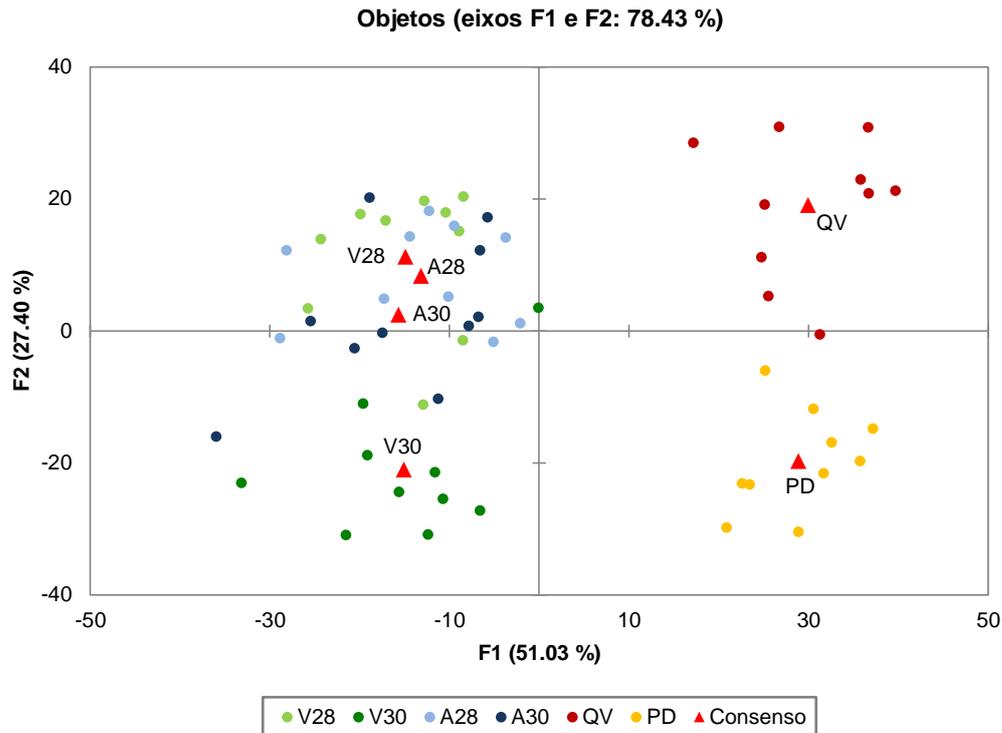
Tipo de Coalho	Temperatura (°C)	Sal (g/L)	Concentração de coalho (ml/100L)	pH 27°C	pH com adição de sal	pH com adição de coalho	Tempo início coagulação (min)	pH início coagulação	Tempo decorrido fim coagulação
Vegetal	27	160	17	6,80	6,47	6,46	40	6,53	90

De acordo com os resultados obtidos e comparando-os com os valores referentes ao ensaio principal para os dois coalhos, pode-se verificar que o tempo decorrido até ao início da coagulação foi ligeiramente superior (± 10 min). Relativamente ao pH não se verificam variações entre os valores relativos aos dois ensaios.

4.7 Análise sensorial e textura

O Napping e o Ultra Flash Profile são metodologias sensoriais que visam obter respostas por parte dos provadores relativamente a atributos de determinado produto e têm sido muito usados para este fim. Estas metodologias são atrativas uma vez que não exigem treino do painel de provadores (Albert *et al.*, 2011). O Napping é uma técnica que permite aos provador manifestar similaridades e diferenças entre amostras, bem como agrupá-las através do seu posicionamento numa folha de papel. O Ultra Flash Profile é um método descritivo simples e fácil na comparação de produtos, apresentados em simultâneo, onde cada provador gera a sua própria lista de atributos (Nestrud & Lawless, 2010; Santos *et al.*, 2013).

A análise dos resultados da prova sensorial foi feita através da Análise de Procrustes Generalizada (APG), com recurso ao software XLSTAT (Addinsoft 2014), que consiste na rotação e transformação (alongamento e compactação) das matrizes de dados de cada provador através de um algoritmo iterativo que calcula as matrizes de rotação e transformação e o fator de escala, indo ao encontro da configuração consenso para todos os provadores (Wilkinson *et al.*, 2000). A Figura 21 representa um mapeamento ao nível da discriminação.



Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

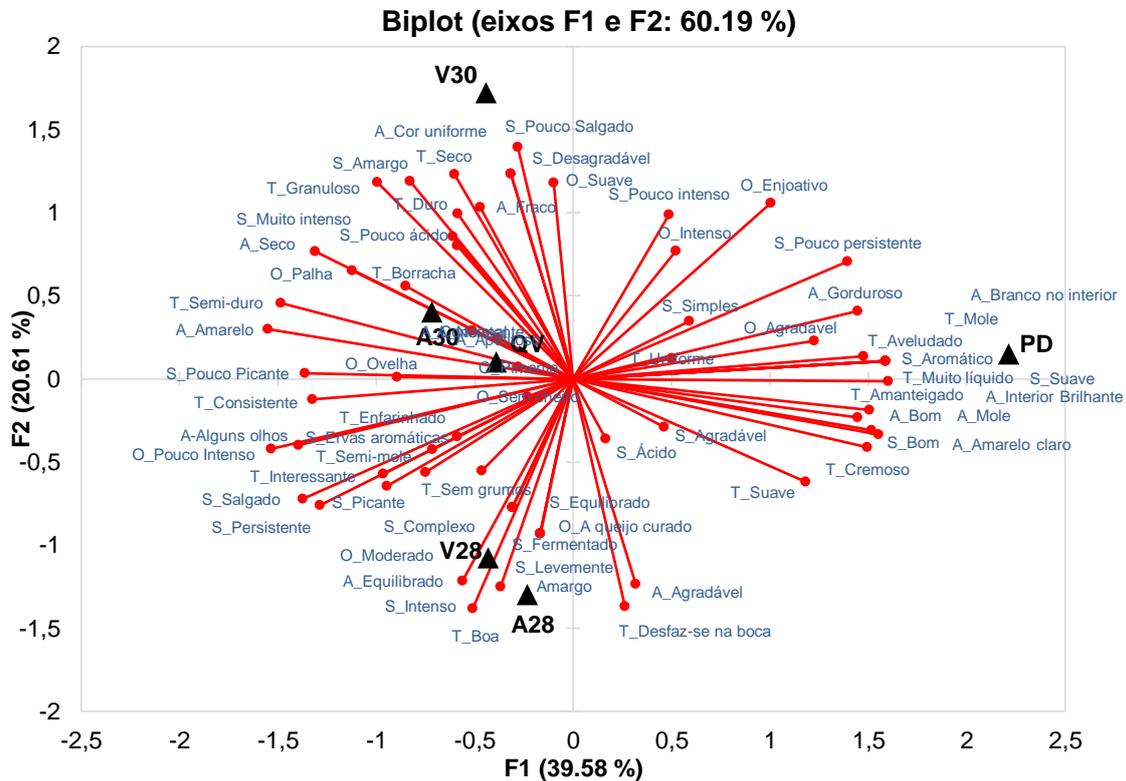
Figura 21 – Mapeamento ao nível da discriminação

