



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NAS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE DE  
OVELHA E DO REQUEIJÃO CREMOSO**

DANIELLE SPECHT MALTA

PINHALZINHO, 2019



**DANIELLE SPECHT MALTA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE DE OVELHA E DO REQUEIJÃO CREMOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Elisandra Rigo

Coorientadora: Dra. Darlene Cavalheiro

**Pinhalzinho, SC  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo (a) autor (a), com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Malta, Danielle Specht

Influência dos métodos de conservação nas características físico-químicas do leite de ovelha e do requeijão cremoso / Danielle Specht Malta. -- 2019.

111 p.

Orientadora: Elisandra Rigo

Coorientadora: Darlene Cavalheiro

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2019.

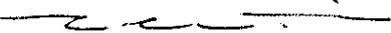
1. Estabilidade. 2. Refrigeração. 3. Congelamento. 4. Legislação. 5. Queijo processado. I. Rigo, Elisandra. II. Cavalheiro, Darlene. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

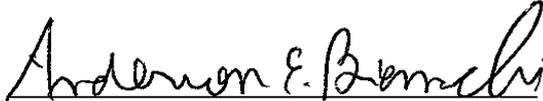
**DANIELLE SPECHT MALTA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE DE OVELHA E DO REQUEIJÃO CREMOSO**

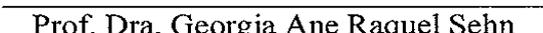
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora:

  
Prof. Dra. Elisandra Rigo – Orientadora  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

  
Prof. Dr. Anderson Elias Bianchi  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

  
Prof. Dra. Alline Artigiani Lima Tribst  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

  
Prof. Dra. Georgia Ane Raquel Sehn  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Pinhalzinho - SC, 07 de março de 2019**



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela vida, por ter me auxiliado a chegar até aqui.

À minha família, por acreditar em mim, me incentivar e consolar nos momentos mais difíceis. Sem vocês, tudo ficaria mais difícil. Mesmo longe pela distância, estavam perto. Sinto saudade, ainda bem que existe tecnologia para podermos nos ver. Mãe e Ari, obrigada por ter me visitado! A cidade de Pinhalzinho é incrível, só não tem o mar perto... Nati obrigada por todo apoio e ser a administradora das minhas finanças! Tenho muita gratidão por todo apoio que vocês me dão. Mãe, Pai, Natali, Ariane, Thaís, Alessandra, Vó Hydê, sem vocês, eu nada seria. Aos meus pequenos Manu, tu és o orgulho dessa mana! Marina, Mathias e Thomas estarei sempre no coraçãozinho de vocês. Amo vocês!

Ao meu namorado, Lucas Fioreze, pelas ajudas a todo momento, sendo companheiro e me dando apoio quando eu mais precisava neste período, obrigada por ser tão parceiro e poder partilhar da sua família tão querida.

Ao meu tio Dargel, tia Marion e meus primos por todo acolhimento em Chapecó, adorei ter a chance de poder conviver um pouco com vocês. Sentirei saudades.

Às minhas orientadoras Elisandra Rigo e Darlene Cavalheiro, pelas contribuições tanto profissionais, quanto pessoais, pelos apoios, guloseimas, incentivos, e puxadas de orelha, caronas, me “carregando” pra lá e pra cá! Tenho certeza que amadureci muito ao longo deste período de “incubação”... E que apesar das dificuldades atribuídas as inúmeras tarefas diárias, vocês puderam contribuir com meu crescimento, me auxiliando sempre que possível.

Às minhas companheiras de trabalho Mônica, Bruna e Alexandra, obrigada pelas ajudas nos experimentos, vocês contribuíram muito pelo trabalho, sou eternamente grata a vocês. À Larissa, minha companheira de laboratório e colega de mestrado, obrigada por me ajudares, por ser essa colega tão querida e cheirosa, sempre lembrando o “cheiro de mãe”. À Estela e Fernanda pelos ensinamentos adquiridos e por me apresentarem o QUALIAL...

Aos colegas de mestrado pelas caronas, apoios, contribuições, ajuntamentos e viagens.

À Gabrielle Victória Gautério, por todo conhecimento passado e a inspiração em seguir a área acadêmica.

As minhas colegas e amigas Fernanda, Thais e Carol por todo incentivo e amizades.

À ICL pelo fornecimento dos sais fundentes, auxílios técnicos, mostrando-se sempre solícitos.

Ao Anderson Elias Bianchi pelo fornecimento dos leites de ovelha, pelas contribuições ao longo do trabalho, mostrando-se solícito.

Aos membros da banca, pelas contribuições no trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

À Sandy e a Rosi pelas ajudas com a eletroforese, pois sem vocês as bandas não teriam ficado “divas”!

Ao professor Rafael pelas análises “intermináveis” de minerais...

À professora Andréia pelas ajudas, sempre companheira nas viagens do mestrado e contribuindo no que for preciso. As professoras Georgia e Marlene pelas conversas e contribuições.

Ao pessoal do MICROLAB, LABQUAL e BIOLAB pelas contribuições nas análises.

Aos vigilantes e prestadores de serviço terceiros pelo companheirismo e pelas boas risadas ao longo dos dias mais loucos e cansativos.

Ao Bibliotecário Orestes por todas contribuições na dissertação.

Às secretárias do PPGCTA Ana e Patricia sempre me ajudando no que for preciso.

Ao pessoal da Geração Cursos, por ter me acolhido no período sem bolsa no início do mestrado e pelas boas amizades feitas por lá.

Em suma, a todos que fizeram parte deste processo, visto que só cheguei até aqui pela soma de meu esforço e o auxílio de cada um.

## RESUMO

O leite de ovelha possui características peculiares que lhe torna uma excelente matriz para elaboração de derivados. E com isso, é de extrema importância estabelecer métodos de conservação, a fim de possibilitar aos ovinocultores alternativas que viabilizem a produção, tornando o volume produzido e sua qualidade viáveis para a comercialização ou processamento. Além disso, o Brasil não apresenta uma legislação específica, sendo necessário estabelecer normas em relação à condução do rebanho, produção, conservação e transporte para o leite de ovelha. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características físico-químicas do leite de ovelha fresco, refrigerado e congelado e a influência dos processos de conservação na elaboração de requeijão cremoso. Desta forma, o leite de ovelha da raça Lacaune foi caracterizado em relação a diversos parâmetros para verificar a qualidade do leite fresco e a influência dos métodos de conservação ao longo do tempo de armazenamento, assim como os produtos obtidos a partir destes leites quando submetidos à refrigeração (4°C) por 10 dias e ao congelamento (-29,80 °C) por 90 dias. Ainda, avaliar a influência das estações do ano (outono, inverno, primavera e verão) na qualidade do leite. Os parâmetros analisados no leite de ovelha foram gordura, proteína, cinzas, sólidos totais, sólidos não gordurosos, minerais (sódio, potássio, cálcio e magnésio), pH, lactose, acidez, estabilidade térmica, contagem de mesófilos e psicotróficos, atividades proteolíticas e lipolíticas, e as frações de proteína por eletroforese. A massa de queijo, o soro e o requeijão cremoso foram caracterizados pelas mesmas análises físico-químicas anteriores, exceto acidez e lactose. Além do rendimento da massa de queijo, foram determinadas cor instrumental e análise do perfil de textura no requeijão cremoso. O leite de ovelha refrigerado por até 6 dias, a 4 °C, e congelado por até 90 dias, a -29,80 °C, manteve sua qualidade físico-química, frações proteicas, bem como as contagens microbianas. Por outro lado, o leite refrigerado por 10 dias apresentou alterações, especialmente degradação da k-caseína. Os métodos de conservação do leite de ovelha não comprometeram o rendimento da massa de queijo, mas ocorreram algumas modificações nos parâmetros físico-químicos desta, do soro e do requeijão cremoso, sendo mais evidentes nos elaborados com leite refrigerado por 10 dias. O congelamento, independentemente do tempo, ocasionou variações no perfil de textura do requeijão. Com relação as estações do ano, estas influenciaram todos os parâmetros avaliados para o leite de ovelha fresco, exceto lactose, acidez e cinzas. Cabe ressaltar que os resultados obtidos nesta pesquisa podem vir a contribuir com informações relevantes para a construção de uma legislação específica ao leite de ovelha no Brasil.

**Palavras-chave:** Estabilidade. Refrigeração. Congelamento. Legislação. Queijo Processado.



## ABSTRACT

Sheep milk has peculiar characteristics that become it an excellent matrix for the elaboration of derivatives. Therefore, it is extremely important to establish conservation methods in order to enable the sheep farmers have alternatives for viable production, obtaining the volume produced and its quality adequate for commercialization or processing. In addition, Brazil does not have specific legislation, and it is necessary to establish standards regarding herd management, production, conservation and transportation for sheep's milk. In this way, the objective of the present study was to evaluate the physicochemical characteristics of fresh, chilled and frozen sheep's milk and the influence of conservation processes on the elaboration of "requeijão cremoso". Lacaune sheep milk was characterized in relation to several parameters to verify the quality of fresh milk and the influence of the conservation methods along the storage time, as well as the products obtained from these milks when submitted to refrigeration (4 °C) until 10 days and freezing (-29,8 °C) until 90 days. Also, to evaluate the influence of the seasons of the year on milk quality. The parameters analyzed in sheep's milk were fat, protein, ash, total solids, solids not-fat, minerals (sodium, potassium, calcium and magnesium), pH, lactose, acidity, thermal stability, mesophilic and psychrotrophic counts, proteolytic and lipolytic activities and protein fractions by electrophoresis. The fresh cheese, the whey and the "requeijão cremoso" were characterized by the same previous physicochemical analyzes, except for acidity and lactose. In addition to the yield of the fresh cheese, it was determined instrumental color and texture profile analyze for "requeijão cremoso". Sheep milk refrigerated for up to 6 days at 4 °C and frozen for up to 90 days at -29,8 °C, maintained its physicochemical quality, protein fractions, as well as microbial counts, on the other hand, milk refrigerated for 10 days showed changes, especially degradation of k-casein. The methods of conservation of sheep's milk did not compromise the yield of the fresh cheese, but there were some modifications in the physicochemical parameters of the whey and "requeijão cremoso", being more evident in those elaborated with milk refrigerated for 10 days. Freezing, regardless of the time, caused variations in the texture profile of the "requeijão cremoso". Regarding the seasons, these influenced all parameters evaluated for fresh sheep's milk, except for lactose, acidity and ashes. It should be emphasized that the results obtained in this research may contribute with information relevant to the elaboration of legislation specific to sheep's milk in Brazil.

**Keywords:** Stability. Refrigeration. Freezing. Legislation. Processed Cheese.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Representação das proteínas pela técnica de Eletroforese em gel SDS-PAGE no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo ..... 66
- Figura 2 – Análise dos componentes principais dos métodos de conservação do leite de ovelha (refrigerado (LR) e congelado (LC)) em relação ao leite fresco (LF) das bateladas coletadas em janeiro (Jan) e agosto (Ago) ..... 68
- Figura 3 – Comportamento do pH: (a) do leite de ovelha fresco (LF) e refrigerado por 6 e 10 dias (LR6 e LR10); massa de queijo (MQ) elaborada com leite fresco (MQLF) e refrigerado (MQLR6, MQLR10); requeijões cremosos (RC) obtidos das massas elaboradas com leite fresco (RCLF) e refrigerado (RCLR6 e RCLR10). (b) do leite de ovelha fresco (LF) e congelado por 30, 60 e 90 dias (LC30, LC60 e LC90); massa de queijo (MQ) elaborada com leite fresco (MQLF) e congelado (MQLC30, MQLC60 e MQLC90); requeijões cremosos (RC) obtidos das massas elaboradas com leite fresco (RCLF) e congelado (RCLC30, RCLC60 E RCLC90)... 72



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento das análises realizadas no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC), na massa de queijo (MQ), no soro (S) e no requeijão cremoso (RC) nos diferentes tipos de conservação, refrigeração (1 à 10 dias) e congelam .....	47
Tabela 2 – Formulações de requeijão cremoso (RC) obtidos a partir das massas de queijo (MQ) elaboradas com leite fresco (MQLF), refrigerado (MQLR6, MQLR10) e congelado (MQLC30, MQLC60, MQLC90) e assim denominados RCLF, RCLR6, RCLR10, RCLC30, RCLC60 e RCL .....	49
Tabela 3 – Análises físico-químicas, métodos e referências utilizados para as análises do leite de ovelha, massa de queijo (MQ), soro (S) e requeijão cremoso (RC) obtidos a partir dos diferentes tempos de conservação do leite de ovelha .....	50
Tabela 4 – Avaliação do pH, acidez, contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos no período de 10 dias do leite de ovelha refrigerado (LR) em comparação ao leite fresco (LF) .....	59
Tabela 5 – Avaliação da atividade microbiana por micro-organismos mesófilos e seu efeito no pH, acidez e estabilidade térmica frente ao álcool no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo .....	62
Tabela 6 – Avaliação da contagem de micro-organismos psicrotróficos, atividades proteolíticas (AP) e lipolíticas (AL) no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo .....	64
Tabela 7 – Rendimento da massa de queijo (MQ) e percentual de soro drenado (S) obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) .....	70
Tabela 8 – Resultados físico-químicos da massa de queijo (MQ), soro (S) e requeijão cremoso (RC) obtidos de leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) .....	75
Tabela 9 – Análise dos minerais sódio, potássio, cálcio e magnésio da massa de queijo, soro e requeijão cremoso elaborados a partir do obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) ao longo do tempo .....	79
Tabela 10 – A avaliação da cor instrumental dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) em diferentes tempos de conservação .....	81
Tabela 11 – Análise do perfil de textura (TPA) dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) ao longo do tempo .....	83
Tabela 12 – Influência das estações do ano nas características físico-químicas do leite de ovelha coletado em 2017 e 2018 .....	85
Tabela 13 – Influência das estações do ano na contagem microbiana e na atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha .....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EA	Estabilidade ao álcool
EF	Eletroforese
G	Gordura
L	Lactose
LC	Leite de ovelha congelado
LF	Leite de ovelha fresco
LO	Leite de ovelha
LR	Leite de ovelha refrigerado
M	Minerais (sódio, potássio, cálcio e magnésio)
MQ	Massa de queijo
MLF	Massa de queijo obtida do leite de ovelha congelado
MLC	Massa de queijo obtida do leite de ovelha fresco
MLR	Massa de queijo obtida do leite de ovelha refrigerado
Micro	Análise de mesófilos e psicrotrofos
P	Proteína
RC	Requeijão Cremoso
RCLC	Requeijão Cremoso obtido da massa de queijo com leite de ovelha congelado
RCLF	Requeijão Cremoso obtido da massa de queijo com leite de ovelha fresco
RCLR	Requeijão Cremoso obtido da massa de queijo com leite de ovelha refrigerado
S	Soro
SLC	Soro obtido da massa de queijo com leite de ovelha congelado
SLF	Soro obtido da massa de queijo com leite de ovelha fresco
SLR	Soro obtido da massa de queijo com leite de ovelha refrigerado
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
TPA	Análise do perfil de textura