Pela análise da Figura 21 denota-se relativamente ao fator 1 uma clara separação espacial entre os queijos experimentais face aos queijos do Pingo Doce (PD) e da Queijaria Vaz (QV). Em relação ao fator 2 o maior afastamento espacial evidencia-se entre os Queijos do Pingo Doce (PD) e os queijos da Queijaria Vaz (QV), porém com nuvens bastantes dispersas e próximas, havendo assim maior variação de valores obtidos pelo posicionamento espacial das amostras de queijos por parte dos provadores. Salienta-se, ainda, que os queijos A28 e A30 apresentam a menor dispersão de valores.

A Figura 22 contempla a representação (Biplot) das coordenadas dos produtos e dos atributos sensoriais.

Analisando a Figura 22 verifica-se que os fatores 1 e 2 explicam 60% dos dados, evidenciando uma correlação positiva entre os queijos A30 (queijo fabricado com coalho animal a 30 °C) e QV (queijo da Queijaria Vaz), e uma correlação negativa entre estes e o queijo PD (queijo do Pingo Doce). Perpendicularmente a estas relações evidenciam-se os queijos A28 (queijo fabricado com coalho animal a 28 °C) e V28 correlacionam-se positivamente entre si, mas negativamente com o queijo V30 (queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C). Desta forma, os queijos A28, V28 e V30

não se relacionam com os queijos A30, QV e PD. Assim, verificam-se semelhanças entre os queijos A30 e QV, e entre os queijos A28 e V28. O queijo PD é considerado sensorialmente oposto aos queijos A30 e QV, e o queijo V30 oposto aos queijos A28 e V28.



Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Figura 22 – Biplot das coordenadas dos produtos e dos atributos sensoriais

Pode-se observar, também que os queijos A30 e QV apresentam variâncias menores (proximidade à origem), contrariamente ao queijo PD que apresenta a maior variância, significando que, em pelo menos um atributo, o queijo PD obteve opiniões contraditórias, enquanto que as caracterizações dos queijos com menores variâncias foram mais consensuais.

Os principais atributos definidos pelo painel de provadores que mais se correlacionam com o queijo PD referem-se maioritariamente à textura, nomeadamente “textura amanteigada”, “textura aveludada”, “textura mole” e “textura muito líquida”, seguindo-se outros atributos como “sabor aromático”, “aspeto interior brilhante” e “aspeto branco no interior”. Contrariamente a este queijo, os atributos que mais se correlacionam com os queijos A30 e QV são “textura semidura”, “textura borracha”, “aspeto seco”, “aspeto consistente”, “aspeto agradável”, “odor a palha” e “odor a pimenta”. Assim, os queijos A30 e QV divergem do queijo PD sobretudo nos atributos

relacionados com a textura com este último a destacar-se por uma textura mais mole e amanteigada.

O queijo V30 é caracterizado por “sabor desagradável”, “sabor pouco salgado”, “textura seca”, “aspeto fraco” e “aspeto com cor uniforme”, defrontante com os queijos A28 e V28 cujos atributos com que mais se relacionam são “sabor intenso”, “sabor complexo”, “sabor equilibrado”, “sabor a fermentado”, “sabor levemente amargo”, “textura boa”, “odor a queijo curado” e “odor moderado”. É notória a distinção entre os queijos A28 e V28 em relação ao queijo V30, particularmente nos atributos relacionados com o sabor. Assim, os queijos A28 e V28 são associados a sabores agradáveis e equilibrados.

A Figura 23 mostra uma relação entre as variáveis sensoriais (Atributos), o mapa da APG (APG_Map), os resultados obtidos pela análise da textura (Instron) e a preferência global (Preferência), resultado da aplicação da análise fatorial múltipla (AFM) que permite analisar dados qualitativos e quantitativos. Esta técnica, proposta por Escofier & Pages (1985), permite integrar diferentes grupos de variáveis que descrevem a mesma observação. Assim, numa primeira fase, é necessário tornar os grupos de variáveis comparáveis pela normalização das variáveis através da análise dos componentes principais (ACP) havendo, após esta normalização, uma nova ACP (Abdi & Valentin, 2007). Esta análise fatorial múltipla foi efetuada com base na matriz composta pelos dois principais fatores da análise procrustes generalizada (F1 e F2), os valores dos atributos, os valores da textura, e a preferência global.

Pode-se verificar que o fator 1 se correlaciona, positivamente, essencialmente com atributos que caracterizam a textura e o sabor, nomeadamente “textura uniforme” e “sabor simples”, e negativamente com os atributos “textura borracha” e “sabor a ervas aromáticas”, enquanto o fator 2 se correlaciona com atributos que caracterizam o sabor, o aspeto e o odor, estando altamente correlacionado com os atributos “sabor picante” e “aspeto equilibrado”, e negativamente correlacionado com os atributos “sabor pouco intenso” e “odor intenso”.

Em relação à preferência global, negativamente correlacionada com o fator 2, verifica-se a oposição aos resultados da textura, ou seja, a preferência global está associada a queijos de textura mais mole cujas forças máximas e módulos de Young são menores. Os atributos que mais se correlacionam com a preferência global são “odor agradável”, “textura mole”, “textura aveludada”, “textura cremosa”, “aspeto amarelo claro”, entre outros. Por outro lado, os atributos que menos se correlacionam

com a preferência global são “odor pouco intenso”, “aspeto amarelo” e “sabor salgado”.