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
3.1	LEITE DE OVELHA .....	25
3.1.1	Produção do leite de ovelha .....	25
3.1.2	Composição química do leite de ovelha .....	26
3.1.3	Características dos componentes do leite de ovelha .....	27
3.1.4	Frações de proteína do leite de ovelha .....	28
3.1.5	Estabilidade do leite de ovelha .....	29
3.1.6	Fatores que influenciam na composição do leite de ovelha .....	30
3.2	CRITÉRIOS DE QUALIDADE DO LEITE DE OVELHA .....	31
3.2.1	Legislação .....	31
3.2.2	Parâmetros de qualidade do leite de ovelha .....	33
3.3	MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE DE OVELHA .....	35
3.4	MATRIZ PROTEICA: MASSA DE QUEIJO .....	38
3.5	REQUEIJÃO CREMOSO .....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
4.1	MATÉRIA-PRIMA .....	45
4.2	DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS .....	46
4.3	MASSA DE QUEIJO (MQ) .....	47
4.4	ELABORAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO (RC) .....	48
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	50
4.5.1	Análises físico-químicas .....	50
4.5.2	Estabilidade térmica do leite de ovelha .....	51
4.5.3	Análises microbiológicas .....	51
4.5.4	Análise de atividade proteolítica e lipolítica .....	52
4.5.5	Eletroforese .....	54
4.5.6	Análise de rendimento .....	55
4.5.7	Avaliação da cor instrumental .....	55
4.5.8	Análise do perfil de textura (TPA) .....	56
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
5.1	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO LEITE DE OVELHA FRESCO, REFRIGERADO E CONGELADO EM RELAÇÃO AOS PADRÕES DE QUALIDADE E FRAÇÕES PROTEICAS. ....	57

<b>5.1.1</b>	<b>Estudos preliminares .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Análise do comportamento do leite de ovelha refrigerado e congelado ao longo do tempo de conservação em comparação ao leite de ovelha fresco.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE DE OVELHA NA ELABORAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Rendimento da massa de queijo e soro drenado.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Características físico-químicas da massa de queijo, soro e requeijão cremoso</b>	<b>71</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Avaliação da cor instrumental .....</b>	<b>80</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Análise do perfil de textura (TPA) .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3</b>	<b>INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES DO ANO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, CONTAGEM MICROBIANA, ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS DO LEITE DE OVELHA .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Características físico-químicas do leite de ovelha .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Contagem microbiana e atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as principais espécies produtoras de leite, a ovina contribuiu em 2016 com cerca de 1,30% da produção total mundial de leite (FAOSTAT, 2018). A produção de leite ovino mais do que duplicou nos últimos 50 anos, sendo que se a tendência for mantida, a possibilidade de aumento da produção mundial é de aproximadamente 30% até 2030. Os países França, Grécia, Itália e Espanha destacam-se por liderar o mercado internacional de produtos lácteos ovinos (PULINA *et al.*, 2018).

A raça Lacaune, provinda da França, constituiu os primeiros rebanhos de ovinos com aptidão leiteira do Brasil, em 1992. Esta raça mostrou-se apta as condições climáticas e de alimentação encontradas no Sul do País, visto que se assemelham com as do País de origem (BRITO *et al.*, 2006). Ainda, as ovelhas da raça Lacaune são conhecidas por apresentarem alto rendimento na produção de leite, com aproximadamente 289 L/ ovelha na França e 350 L/ ovelha na Espanha, correspondendo cerca de 1,80 L/dia e 2,20 L/dia, respectivamente, considerando 160 dias de lactação (PULINA *et al.*, 2018). No Brasil, em estudo realizado por Brito *et al.* (2006), a produção para a raça Lacaune correspondeu 1,30 L/dia, com 160 dias de lactação, oriundos da região serrana do Rio Grande do Sul. Desde então, a produção média de leite desta raça pode ter melhorado, visto que Bianchi *et al.* (2014) relataram produção média de aproximadamente 1,73 L/dia, ao avaliar ovelhas com 0, 60 e 120 dias de lactação, na região oeste de Santa Catarina.

Além da raça Lacaune, outras também são pesquisadas quanto à produção de leite de ovelha no Brasil, entre elas a principal é a Santa Inês, conforme verificado nos estudos realizados em Minas Gerais, como em Penna (2011), no qual a produção média de leite de ovelha para a raça Lacaune foi de 0,85 L/dia e para Santa Inês de 0,44 L/dia. Já para as mestiças  $\frac{1}{2}$  Lacaune  $\frac{1}{2}$  Santa Inês de 1,04 L/dia e  $\frac{3}{4}$  Lacaune x  $\frac{1}{4}$  Santa Inês de 0,98 L/dia, com no máximo de 168 dias de lactação. Ferreira *et al.* (2011) ao avaliarem ovelhas mestiças Santa Inês e Lacaune x Santa Inês relataram produção média de leite de:  $\frac{1}{2}$  Lacaune, 1,55 L/dia;  $\frac{3}{4}$  Lacaune, 1,34 L/dia; e Santa Inês, 1,01 L/dia durante os quatro primeiros meses de lactação. Ribeiro *et al.* (2007) encontraram em leites de ovelha da raça Santa Inês 0,52 L/dia para as ovelhas controle, durante 225 dias de lactação. No Rio Grande do Sul, Souza *et al.* (2005) descreveram uma produção média de leite das ovelhas Corriedale de 0,41 L/dia, ao avaliar 91 dias de lactação.

A ovelha é capaz de produzir, em um menor período de lactação, uma maior quantidade de sólidos por litro de leite (HAENLEIN, 2007), característica relevante para produção de

derivados lácteos e um fator positivo em relação ao volume produzido. Neste sentido, destaca-se a concentração de proteínas, gorduras, vitaminas e minerais em teores mais elevados quando comparados aos leites de outras espécies (PARK *et al.*, 2007; MILANI; WENDORFF, 2011; BALTHAZAR *et al.*, 2017), tornando os produtos obtidos a partir de leite de ovelha atrativos, especialmente devido ao apelo de suas propriedades nutricionais e sensoriais (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

Segundo Masoodi e Shafi (2010) e Albenzio *et al.* (2016), o leite de ovelha poderia fornecer para crianças e adultos a maioria dos nutrientes essenciais, além de que, por possuir similaridade de 99% entre as sequências de proteína da caseína  $\alpha S_1$  e  $\alpha S_2$  com o leite de cabra, pode ser considerado uma alternativa conveniente aos que possuem alergia, já que promove menor sensibilização alérgica, em relação ao leite bovino.

O leite de ovelha apresenta em média 7,9% de gordura, 6,2% de proteína, 4,9% de lactose, 0,9% de cinzas e 12% de sólidos não gordurosos. Além destes, possui cerca de 44 mg/100g de sódio, 136 mg/100g de potássio, 193 mg/100g de cálcio e magnésio 18 mg/100g, entre outros minerais, e também os ácidos graxos como majoritários o palmítico (C<sub>16:0</sub>) e oleico (C<sub>18:1</sub>) (CHANDAN; ATTAIE; SHAHANI, 1992; ZHANG *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007). Os valores de pH variam entre 6,5 a 6,8, já a acidez de 0,22% a 0,25% (PARK *et al.*, 2007). Sua estabilidade ao álcool está em torno de 63% (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014<sup>a</sup>; DE LA VARA *et al.*, 2018).

Ainda, destaca-se que o leite de ovelha possui uma coloração branca intensa e homogênea, sabor e aroma doce suave, textura cremosa devido à presença de pequenos glóbulos de gordura, o que o torna mais facilmente digerível em relação aos leites de outras espécies (PARK *et al.*, 2007; RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018). A cremosidade do leite de ovelha se reflete nos seus derivados como manteiga e queijo (JOOYANDEH; ABEROUMAND, 2010), ressaltando que os derivados mais difundidos são queijos finos e iogurtes (HAENLEIN; WENDORFF, 2006; ALBENZIO *et al.*, 2015).

Considerando que os altos níveis de proteína, gordura e cálcio por unidade de caseína, conferem ao leite de ovelha uma excelente matriz para obtenção de queijo (MOATSOU *et al.*, 2004; BARŁOWSKA *et al.*, 2011), esta matéria-prima se torna interessante para ser utilizada na elaboração do requeijão cremoso e agregar valor ao leite de ovelha. Contudo, entre outros fatores, a sazonalidade da produção, em detrimento ao ciclo de reprodução das ovelhas (BRITO *et al.*, 2006; ALBENZIO *et al.*, 2016; PULINA *et al.*, 2018), torna o volume de leite um fator limitante para sua industrialização. Assim, estabelecer os métodos de conservação do leite de ovelha é de extrema importância, possibilitando aos ovinocultores alternativas que facilitem a

sua produção, tornando o volume produzido viável para a comercialização ou elaboração de produtos.

A refrigeração ou o congelamento por determinados períodos pode alterar as características do leite, especificamente pelo resfriamento, em relação a estabilidade proteica devido a diminuição do fosfato de cálcio micelar, com a consequente desintegração das micelas de caseína, influenciando no rendimento da coalhada (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Já o congelamento lento, pode causar a perda da estabilidade das micelas de caseína, devido ao aumento da concentração de cálcio, pois à medida que o leite congela, os solutos se concentram na parte líquida (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Assim, a floculação e decantação das proteínas ocorre, enquanto que o congelamento rápido não afetaria a sua estabilidade (BERGER, 2001).

Além disso, o Brasil não apresenta uma legislação específica para o leite de ovelha, sendo necessário estabelecer critérios em relação à condução do rebanho, produção, conservação e transporte, especialmente para o controle do desenvolvimento de micro-organismos no leite ainda na propriedade rural. Cabe ressaltar, que as boas práticas de produção de leite possuem influência direta na qualidade da matéria-prima, e pode auxiliar na manutenção das características do leite que são essenciais para elaboração de seus derivados.



## 2 OBJETIVOS

A seguir estão apresentados os objetivos que nortearam a pesquisa.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características físico-químicas do leite de ovelha fresco, refrigerado e congelado e a influência destes métodos de conservação na elaboração de requeijão cremoso.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar os parâmetros físico-químicos do leite de ovelha fresco e refrigerado;
- b. Selecionar o tempo de conservação do leite de ovelha refrigerado a partir da contagem microbiana de aeróbios mesófilos e psicrotróficos, acidez e pH;
- c. Avaliar o leite de ovelha fresco, refrigerado (6 e 10 dias) e congelado (15, 30, 45, 60, 90 dias) quanto à:
  - parâmetros físico-químicos;
  - estabilidade térmica determinada pela análise do álcool e coágulo no teste de ebulição-COB);
  - contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, bem como as atividades proteolítica e lipolítica;
  - frações de proteína  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína por eletroforese.
- d. Elaborar a massa de queijo por coagulação mista, com leite de ovelha fresco, refrigerado (6 e 10 dias) e congelado (30, 60, 90 dias), verificando o efeito do processo de conservação no rendimento e nas características físico-químicas da massa de queijo e do soro;
- e. Comparar as características físico-químicas, cor e textura dos requeijões cremosos produzidos a partir da massa de queijo obtida com leite de ovelha fresco em relação as massas de queijo onde o leite foi submetido aos processos de conservação;
- f. Avaliar a influência das estações do ano (outono, inverno, primavera, verão) nas características físico-químicas, microbiológicas, atividades proteolíticas e lipolíticas do leite de ovelha fresco, coletados durante a realização desta pesquisa.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica aborda assuntos relevantes à pesquisa, especificamente sobre a composição do leite de ovelha, possíveis alterações físico-químicas e microbiológicas após a conservação por refrigeração e congelamento em relação ao leite fresco. Além disso, aborda sobre a matriz proteica a ser utilizada na elaboração de massa de queijo e de requeijão cremoso.

#### 3.1 LEITE DE OVELHA

A seguir serão apresentadas a composição do leite de ovelha encontrada na literatura que norteiam a pesquisa.

##### 3.1.1 Produção do leite de ovelha

A produção de leite de ovelha no Brasil é recente, sendo que os primeiros rebanhos ovinos com aptidão leiteira foram da raça Lacaune em 1992, oriundas da França (BRITO *et al.*, 2006). Esta raça é conhecida por possuir alto rendimento na produção de leite, e ainda se mostrou adaptada as condições de clima e alimentação encontradas no Sul do País, produzindo em média 1,30 L/dia, com 160 dias de lactação, sendo que no pico de lactação pode produzir até 4,50 L/dia (BRITO *et al.*, 2006; PULINA *et al.*, 2018). Em Santa Catarina, Bianchi *et al.* (2014) relataram produção média de leite de aproximadamente 1,73 L/dia, ao avaliar ovelhas da raça Lacaune no período de 0, 60 e 120 dias de lactação.

Além da raça Lacaune, outras também são pesquisadas quanto à produção de leite de ovelha no Brasil, como a Corriedale com produção média de leite de 0,41 L/dia, relatadas por Souza *et al.* (2005) durante 91 dias de lactação.

Em Minas Gerais, a raça Santa Inês apresentou produção média leite de 0,52 L/dia para as ovelhas controle durante 225 dias de lactação (RIBEIRO *et al.*, 2007). Penna (2011) obteve produção média de leite de ovelha para a raça Lacaune de 0,85 L/dia e para Santa Inês de 0,44 L/dia. Enquanto que para as mestiças  $\frac{1}{2}$  Lacaune  $\frac{1}{2}$  Santa Inês de 1,04 L/dia e  $\frac{3}{4}$  Lacaune x  $\frac{1}{4}$  Santa Inês de 0,98 L/dia, com no máximo de 168 dias de lactação.

Ferreira *et al.* (2011) ao avaliarem ovelhas mestiças Santa Inês e Lacaune x Santa Inês relataram produção média de leite de:  $\frac{1}{2}$  Lacaune, 1,55 L/dia;  $\frac{3}{4}$  Lacaune, 1,34 L/dia; e Santa Inês, 1,01 L/dia durante os quatro primeiros meses de lactação.