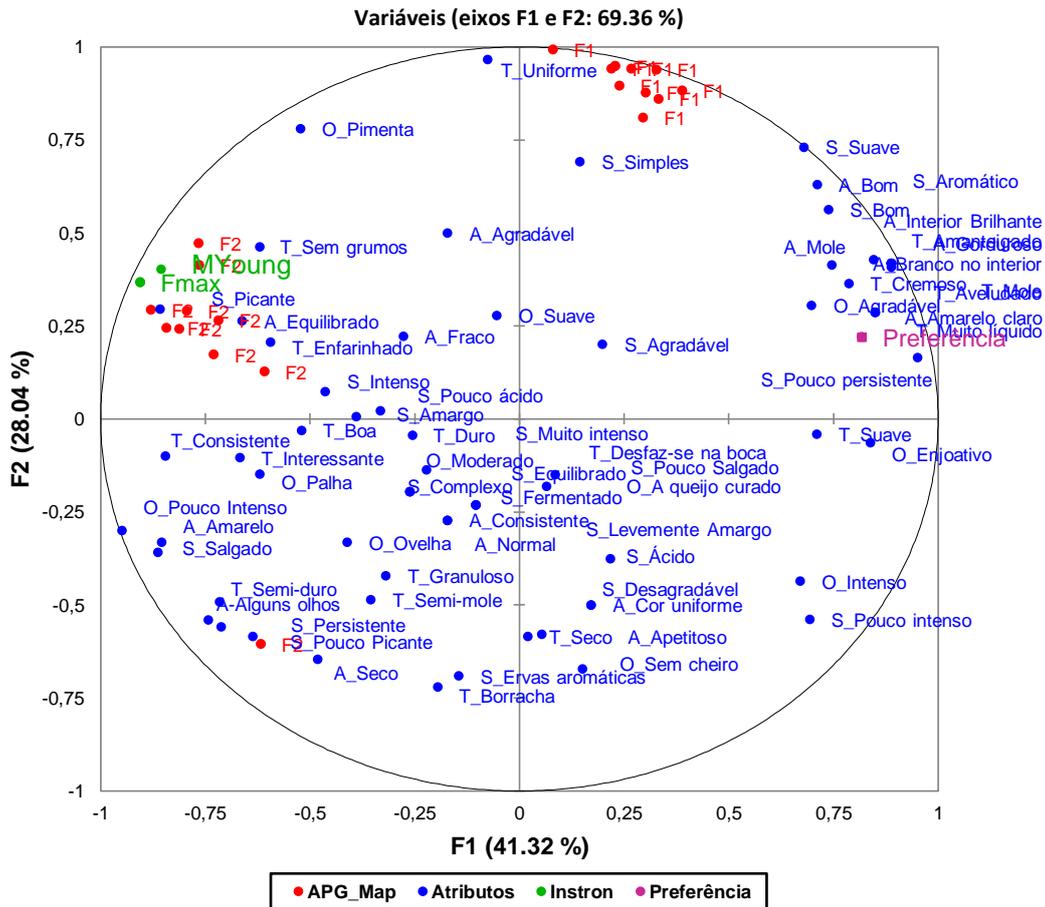


Figura 23 - Relação entre atributos sensoriais e análise de textura
 Legenda: O – odor, T – textura, S – sabor, A – aparência

A Figura 24 mostra as coordenadas das nuvens parciais, dos diferentes queijos, relacionando a localização espacial dos queijos com os atributos e os resultados da análise da textura. Pode-se verificar que os queijos PD e QV apresentam uma nuvem mais dispersa dos que os restantes, evidenciando uma variação mais elevada nas relações entre atributos, textura e localização. Relativamente aos queijos experimentais, observam-se nuvens mais coesas que indicam maior consenso entre as relações de atributos, textura e localização. Há uma sobreposição das nuvens dos queijos A28, A30 e V28 realçando-se um ligeiro afastamento da nuvem do queijo V30.

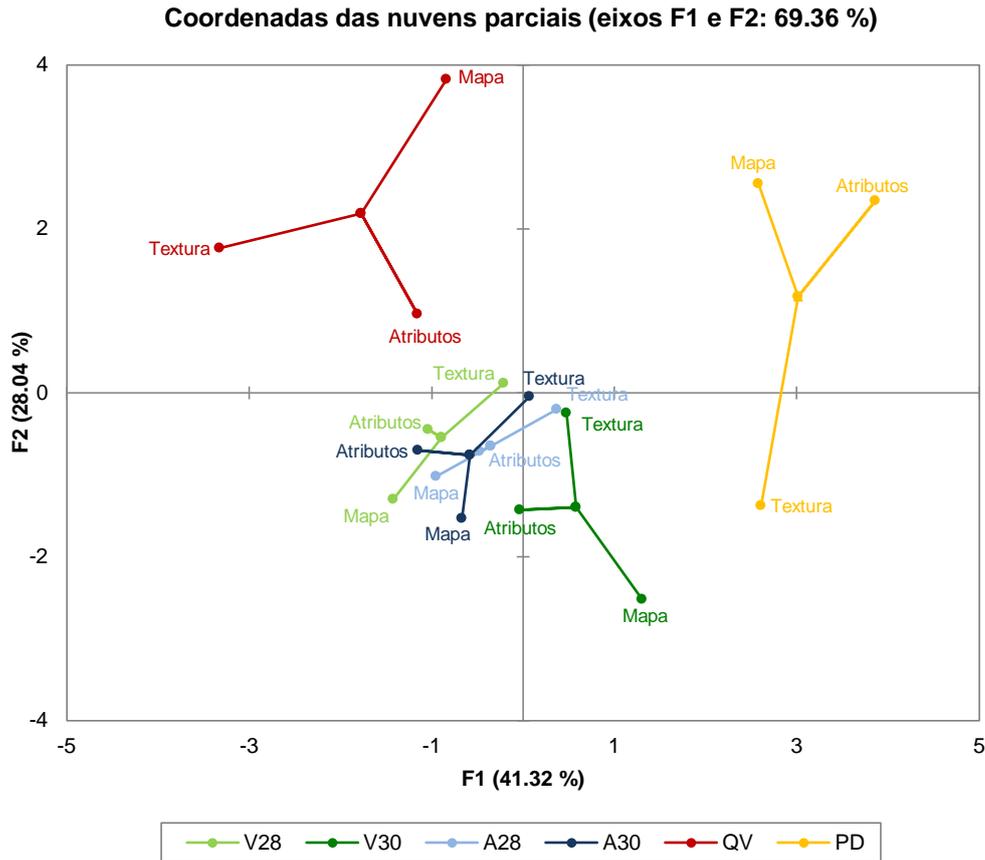


Figura 24 – Coordenadas dos diferentes queijos

Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Para além dos mapeamentos projetivos, efetuaram-se testes de preferência global por ordenação forçada do queijo menos apreciado até ao mais apreciado. Para ambos os dias somaram-se os rankings obtidos, por cada provador, para cada queijo (Quadro 15).