### 3.1.2 Composição química do leite de ovelha

Diversos estudos têm sido realizados sobre a composição química do leite de ovelha, sendo a gordura, a proteína e a lactose, os parâmetros com maior incidência de relatos na literatura. Neste sentido, a seguir, estão apresentados nos Quadros 1 e 2, de acordo com os autores em ordem crescente, são descritas as faixas dos teores dos componentes do leite de ovelha oriundos de diferentes raças e países, bem como os no Brasil, em específico da raça Lacaune, buscando evidenciar a variabilidade que estes podem apresentar em decorrência da especificidade de cada fator envolvido na produção do leite.

Quadro 1 – Composição química do leite de ovelha fresco encontrado na literatura internacional

Composição do leite fresco	Internacionais	Referências - Internacionais
<b>Gordura (%)</b>	6,20 a 7,56	(FACCIA <i>et al.</i> , 2015; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; TABLA <i>et al.</i> , 2016; DE LA VARA <i>et al.</i> , 2018; PALOMBA <i>et al.</i> , 2017)
<b>Proteína (%)</b>	4,44 a 5,90	(ZHANG <i>et al.</i> , 2006; NGUYEN <i>et al.</i> , 2018; PALOMBA <i>et al.</i> , 2017; FACCIA <i>et al.</i> , 2015; TABLA <i>et al.</i> , 2016; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; DE LA VARA <i>et al.</i> , 2018)
<b>Lactose (%)</b>	4,40 a 5,59	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2018; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; ZHANG <i>et al.</i> , 2006; PALOMBA <i>et al.</i> , 2017; DE LA VARA <i>et al.</i> , 2018)
<b>Cinzas (%)</b>	0,89 a 0,95	(KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018)
<b>Sólidos totais (%)</b>	15,18 a 18,82	(ZHANG <i>et al.</i> , 2006; FACCIA <i>et al.</i> , 2015; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; DE LA VARA <i>et al.</i> , 2018; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018)
<b>Sólidos não gordurosos (%)</b>	10,21 a 12,40	(ZHANG <i>et al.</i> , 2006; FACCIA <i>et al.</i> , 2015; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018)
<b>Na (mg/100g)</b>	35,40 a 44,00	(GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; PARK <i>et al.</i> , 2007)
<b>K (mg/100g)</b>	136,00 a 151,00	(PARK <i>et al.</i> , 2007; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018)
<b>Ca (mg/100g)</b>	114,30 a 193,00	(GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; PARK <i>et al.</i> , 2007)
<b>Mg (mg/100g)</b>	18,00 a 18,40	(PARK <i>et al.</i> , 2007; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018)

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Além dos trabalhos sobre a raça Lacaune, há também os que relatam informações sobre outras raças, mestiças com a Lacaune ou puras. Penna (2011) relatou valores médios de composição do leite de ovelhas Lacaune e de Lacaune x Santa Inês de 5,47% de gordura, 5,19% de proteína e 16,15% de sólidos totais. Brito *et al.* (2006) encontraram em rebanhos brasileiros de ovelha mestiças (Lacaune x Texel), valores médios de 4,46% de proteína, 4,76% de lactose, 5,79% de gordura, 16,25% sólidos totais e 10,43% de sólidos não gordurosos. Ribeiro *et al.*

(2007) apresentaram teores de 4,96% de gordura, 16,18% de sólidos totais e 11,22% de sólidos não gordurosos em leites de ovelha da raça Santa Inês.

Quadro 2 – Composição química do leite de ovelha fresco encontrado na literatura Brasileira, específico para raça Lacaune

Composição do leite fresco	Brasil	Referências - Brasileiras
Gordura (%)	4,40 a 9,00	(TRIBST <i>et al.</i> , 2018; HANAUER <i>et al.</i> , 2016; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; REVERS <i>et al.</i> , 2016)
Proteína (%)	5,10 a 5,80	(TRIBST <i>et al.</i> , 2018; HANAUER <i>et al.</i> , 2016; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; REVERS <i>et al.</i> , 2016)
Lactose (%)	4,44 a 4,90	(FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; HANAUER <i>et al.</i> , 2016; REVERS <i>et al.</i> , 2016)
Cinzas (%)	0,80 a 0,89	(REVERS <i>et al.</i> , 2016; HANAUER <i>et al.</i> , 2016)
Sólidos totais (%)	17,50 a 19,59	(TRIBST <i>et al.</i> , 2018; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a)
Sólidos não gordurosos (%)	10,96 a 12,40	(FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; TRIBST <i>et al.</i> , 2018)
Na (mg/100g)	141,06	(REVERS <i>et al.</i> , 2016)
K (mg/100g)	61,2	(REVERS <i>et al.</i> , 2016)
Ca (mg/100g)	255,00	(REVERS <i>et al.</i> , 2016)
Mg (mg/100g)	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As ovelhas da raça Lacaune são conhecidas por possuírem alto rendimento na produção de leite (PULINA *et al.*, 2018), e podem ser utilizadas para aprimorar a produção do leite, sendo superior as mestiças, especialmente quanto ao teor de gordura (RIBEIRO *et al.*, 2007; PENNA, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011).

### 3.1.3 Características dos componentes do leite de ovelha

A gordura do leite é um dos componentes mais importantes com relação aos custos, características nutricionais, sensoriais, capacidades físicas e químicas que são transferidas aos produtos lácteos. Os ácidos graxos presentes no leite de ovelha compreendem cerca de 98% de triacilgliceróis (TAG), incluindo um grande número de ácidos graxos esterificados (HAENLEIN; WENDORFF, 2006; PARK, 2006).

Zhang *et al.* (2006) ao estudarem o leite de ovelha da raça East Friesian x Lacaune, indicaram 18,70% de ácidos graxos de cadeia curta (C<sub>4:0</sub> - C<sub>12:0</sub>), destacando-se a C<sub>10:0</sub> com 6,80%, além de 36,70% de ácidos graxos de cadeia média (C<sub>14:0</sub> - C<sub>17:1</sub>), sendo que os ácidos graxos encontrados em maior quantidade foram C<sub>14:1</sub> e C<sub>16:0</sub>, com 10,10% e 22,10%, respectivamente. Enquanto que nos 39,40% de ácidos graxos de cadeia longa ( $\geq$  C<sub>18:0</sub>), os mais abundantes foram C<sub>18:0</sub> e C<sub>18:1 cis9</sub>, com 12,20% e 17,70%, respectivamente. Além disso, o leite

de ovelha apresentou 7,10% de ácidos graxos poliinsaturados, 23,20% monoinsaturados, 64,60% saturados e 1,10% de ácido linoleico conjugado, com um total de 95% de ácidos graxos.

Em relação as proteínas do leite de ovelha, estas são constituídas de grupos heterogêneos em termos de composição e propriedades, são divididas em caseína (principal grupo de proteínas) e proteínas de soro de leite, frações em menor grau (DARIO *et al.*, 2008). O leite de ovelha possui em sua composição diversas proteínas específicas, destacando-se a caseína, com seu complexo micelar constituído por submicelas de  $\alpha$ S1-caseína (6,7%),  $\alpha$ S2-caseína (22,8%),  $\beta$ -caseína (61,6%) e  $\kappa$ -caseína (8,9%) (HAENLEIN; WENDORFF, 2006; SELVAGGI *et al.*, 2014). A heterogeneidade das caseínas é determinada pela presença de variantes genéticas ou por outros fatores, como nível de fosforilação discreto, variação no grau de glicosilação da fração de caseína e da coexistência de proteínas com diferentes comprimentos de cadeia (PARK *et al.*, 2007).