Quadro 15 – Somatório dos rankings por queijo por dia

Queijo	$\sum_{i=1}^{12} R_i$	
	1º dia	2º dia
V28	39	44
V30	32	38
A28	48	45
A30	32	39
QV	37	30
PD	64	56

Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Com base nestes valores efetuaram-se, para os dois dias, testes de Tukey para comparação dos queijos dois a dois. Para isso utilizou-se o procedimento de comparação múltipla baseado na diferença crítica ou *least significant difference* (LSD), dado pela equação:

$$LSD = Z_{[1-\alpha]} \sqrt{\frac{n \cdot k \cdot (k + 1)}{6}}$$

Onde $Z_{[1-\alpha]}$ representa o quantil da distribuição Z para uma significância α (neste caso $\alpha = 0,05$), n é o número de provadores ($n = 12$) e k refere-se ao número de amostras ($k = 6$). Nestas condições, o valor obtido para a LSD foi 15,08, o que significa que só existem diferenças significativas entre queijos cuja diferença das somas dos rankings seja superior à LSD. Os Quadro 16 e o Quadro 17 resumem os valores obtidos nos testes de Tukey para os dois dias.

Quadro 16 - Resultados do teste de Tukey para o 1º dia, com a respetiva análise por grupos

Queijo	V30	A30	QV	V28	A28	PD	Grupo
V30	-	0	5	7	16	32	a
A30		-	5	7	16	32	a
QV			-	2	11	27	a b
V28				-	9	25	a b
A28					-	16	b
PD						-	c

Nota: A tabela está ordenada, de forma crescente, consoante o somatório dos rankings. A negrito encontram-se os valores cuja diferença de rankings é superior à LSD.

Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

Quadro 17 – Resultados do teste de Tukey para o 2º dia, com a respetiva análise por grupos

Queijo	QV	V30	A30	V28	A28	PD	Grupo
QV	-	8	9	14	15	26	a
V30		-	1	6	7	18	a
A30			-	5	6	17	a
V28				-	1	12	a b
A28					-	11	a b
PD						-	b

Nota: A tabela está ordenada, de forma crescente, consoante o somatório dos rankings. A negrito encontram-se os valores cuja diferença de rankings é superior à LSD.

Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce.

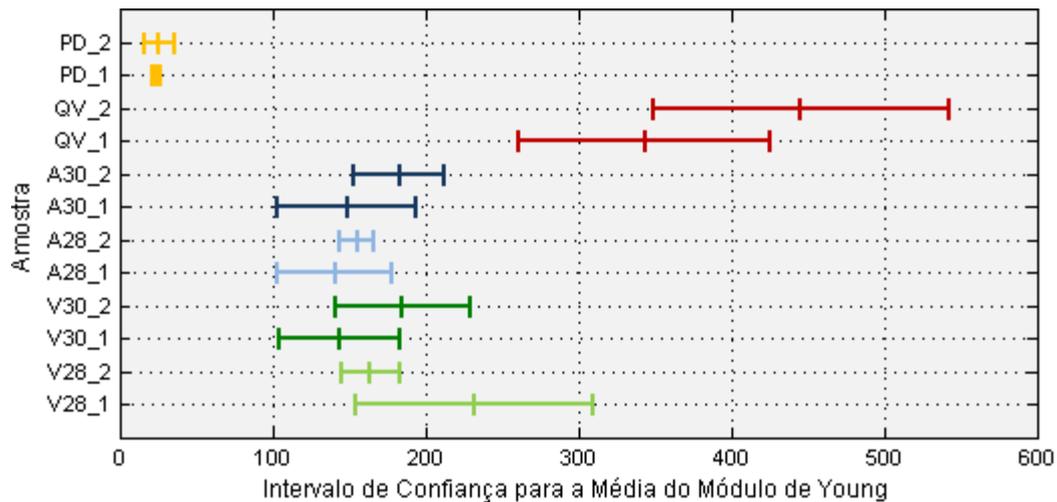
Observando os valores obtidos verificaram-se bastantes semelhanças entre os dois dias, nomeadamente na ordenação crescente do somatório dos rankings de cada queijo mantendo-se a mesma ordem nos dois dias com exceção do queijo da Queijaria Vaz (QV). O queijo do Pingo Doce (PD) apresenta um número mais elevado de diferenças significativas quando comparado com os restantes queijos, destacando-se no primeiro dia onde se registam diferenças significativas entre todos os queijos. De uma forma geral, pode-se verificar que os queijos da Queijaria Vaz (QV), de coalho vegetal a 30 °C (V30) e de coalho animal a 30 °C (A30), não exibem diferenças significativas entre eles. Os queijos de coalho vegetal a 28 °C (V28) e coalho animal a 28 °C (A28) formam um outro grupo de queijos que se distancia um pouco dos anteriores e se aproxima do queijo do Pingo Doce (PD), não se evidenciando diferenças significativas entre estes queijos no 2º dia.

De uma forma geral, pode-se verificar que há uma percepção de diferenças entre o queijo do Pingo Doce (PD) e os restantes queijos. Os queijos fabricados a 28 °C (V28 e A28) tendem a aproximar-se do queijo do Pingo Doce (PD), destacando-se dos queijos fabricados a 30 °C (V30 e A30) e do queijo da Queijaria Vaz (QV).

No segundo dia de provas sensoriais efetuou-se um teste triangular entre amostras de queijos fabricados na Queijaria Vaz (QV) e os queijos produzidos com coalho vegetal a 27 °C com recurso aos equipamentos da queijaria (QVC). O objetivo desta prova consistia em verificar se eram detetadas diferenças entre os dois queijos. Obtiveram-se 10 respostas corretas e 2 incorretas na identificação da amostra diferente. Com estes valores efetuou-se um teste χ^2 cujo valor obtido foi 11,34. Para um nível de confiança de 95%, com um grau de liberdade, a área de rejeição é superior a 3,84. Assim, rejeita-se a hipótese nula (H_0 : Não existem diferenças significativas entre as amostras), concluindo-se que, com 95% de confiança, existem diferenças significativas entre o queijo fabricado pela Queijaria Vaz (QV) e o queijo produzido no ensaio complementar com coalho vegetal a 27 °C (QVC).

Relativamente à análise de textura efetuada, na Figura 25 são apresentados os intervalos de confiança para a média do módulo de Young dos diferentes queijos, assumindo que os valores seguem uma distribuição normal. Analisando a Figura 25 observam-se 3 grupos distintos de queijos, onde se destacam (1) os queijos PD_1 e PD_2 (queijos do Pingo Doce para os dois dias), (2) os queijos QV_1 e QV_2 (queijos da queijaria Vaz fabricados nos dois dias) e (3) todos os queijos experimentais. Verifica-se, assim, uma diferença significativa (95% confiança) na textura entre os queijos da Queijaria Vaz (QV_1 e QV_2) e os queijos do Pingo Doce (PD_1 e PD_2).