O teor de lactose está relacionado com a sua produção pelas células alveolares, pois este constituinte é responsável pela pressão osmótica do leite. No início e fim da lactação apresenta baixo teor, enquanto que no pico da lactação apresenta teores mais elevados (NOBLE *et al.*, 2002), sendo pouco influenciado pelos fatores nutricionais. Assim, a lactose é o parâmetro menos variável entre os componentes do leite de ovelha (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014).

Os elementos minerais mais abundantes do leite de ovelha são cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na) e magnésio (Mg); zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu) e manganês (Mn) são elementos-traços. Os níveis de Ca, P, Mg, Zn e Cu são maiores no leite de ovelha do que no leite bovino, no qual o oposto é observado para o K e Na (PARK *et al.*, 2007). O conteúdo mineral do leite de ovelha não é constante e pode ser influenciado por inúmeros fatores como, estágio da lactação, condição nutricional do animal, fatores genéticos e do meio ambiente devido às diferenças em alimentação e variações sazonais (PARK; CHUKWU, 1988; PARK *et al.*, 2007).

#### **3.1.4 Frações de proteína do leite de ovelha**

O leite de ovelha possui valor elevado de caseína de 4,2 a 5,2 g/100 g e proteínas do soro de leite de 1,02 a 1,3 g/100 g (DARIO *et al.*, 2008). A porção de caseína do leite de ovelha é de cerca de 80% de proteína total do leite (PARK *et al.*, 2007) e tem um grande impacto sobre seu valor nutricional e tecnológico. Neste sentido, é de extrema importância avaliar o

comportamento das frações de caseína durante os processos de conservação (DARIO *et al.*, 2008).

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, através de uma diferença de potencial, sendo a mobilidade eletroforética da molécula ou partícula carregada influenciada, entre outros fatores, pela carga, pela massa molecular e pela concentração da mesma (WESTERMEIER; MAROUGA, 2005). Assim, a eletroforese permite a separação de diferentes tipos de proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida (SGARBIERI, 1996).

A utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS). Por este motivo, tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE (SGARBIERI, 1996). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) destaca-se como uma técnica importante para análise do leite e seus derivados (PATEL *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2015) estudaram a degradação das frações de caseína em leite bovino e observaram que a  $\kappa$ -caseína e a  $\beta$ -caseína apresentaram hidrólise lenta quando a atividade da protease alcançou 0,78 U/mL, com contagens viáveis de 10,26 log UFC/mL, após 6 dias de incubação em leite, à 6 °C. A  $\kappa$ -caseína foi completamente hidrolisada após 8 dias, assim como todas as caseínas após 15 dias.

A estabilidade do sistema micelar da caseína pode ser atribuída diretamente às propriedades únicas da  $\kappa$ -caseína. Assim, a hidrólise da  $\kappa$ -caseína pela protease produz a para- $\kappa$ -caseína e pode causar desestabilização da micela levando à agregação de caseínas, resultando finalmente em gelificação em produtos UHT (ZHANG *et al.*, 2015).

A degradação inicial da fração de  $\kappa$ -caseína, se deve ao fato desta estar localizada na superfície da micela, o que a torna mais acessível à hidrólise. Algumas proteases hidrolisam as frações de caseína em ordem de preferência diferentes, como,  $\kappa$ -caseína >  $\beta$ -caseína >  $\alpha$ -caseína. Porém, as proteínas do soro não são degradadas (CROMIE, 1992; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

### **3.1.5 Estabilidade do leite de ovelha**

O leite de ovelha fresco apresenta valores de acidez de 0,22% a 0,25% (PARK *et al.*, 2007; DE LA VARA *et al.*, 2018) e pH de 6,5 a 6,7 (FACCIA *et al.*, 2015; TABLA *et al.*, 2016;

DE LA VARA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018). Do ponto de vista tecnológico, é interessante evidenciar que as proteínas de leite são rapidamente desestabilizadas pela acidificação, uma vez que define a adequação do leite para a produção de certos produtos lácteos (DE LA VARA *et al.*, 2018). Estudos indicam que a estabilidade do leite é negativamente relacionada à acidez, já que a redução do pH do leite diminui o teor de caseinato de fosfato de cálcio e aumenta a concentração do cálcio iônico, que reduz as forças de repulsão entre caseínas e favorece a coagulação do leite (GUO *et al.*, 1998; HORNE, 2016; DE LA VARA *et al.*, 2018).

A estabilidade térmica do leite de ovelha frente ao álcool é em torno de 63% (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; DE LA VARA *et al.*, 2018). Apesar de ser inferior ao leite bovino, é uma característica do leite de pequenos ruminantes (WASIKSIRI *et al.*, 2010; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; LAI *et al.*, 2016), considerando que estão associadas a acidez, concentração de fosfato e citrato, cálcio iônico e força iônica e com característica da espécie e não em relação a contagem microbiana (DAVIES; WHITE, 1958; CHAVEZ *et al.*, 2004; HORNE, 2016; MACHADO *et al.*, 2017). A redução da estabilidade térmica do leite pode resultar em deficiências na coagulação pela ação do coalho, conferindo menor rendimento na produção de queijos (MAHIEU, 1991).

### **3.1.6 Fatores que influenciam na composição do leite de ovelha**

A produtividade do leite de ovelha é influenciada por diversos fatores que modificam sua composição química ao longo do tempo e entre os animais, ou seja, devido a raça, paridade, estação do ano, temperatura ambiente, idade animal, nutrição o estágio de lactação (PARK *et al.*, 2007).

As ovelhas apresentam diferença na composição do leite conforme o estágio de lactações, ou seja, no início da lactação os teores de gordura, proteína e sólidos totais são mais elevados, assim como no final da lactação. Porém, durante o pico de produção o teor desses componentes diminui. Ovelhas mais velhas apresentam um aumento no teor de gordura e proteína e, redução na concentração de lactose, ocorrendo, conseqüentemente, uma queda na produção de leite (BENCINI, 2001; HILALI; EL-MAYDA; RISCHKOWSKY, 2011). Assim, no período de lactação, há correlação negativa entre produtividade e composição do leite de ovelhas. Quando produzem maior quantidade de leite, geralmente há menor concentração de gordura e proteína, sendo essa relação válida tanto para raças de alta quanto de baixa produção, como também entre animais de um mesmo rebanho (BENCINI, 2001).

A temperatura ambiente é, provavelmente, uma das maiores causas das variações estacionais da produção de leite. Quando a temperatura é muito elevada ocorre diminuição da ingestão dos animais, devido à perda de apetite, diminuindo a produção de leite (ALAIS, 1985; MAHIEU, 1991). Quando se tem um balanço energético positivo, ocorre um aumento na produção e no teor de proteína do leite, ao passo que se for negativo, ocorre uma redução de proteína e aumento da gordura. Entretanto, os fatores que estimulam a produção de gordura e proteína do leite são quase que antagônicos (PERES, 2001).

Em estudo realizado por Peana *et al.* (2017), avaliaram os efeitos das condições meteorológicas de inverno e primavera na produção de leite de pastoreio de ovelhas leiteiras em condições mediterrânicas, a fim de definir limiares ótimos e críticos, quantificar reduções de rendimento devido ao estresse ambiental e avaliar os efeitos imediatos ou fatores que interferiram na produção, os autores verificaram que o rendimento do leite foi influenciado em especial pela temperatura, uma vez que o estresse térmico, tanto quente, quanto frio, causou reduções na produção de leite.