Em relação aos queijos experimentais não existem diferenças significativas (95% de confiança) entre eles para a média do módulo de Young. Porém, entre os queijos experimentais e os restantes queijos (queijos do Pingo Doce e queijos da Queijaria Vaz) observam-se diferenças significativas (95% de confiança) com exceção do queijo V28_1 (queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C no primeiro dia), cujo intervalo de confiança para a média do módulo de Young se sobrepõe ao do queijo QV_1 (queijo da Queijaria Vaz do primeiro dia), revelando uma aproximação entre a textura destes dois queijos, não existindo diferenças significativas entre as suas texturas (95% de confiança).

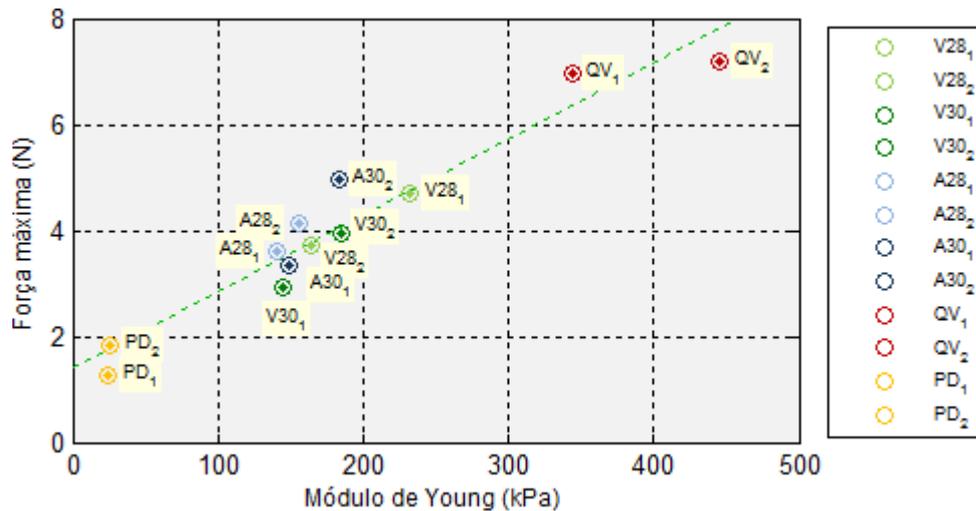


Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce; índice 1: queijos referentes ao primeiro dia de fabrico/análise; índice 2: queijos referentes ao segundo dia de fabrico/análise.

Figura 25 – Intervalo de confiança para a média do módulo de Young

As diferenças mencionadas são realçadas na Figura 26 onde é apresentado um gráfico da força máxima exercida em função do módulo de Young.

Em termos de textura os queijos experimentais aproximam-se mais dos queijos do Pingo Doce (PD_1 e PD_2) do que dos queijos da Queijaria Vaz (QV_1 e QV_2), sendo o queijo V28_1 (queijo fabricado com coalho vegetal a 28°C no primeiro dia) o que mais se aproxima destes últimos.



Legenda: V28: queijo fabricado com coalho vegetal a 28 °C; V30: queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C; A28: queijo fabricado com coalho animal a 28 °C; A30: queijo fabricado com coalho animal a 30 °C; QV: queijo da Queijaria Vaz; PD: queijo do Pingo Doce; índice 1: queijos referentes ao primeiro dia de fabrico/análise; índice 2: queijos referentes ao segundo dia de fabrico/análise.

Figura 26 – Força máxima em função do módulo de Young

Com base nos valores obtidos para o módulo de Young e para a força máxima exercida pela sonda, referentes a todos os queijos, efetuou-se uma regressão linear cujo coeficiente de determinação foi de 92,8%. Verifica-se assim que à medida que a força máxima exercida pela sonda aumenta, o módulo de Young também aumenta, correspondendo este aumento a queijos com texturas progressivamente mais duras.

Capítulo 5

Conclusão

“sic parvis magna” (Sir Francis Drake)

O presente trabalho teve como objetivo geral a definição das condições do processo de fabrico conducentes à obtenção de um queijo de textura mole, amanteigado, fabricado com leite de ovelha cru. Este objetivo assentou no interesse da Queijaria Vaz em diversificar os seus produtos que até então se cingem apenas a queijos de textura dura ou semidura.

Na primeira parte deste trabalho, revisão bibliográfica, relacionaram-se, de forma global, as necessidades nutricionais das ovelhas com as fases do ciclo produtivo em que se encontram. Mostrou-se que a qualidade do leite depende do teor em gordura e proteína, bem como da concentração de células somáticas, estando também relacionados com as propriedades de coagulação do leite. Conclui-se que a gordura é o componente do leite que mais facilmente se consegue alterar com a manipulação da alimentação e que a quantidade de gordura no leite influencia as propriedades reológicas e o comportamento ao longo da sinérese da coalhada e a textura dos queijos. A proteína é o componente do leite predominantemente responsável pela coagulação, dependendo o rendimento da coalhada do teor e do tipo de caseínas. Verificou-se que a presença do alelo D da caseína α_{s1} (variante “Welsh”) no leite é responsável por maiores tempos de coagulação e coalhadas mais suaves. Relativamente ao processo de coagulação realça-se, ainda, o papel importante do cálcio, cuja adição ao leite diminui o tempo de coagulação e aumenta o rendimento em queijo. Por outro lado, com um teor baixo de cálcio no leite obtêm-se queijos mais suaves e moles, a valores de pH superior a 5,0.

A segunda parte deste trabalho (trabalho experimental) iniciou-se com uma avaliação do regime alimentar fornecido às ovelhas e as suas necessidades

alimentares estimadas. Concluiu-se que a dieta não satisfaz as necessidades alimentares de ovelhas leiteiras, o que poderá conduzir a um nível de produção de leite abaixo do ótimo e à não obtenção do ciclo produtivo e reprodutivo ideal.

O leite utilizado nos ensaios experimentais apresentou teores em proteína e em gordura dentro do intervalo de valores esperado, com exceção da contagem de células somáticas, cujos valores muito elevados sugerem uma elevada incidência de mastites. Os dois ensaios preliminares realizados no sentido de avaliar um coalho comercial de origem vegetal, que nunca tinha sido utilizado na Queijaria Vaz, permitiram avaliar as condições do processo de fabrico a ser utilizado no ensaio principal.