## 3.2 CRITÉRIOS DE QUALIDADE DO LEITE DE OVELHA

Diversos estudos têm sido realizados no Brasil obtendo valores dos parâmetros físico-químicos do leite de ovelha, tanto para raça Lacaune (BRITO *et al.*, 2006; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; HANAUER *et al.*, 2016; REVERS *et al.*, 2016), quanto para as demais (GAJO *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2013), além de microbiológicos conforme relatado por Balthazar *et al.* (2019), na busca do conhecimento sobre as características do leite de ovelha, bem como a possibilidade da definição de parâmetros de qualidade para o mesmo.

### 3.2.1 Legislação

Cabe ressaltar que até o momento não há legislação específica para o leite de ovelha no Brasil estabelecendo quais os critérios de qualidade, bem como os métodos de conservação do leite de ovelha a fim de garantir a segurança alimentar para o seu processamento e consumo.

No estado de Minas Gerais, em 17 de agosto de 2011 foi publicada a lei Nº 19.583 “leite legal”, que dispõe sobre as condições para manipulação e beneficiamento artesanais de leite de cabra, de ovelha e seus derivados (MINAS GERAIS, 2011). E, posteriormente, a Lei nº 21.429 de 21 de julho de 2014, alterou a Lei nº 19.583/ 2011 em pequenos quesitos (MINAS GERAIS, 2014). No artigo 11, o produtor que receber leite de cabra e de ovelha de terceiros deverá

realizar os seguintes testes básicos na matéria-prima de seus fornecedores: determinação da acidez titulável; determinação da densidade relativa; características organolépticas (cor, cheiro, sabor e aspecto); temperatura; lactofiltração (MINAS GERAIS, 2011). No entanto, esta legislação não apresenta valores para os parâmetros relacionados acima.

Em 2017, a nível nacional foi divulgada uma legislação abrangente para espécies produtoras de leite em pequena quantidade, referindo-se ao congelamento, a qual permite o congelamento do leite para aquelas espécies em que o procedimento seja tecnologicamente justificado, desde que estabelecido em regulamento técnico específico (BRASIL, 2017).

Quanto a refrigeração do leite bovino a ser processado e comercializado, conforme disposto na Instrução Normativa (IN) nº 62, de 29 dezembro de 2011, o leite cru deve ser refrigerado na propriedade a 7 °C ou menos, para tanques de refrigeração por imersão, no tempo máximo de 3 horas após a ordenha. Enquanto que em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, ser dimensionado de modo tal que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4 °C, pelo mesmo período. Sendo que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser no máximo de 48 h, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 h (BRASIL, 2011).

Ainda, a IN 62/2011 apresenta o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o qual contém uma série de parâmetros a serem verificados afim de garantir a qualidade e segurança desta matéria-prima. Destacam-se os requisitos físicos e químicos para gordura, proteína, sólidos totais, estabilidade ao álcool, acidez, densidade e crioscopia. Além dos requisitos microbiológicos obtidos através das análises de contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS), avaliadas no mínimo uma vez ao mês, com média geométrica sobre período de três meses (BRASIL, 2011). No entanto, estes parâmetros não podem ser considerados na sua totalidade para o leite de ovelha, já que este apresenta características específicas, diferentes do leite bovino.

Novas instruções normativas foram implementadas, revogando a IN nº 62, sendo estas a IN nº 76, de 26 de novembro de 2018, nos quais foram aprovados os regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, e a IN nº 77, de 26 de novembro de 2018, na qual foram estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Sendo que estas normativas vieram para complementar e alterar alguns parâmetros dispostos na IN 62/2011, como por exemplo,

não mencionaram o tanque de refrigeração por imersão, somente os tanques de refrigeração por expansão direta.

Em contrapartida, a União Europeia, em 2004, instituiu um regulamento específico de Nº 853 para os pequenos ruminantes (cabra e ovelha), o qual preconiza que a contagem em placas à 30 °C deve ser  $\leq 5,69 \log \text{ UFC/mL}$  para produtos elaborados com leite cru de outras espécies por um processo que não inclua tratamento térmico, e  $6,18 \log \text{ UFC/mL}$  para produtos elaborados com leite cru de outras espécies por um processo que inclua tratamento térmico (UE, 2004; PMO, 2015).

Em suma, é importante a definição dos parâmetros físico-químicos do leite de ovelha, bem como os que conservem as suas propriedades que venham contribuir posteriormente para manutenção da qualidade dos produtos elaborados com estes, e não somente os parâmetros de qualidade microbiológica. Visto que a composição química deste depende de muitos fatores, dentre eles raça do animal, condições ambientais e localidade (PARK *et al.*, 2007), de acordo com as peculiaridades de cada País. O que torna importante a elaboração de uma legislação que descreva os padrões de identidade e qualidade do leite de ovelha produzido no Brasil.

### **3.2.2 Parâmetros de qualidade do leite de ovelha**

A contagem microbiana do leite fresco indica a sua qualidade para a produção de derivados. As baixas temperaturas de armazenamento garantem menores contagens de mesófilos (SILVA; TORRES, 1995). Assim, a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos é utilizada como método oficial indicativo de qualidade microbiológica para o leite, essas bactérias são responsáveis pela rápida acidificação e degradação do leite, resultado da inadequada higienização de ordenha ou ineficiente temperatura de armazenamento (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015).

As temperaturas na faixa de 2 °C a 10 °C são consideradas ótimas para o desenvolvimento de bactérias psicotróficas (SILVA; TORRES, 1995). Segundo Santos *et al.* (2013), o número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção, ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado. Em seus estudos, estes autores observaram que a 4 °C há um crescimento menor destes micro-organismos quando comparada a 10 °C.

Os psicotróficos são usados como um indicador suplementar de qualidade pela possibilidade em produzir lipases e proteases extracelulares, e algumas cepas podem apresentar tanto a atividade lipolítica, quanto proteolítica, sendo estas enzimas termorresistentes e assim,

um problema para a indústria de laticínios (ZHANG *et al.*, 2015; CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016), por causar alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo e redução do rendimento dos queijos (DATTA; DEETH, 2001; WIKING *et al.*, 2002; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003), fazendo com que a vida útil do leite e dos produtos lácteos diminua (KOKA; WEIMER, 2000; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

As proteases produzidas por psicrotróficos são ativas para uma ampla gama de pH e temperatura (MITCHELL; EWINGS, 1985). São extremamente estáveis ao calor, suportando mesmo processos em altas temperaturas, atacam todas as formas de caseínas, com hidrólise preferencial para a  $\kappa$ -caseína, seguida de  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína (CROMIE, 1992). Cabe salientar que a hidrólise enzimática das proteínas é uma ferramenta importante na produção de uma grande variedade de alimentos, pois ela reduz a alergia ao leite e também pode influenciar no pronunciamento do aroma, sabor e textura desejáveis durante a maturação do queijo (ISMAIL; NIELSSEN, 2010; HATI; MANDAL; PRAJAPATI, 2013).