Os queijos produzidos no ensaio principal foram avaliados em provas sensoriais e foram também medidas as suas texturas. Os resultados destas provas evidenciaram uma vincada separação, pelo painel, relativamente ao queijo comercial amanteigado, ao queijo fabricado na Queijaria Vaz e aos queijos experimentais. Através da análise da textura, com recurso ao cálculo do módulo de Young, verificou-se que o queijo mais amanteigado é o referido queijo amanteigado comercial e o queijo mais duro é o queijo fabricado na Queijaria Vaz, estando os restantes queijos experimentais entre ambos, mas mais aproximados do queijo amanteigado, com exceção feita para o queijo fabricado com coalho vegetal a 30 °C. Na prova sensorial, o painel aproximou os queijos fabricados com coalho animal a 28 °C do queijo amanteigado comercial.

Embora tenha sido possível ajustar algumas condições de fabrico para a produção de um queijo amanteigado, o objetivo não foi inteiramente alcançado. Como trabalho futuro sugere-se o estudo de outros coalhos vegetais comerciais, nomeadamente analisando a sua força e centrando o foco do estudo na relação da variação do pH ao longo das várias fases de coagulação do leite, na temperatura de coagulação e na concentração do coalho.

Referências

- Abdel-Mageed, I. I., El-Maaty, A. M. A., (2012): “The effect of backfat thickness at mating on the reproductive and productive performances of ewes”, *Small Ruminant Research*, 105, pp. 148-153.
- Abdi H., Valentin, D., (2007): “Multiple Factor Analysis (MFA)” in Salkind N., *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, SAGE Publication Inc, pp. 657-663, ISBN: 9781412916110.
- Addis, M., Piredda, G., Pirisi, A., (2008): “The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production”, *Small Ruminant Research*, 79, pp. 2-10.
- Albert, A., Varela, P., Salvador, A., Hough, G., Fiszman, S., (2011): “Overcoming the issues in the sensory description of hot served food with a complex texture. Application of QDA®, flash profiling and projective mapping using panels with different degrees of training”, *Food Quality and Preference*, 22, pp. 463-473.
- Amigo L., Recio I., Ramos M., (2000): “Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk - a review”, *International Dairy Journal*, 10, pp.135-149.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & O’Brien, E. A., (2001): “The MEROPS Database as a Protease Information System”, *Journal of Structural Biology*, 134, pp. 95-102.
- Bencini, R., (2002): “Factors affecting the clotting properties of sheep milk”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, pp. 705-719.
- Benedito, J., Carcel, J. A., Gonzalez, R., Mulet, A., (2002): “Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes”, *Ultrasonics*, 40, 19-23.
- Berridge, N. J., (1957): “Some observation on the determination of the activity rennet”. *Analyst*, 77, pp. 57–62.

- Berthelot, X., Lagriffoul, G., Concordet, D., Barillet, F., Bergonier, D., (2006): "Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk", *Small Ruminant Research*, 62, pp. 27-31.
- Blache, D., Maloney, S. K., Revell, D. K., Cannas, A., (2008): "Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats", *Animal Feed Science and Technology*, 147, pp. 140-157.
- Bittante, G., (2011): "Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk", *Journal of Dairy Science*, 94, pp. 5821-5832.
- Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, (2012): "Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties", *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 6843-6870.
- Blache, D., Maloney, S. K., Revell, D. K., Cannas, A., (2008): "Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats", *Animal Feed Science and Technology*, 147, pp. 140-157.
- Bornaz, S., Guizani, N., Fellah, N., Sahli, A., Slama, M. B., Attia, H., (2010): "Effect of Plant Originated Coagulants and Chymosin on Ovine Milk Coagulation", *International Journal of Food Properties*, 13:1, pp. 10-22.
- Budelli, E., Bernal, M., Lema, P., Fink, M., Negreira, C., Tanter, M., Gennison, J. L., (2014): "Use of shear wave elastography for monitoring enzymatic milk Coagulation", *Journal of Food Engineering*, 136, 73-79.
- Campbell, J.R., Marshall, R.T., (1975): "The Science of Providing Milk for Man", McGraw-Hill, New York, pp. 801.
- Cooper, C., Corredig, M., Alexander, M., (2010): "Investigation of the Colloidal Interactions at Play in Combined Acidification and Rennet of Different Heat-Treated Milks", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 4915-4922.
- Dimitreli, G., Thomareis, A. S., (2007): "Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity", *Journal of Food Engineering*, 79, pp. 1364-1373.
- Duehlmeier, R., Fluegge, I., Schwert, B., Parvizi, N., Ganter, M., (2011): "Metabolic adaptations to pregnancy and lactation in German Blackheaded Mutton and Finn sheep ewes with different susceptibilities to pregnancy toxemia", *Small Ruminant Research*, 96, pp. 178-184.

- Féernandez-Salguero, J., Prados, F., Calixto, F., Vioque, M., Sampaio, P., Tejada, L., (2003): "Use of Recombinant Cyprosin in the Manufacture of Ewe's Milk Cheese", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, pp. 7426-7430.
- Forsbäck, L., Lindmark-månsson, H., Svennersten-Sjaunja, K., Larsen, L. B., Andrén, A., (2011): "Effect of storage and separation of milk at udder quarter level on milk composition, proteolysis, and coagulation properties in relation to somatic cell count", *Journal of Dairy Science*, 94, pp. 5341-5349.
- Fox, P. F., (1989): "Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening", *Journal of Dairy Science*, 72, pp. 1379-1400.
- Galán, E., Prados, Pino, A., F., Tejada, L., Féernandez-Salguero, J., (2008): "Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk", *International Dairy Journal*, 18, pp. 93-98.
- Galán, E., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J., (2012): "Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture Thereof", *International Dairy Journal*, 25, pp. 92-96.
- Geary, U., Lopez-Villalobos, N., Garrick, D.J., Shalloo, L., (2010): "Development and application of a processing model for the Irish dairy industry", *Journal of Dairy Science* 93, pp. 5091–5100.
- González-García, S., Castanheira, E. G., Dias, A. C., Arroja, L., (2013): "Environmental performance of a Portuguese mature cheese-making dairy mil", *Journal of Cleaner Production*, 41, pp. 65-73.
- Górová R., Pavlíková, E., Blaško J., Mel'uchova, B., Kubinec, R., Margetín, M., Soják, L., (2011): "Temporal variations in fatty acid composition of individual ewes during first colostrum day", *Small Ruminant Research*, 95, pp. 104-112.
- Gunasekaran, S., Ay, C., (1995): "Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics", *Journal of Food Process Engineering*, 19, pp. 63-73.
- INE, IP, (2014): "Estatísticas Agrícolas 2013", Lisboa, Portugal, pp. 39.
- IDF, 2006. Milk and milk products – ovine and caprine rennets – determination of total milk-clotting activity, International Dairy Federation, Standard 199/ISO 23058, Brussels.

- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., Torre, P., (2001): "Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese", *Food Chemistry*, 72, pp. 137-144.
- Jaeggi, J. J., Govindasamy-Lucey, S., Berger, Y. M., Johnson, M. E., McKusick, B. C., Thomas, D. L., Wendorff, W. L., (2003): "Hard Ewe's Milk Cheese Manufactured from Milk of Three Different Groups of Somatic Cell Counts", *Journal of Dairy Science*, 86, pp. 3082-3089.
- Jarrige, R., (1988): "Alimentação dos Bovinos, Ovinos e Caprinos", Publicações Europa-América, Lisboa, pp. 459.
- Jenkins, T.C., McGuiet, M. A., (2006): "Major advances in Nutrition: Impact on Milk Composition", *Journal of Dairy Science*, 89, pp. 1302-1310.
- Jensen, R. G., (1964): "Lipolysis", *Journal of Dairy Science*, 47, pp. 210-215.
- Kowalchuk, A. W., Olson, N. F., (1977): "Effects of pH and Temperature on the Secondary Phase of Milk Clotting by Rennet", *Journal of Dairy Science*, 60, pp. 1256-1259.
- Lopez, C., Dufour, E., (2001): "The Composition of the Milk Fat Globule Surface Alters the Structural Characteristics of the Coagulum", *Journal of Colloid and Interface Science*, 233, pp. 241-249.
- Lucey, J. A., Fox, P. F., (1993): "Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review", *Journal of Dairy Science*, 76, pp. 1714-1724.
- Macedo, A. C., Malcata, F. X., Oliveira, J. C., (1993a): "The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese: A Review", *Journal of Dairy Science*, 76, pp. 1725-1739.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., Pires, E. M., (1993b): "Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward Bovine K-Casein", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp. 1537-1540.
- Marilley, L., Casey, M. G., (2004): "Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains", *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp. 139-159.
- Mcdonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., (2011): "Animal Nutrition", Prentice Hall, 7th Edition, pp. 692.
- McMahon, D. J., Brown, R. J., (1984): "Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review", *Journal of Dairy Science*, 67, pp. 919-929.

- McMahon, D. J., Richardson, G. H., Brown, R. J., (1984): "Enzymic Milk Coagulation: Role of Equations Involving Coagulation Time and Curd Firmness in Describing Coagulation", *Journal of Dairy Science*, 67, pp. 1185-1193.
- McMahon, D. J., Paulson, B., Oberg, C. J., (2005): "Influence of Calcium, pH, and Moisture on Protein Matrix Structure and Functionality in Direct-Acidified Nonfat Mozzarella Cheese", *Journal of Dairy Science*, 88, pp.3754-3763.
- McSweeney, P. L. H., (2004): "Biochemistry of cheese ripening", *International Journal of Dairy Technology*, 57, pp. 127-144.
- McWilliam, E.L., Barry, T. N., Lopez-Villalobos, N., Cameron, P.N., Kemp, P.D., (2004): "The effect of different levels of poplar (*Populus*) supplementation on the reproductive performance of ewes grazing low quality drought pasture during mating", *Small Ruminant Research*, 115, pp. 1-18.
- Michaelidou, A. M., (2008): "Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products", *Small Ruminant Research*, 79, pp. 42-50.
- Moioli, B., Pilla, F., Tripaldi, C., (1998): "Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review", *Small Ruminant Research*, 27, pp. 185-195.
- Moschopoulou, E., (2011): "Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production", *Small Ruminant Research*, 101, pp. 188-195.
- Murtaza, M. A., Ur-rehman, S., Anjum, F. M., Huma, N., Hafiz, I., (2014): "Cheddar Cheese Ripening and Flavor Characterization: A Review", *Food Science and Nutrition*, 54, pp. 1309-1321.
- Nájera, A. I., Renobales, M., Barron, L. J. R., (2003): "Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study", *Food Chemistry*, 80, pp. 345-352.
- National Research Council, (1995): "Nutrient Requirements of Sheep", Sixth Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C..
- Nestrud, A. M., Lawless, H. T., (2010): "Perceptual mapping of apples and cheeses using projective mapping and sorting", *Journal of Sensory Studies*, 25, pp. 390-405.
- Njoya, A., Awa, D. N., Chupamom, J., (2005): "The effects of a strategic supplementation and prophylaxis on the reproductive performance of primiparous

- Fulbe ewes in the semi-arid zone of Cameroon”, *Small Ruminant Research*, 56, pp. 21-29.
- Ocak, N., Cam, M. A., Kuran, M., (2005): “The effect of high dietary protein levels during late gestation on colostrum yield and lamb survival rate in singleton-bearing ewes”, *Small Ruminant Research*, 56, pp. 89-94.
- Osintsev, A. M., Qvist, K. B., (2004): “Study of the Mechanism of the Proteolytic Stage of Enzymatic Coagulation of Milk Casein”, *Colloid Journal*, 66, pp. 192-196.
- Othmane, M. H., Carriedo, J. A., Fuente Crespo, L. F., San Primitivo, F., (2002): “An individual laboratory cheese-making method for selection in dairy ewes”, *Small Ruminant Research*, 45, pp. 67-73.
- Owens, F. N., Sapienza, D. A., Hassen, A. T., (2010): “Effect of nutrient composition of feeds on digestibility of organic matter by cattle: A review”, *Journal of Animal Science*, 88, pp. E151-E169.
- Panagopoulou, M. A., Stergiou, D. V., Roussis, I. G., Prodromidis, M. I., (2010): “Impedimetric Biosensor for the Assessment of the Clotting Activity of Rennet”, *Analytical Chemistry*, 82, pp. 8629-8636.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein J. F. W., (2007): “Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk”, *Small Ruminant Research*, 68, pp. 88-113.
- Pastorino, A. J., Ricks, N. P., Hansen, C. L., McMahon, D. J., (2003): “Effect of Calcium and Water Injection on Structure-Function Relationships of Cheese”, *Journal of Dairy Science*, 86, pp. 105-113.
- Pazzola, M., Dettori, M. L., Cipolat-Gotet, C., Cecchianato, A., Bittante, G., Vacca, G. M., (2014): “Phenotypic factors affecting coagulation properties of milk from Sarda ewes”, *Journal of Dairy Science*, 97, pp. 1-11.
- Perea, S., Labastida, E. F., Nájera, A. I., Chávarri, F., Virto, M., Renobales, M., Barron, L. J. R., (2000): “Seasonal changes in the fat composition of Lacha sheep’s milk used for Idiazabal cheese manufacture”, *European Food Research and Technology*, 210, pp. 318-323.
- Pereira, C. I., Gomes, E. O., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., (2008): “Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture”, *Food Chemistry*, 108, pp. 862-868.

- Picon, A., Fernandez, J., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M., (1999): "Short Communication: Stability of Chymosin and Cyprosins Under Milk-Coagulation and Cheese-Ripening Conditions", *Journal of Dairy Science*, 82, pp. 2331-2333.
- Prados, F., Pino, A., Fernández-Salguero, J., (2007): "Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese", *International Journal of Food Science and Technology*, 42, pp. 556-561
- Pretto, D., Kaart, T., Vallas, M., Jõudu, I., Henno, M., Ancilotto, L., Cassandro, M., Pärna, E., (2011): "Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies", *Journal of Dairy Science*, 94, pp. 4336-4346.
- Pulina, G., Nudda, A., Battaccone, G., Cannas, A., (2006): "Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk", *Animal Feed Science and Technology*, 131, pp. 255-291.
- Rayburn, E., (2003): "Sampling Pastures for Nutritive Analysis", *Forage Management*, WVU Extension Forage Agronomist.
- Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., De Crémoux, R., Gonzalo, C., (2007): "Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspect", *Small Ruminant Research*, 68, pp. 126-144.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., (2008): "Composition of goat and sheep milk products: An update", *Small Ruminant Research*, 79, pp. 57-72.
- Roa, I., López, M. B., Mendiola, F. J., (1999): "Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese", *Food Research International*, 32, pp. 413-419.
- Robinson, J. J., Ashworth, C. J., Rooke, J. A., (2006): "Nutrition and fertility in ruminant livestock", *Animal Feed Science and Technology*, 126, pp. 259-276.
- Rank, T. C., Grappin, R., Olson, N. F., (1985): "Secondary Proteolysis of Cheese During Ripening: A Review", *Journal of Dairy Science*, 68, pp. 801-805.
- Reis, P. J. M., Malcata, F. X., (2007): "Improvements in small scale artisanal cheesemaking via a novel mechanized apparatus", *Journal of Food Engineering*, 82, pp. 11-16.

- Reis, P. J. M., Malcata, F. X., (2011a): "Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks", *Small Ruminant Research*, 101, pp. 122-123.
- Reis, P. J. M., Malcata, F. X., (2011b): "Ripening-related changes in Serra da Estrela cheese: a stereological study", *American Dairy Science Association*, 94, pp. 1223-1238.
- Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Freitas, A. C., Gomes, A. M. P., Duarte, A. C., (2012): "Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods", *Analytical Chemistry*, 41, pp. 27-45.
- Rosa, H. J. D., Bryant, M. J., (2003): "Seasonality of reproduction in sheep", *Small Ruminant Research*, 48, pp. 155-171.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., Wilbey, A., (2003): "Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses", *International Journal of Dairy Technology*, 56, pp. 76-85.
- Sá, F., Barbosa, M., (1990): "O leite e os seus produtos", Clássica Editora, 5ª Edição, Lisboa, pp. 511.
- Sampelayo, M. R. S., Chilliard, Y., Schmidely, Ph., Boza, J., (2007): "Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk", *Small Ruminant Research*, 68, pp. 42-63.
- Sandra, S., Ho, M., Alexander, M., Corredig, M., (2012): "Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy", *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 75-82.
- Santos, B. A., Pollonio, M. A. R., Cruz, A. G., Messias, V. C., Monteiro, R. A., Oliveira, T. L. C., Faria, J. A. F., Freitas, M. Q., Bolini, H. M. A., (2013): "Ultra-flash profile and projective mapping for describing sensory attributes of prebiotic mortadellas", *Food Research International*, 54, pp. 1705-1711.
- Silva, S. V., Malcata, F. X., (2005): "Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*", *Food Chemistry*, 89, pp.19-26.
- Sormunen-Cristian, R., Ketoja, E., Hepola, H., (1997): "Sufficiency of the energy and protein standards for lactation of adult multiparous Finnish Landrace ewes", *Small Ruminant Research*, 26, pp. 223-237.
- Soxhlet, F., (1877): "Die Darstellung haltbarer Labflüssigkeiten". *Milch-Ztg*, 6, pp. 497-501.

- Sousa, M. J., Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., (2001): "Advances in the study of proteolysis during cheese ripening", *International Dairy Journal*, 11, pp. 327-345.
- Spanu, C., Berger, Y. M., Thomas, D. L., Ruegg, P. L., (2011): "Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes", *Small Ruminant Research*, 97, pp. 139-145.
- Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Bielińska, S., Stanisław, M., Wójtowski, J., (2011): "Camelina sativa cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, pp. 2031-2037.
- Tabayehnejad, N., Castillo, M., Payne, F. A., (2012): "Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method", *Journal of Food Engineering*, 108, pp. 549-556.
- Tavaria, F. K., Sousa, M. J., Malcata, F. X., (2001): "Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins", *Food Chemistry*, 72, pp. 79-88.
- Tejada, L., Fernández-Salguero, J., (2003): "Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (los pedroches) made with a Powdered vegetable coagulant or calf rennet", *Italian Journal of Food Science*, vol. 15 (1).
- Trujillo, A. J., Buffa, M., Casals, I., Fernández, P., Guamis, B., (2002): "Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated Milk", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, pp. 309-319.
- Vatankhah, M., Salehi, S. A., (2010): "Genetic and non-genetic factors affecting Lori-Bakhtiari ewe body weight and its relationship with productivity", *Small Ruminant Research*, 94, pp. 98-102.
- Vatankhah, M., Talebi, M. A., Zamani, F., (2012): "Relationship between ewe body condition score (BCS) at mating and reproductive and productive traits in Lori-Bakhtiari sheep", *Small Ruminant Research*, 106, pp. 105-109.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., (1991). Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

- Walton, J. C., Weil, Z. M., Nelson, R. J., (2011): "Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function", *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32, pp. 303-319.
- Wilkinson, C., Schipper, M., Leguijt, T., (2000): "Weighted analysis for missing values in generalized procrustes Analysis", *Food Quality and Preference*, 11, pp. 85-90.
- Ye, A., Cui, J., Singh, H., (2011): "Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during in vitro gastric digestion of milk", *Journal of Dairy Science*, 94, pp. 2762–2770.
- Zhang, R. H., Mustafa, A. F., Zhao, X., (2006): "Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese", *Animal Feed Science and Technology*, 127, pp. 220-233.