No entanto, um alto teor de proteases durante o armazenamento do leite pode ser responsável pela formação de géis e precipitados que conduzem a produtos com sabor e características sensoriais indesejáveis (TONDO *et al.*, 2004; KOUTSOULI *et al.*, 2015; PALOMBA *et al.*, 2017) considerando que as proteases desestabilizam as micelas de proteínas, com consequente coagulação do leite (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

Períodos maiores de refrigeração do leite entre 4 °C e 7 °C resultariam no aumento da contagem de psicrotróficos, como as do gênero *pseudomonas*, ocorrendo produção de proteases suficientes para degradar parcialmente as frações de caseína  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína. Assim, peptídeos são liberados, além de nitrogênio não proteico, na forma de amônia e como consequência deste fato, há a perda de compostos nitrogenados no soro, bem como queda no rendimento dos queijos. Durante a maturação do queijo, especialmente em queijos macios, e semi-duros, estas proteases podem liberar peptídeos de baixo peso molecular, responsáveis pelo surgimento do gosto amargo (FURTADO, 2005).

A atividade da lipase no leite de ovelha é de cerca de um décimo em relação ao leite bovino (CHANDAN; PARRY; SHAHANI, 1968). Além disso, o leite de ovelha apresenta uma taxa maior de hidrólise para triglicerídeos contendo cadeia média de ácidos graxos em relação aos de cadeia longa (CHÁVARRI *et al.*, 1998), resultando na redução do pH e aumento de acidez do leite, levando à dissolução dos fosfatos de cálcio coloidais e parte da caseína (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As lipases provenientes das bactérias psicrotróficas podem hidrolisar a gordura tanto no leite, quanto no queijo, liberando ácidos graxos que causam defeitos conhecido como rancidez.

Se a hidrólise no leite é expressiva, os ácidos graxos livres têm efeito inibidor sobre o crescimento da cultura lática. No queijo, a rancidez é o principal defeito, devido a lipólise, e formação principalmente de ácido butírico, que confere gosto de sabão ao produto. O defeito pode ser identificado ao longo da maturação e é comum em queijos de maturação mais prolongada (FURTADO, 2005).

### 3.3 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE DE OVELHA

Os métodos de conservação do leite buscam prevenir o crescimento de micro-organismos específicos que geram alterações na qualidade do leite, porém, podem favorecer o desenvolvimento de outros, que viriam a degradar por reações enzimáticas os componentes do leite. Neste sentido, a forma de conservação deve ser ponderada, pois a temperaturas e tempos longos de refrigeração, bem como formas de congelamento rápido e lento podem ocasionar alterações na matriz láctea, conforme serão relatados na presente seção.

Uma das características importantes e favoráveis no ponto de vista de logística é a capacidade que o leite de ovelha apresenta em ser armazenado congelado e após descongelamento, de ser transformado em seus derivados, como pode ser verificado em diversos trabalhos (VOUTSINAS *et al.*, 1996; WENDORFF, 2001; KATSIARI; AVOUTSINAS; KONDYLI, 2002; ZHANG *et al.*, 2006; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a, 2014b; TRIBST *et al.*, 2018). Possivelmente, em função do tamanho reduzido dos glóbulos de gordura as quais após o descongelamento são mais facilmente homogeneizadas com os outros compostos, reestabelecendo a emulsão (TRIBST *et al.*, 2018).

Esse comportamento é importante, pois quando há volumes pequenos de produção estes poderiam ser congelados e viabilizar o processamento, sendo que o leite resfriado apresenta menor vida útil, devido ao desenvolvimento de micro-organismos psicrotóxicos (BIANCHI, 2018; TRIBST *et al.*, 2018). Segundo Santos *et al.* (2013), em temperaturas de 7 °C e 10 °C, as contagens foram aproximadamente três vezes maiores do que a 4 °C, ou seja, o controle da temperatura de armazenamento refrigerado necessita ser rigoroso para obter-se menores contagens microbianas.

Ao longo do período de refrigeração do leite podem ocorrer mudanças na solubilidade e na associação dos sais presentes, que causariam a diminuição do fosfato de cálcio micelar, com a consequente desintegração das micelas de caseína. Parte da caseína, especialmente a  $\beta$ -caseína entra em solução, pois as ligações entre estas se tornam mais fracas a baixas temperaturas. Além disso, as micelas de caseína atingem maior volume, podendo este fato ser

atribuído à formação de outra categoria de capa pilosa (zonas C-terminais da  $\kappa$ -caseína). Desta forma, ocorre aumento da viscosidade do leite e a estrutura torna-se mais susceptível à atividade da enzima plasmina (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), principal enzima proteolítica do leite, sendo seu substrato específico a caseína (POLITIS, 1996; SILANIKOVE; MERINB; LEITNER, 2006). No entanto, essas mudanças induzidas exclusivamente por processos a frio, como a solubilização de fosfato de cálcio, dissociação de caseína devido à liberação de  $\beta$ -caseína e uma redução no tamanho micelar, ocorrem somente no leite bovino, não sendo observados no leite de ovelha (RAYNAL; REMEUF, 2000).

A perda de estabilidade das micelas também está associada à acidez do leite que, da mesma forma, provoca dissolução do fosfato de cálcio micelar (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). No entanto, estas alterações nas micelas de caseína não são imediatas, ocorrendo cerca de 24 horas após o resfriamento a 4°C. O aquecimento posterior restabelece a estrutura, porém não é assegurado que as micelas voltam a ser idênticas à estrutura original. Visto que a refrigeração pode reduzir a atividade da enzima superóxido dismutase, que protege a matéria gorda da oxidação, e assim acarretar um aumento da auto-oxidação dos lipídios. Desta forma, a membrana do glóbulo de gordura perde alguns de seus componentes e tem sua estrutura alterada de forma irreversível (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Com relação ao congelamento, este processo provoca perda da estabilidade das micelas de caseína, em detrimento da pressão osmótica, ocasionando um aumento da concentração de cálcio, devido a maior concentração de solutos na parte líquida à medida que o leite congela (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). No entanto, a velocidade de congelamento influencia de maneira significativa a qualidade da matéria-prima, uma vez que o congelamento lento ocasiona perda da estabilidade das proteínas, com a conseqüente floculação e decantação. Enquanto que o congelamento rápido não afeta a estabilidade (BERGER, 2001).

O congelamento lento induz a formação de cristais de gelo (PAZZOLLA *et al.*, 2013) capaz de desestabilizar a micela de caseína e danificar os glóbulos de gordura, liberando as lipoproteínas da membrana e permitindo o transbordamento de triglicerídeos que se tornam desprotegidos à oxidação e à atividade da lipase (FENNEMA; WILLIAM; ELMER, 1973; ZHANG *et al.*, 2006), porém poderiam facilitar o desenvolvimento do *S. thermophilus*, na produção de iogurte, reduzindo a fase de adaptação (TRIBST *et al.*, 2018).

Segundo estudo de Bianchi (2018), há inúmeras vantagens quanto ao uso do processo de congelamento no leite de ovelha, como por exemplo, em casos em que há variação na demanda de produtos pelo mercado consumidor, além das questões de logística e custo, no sentido do volume de leite produzido nas pequenas propriedades, sendo que este pode ser

processado em plantas já existentes, ou mesmo nas que processam outros tipos de leite e assim, viabilizar a atividade.

Wendorff (2001) estudou o leite de ovelha congelado a  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$  e constatou que essa temperatura preserva a estabilidade da proteína até 12 meses de armazenamento. No entanto, para manter a alta qualidade do leite de ovelha, deve ser rapidamente congelado e armazenado a temperaturas inferiores a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Voutsinas *et al.* (1996) utilizaram leite de ovelha desnatado e o integral concentrados por osmose reversa e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por até 68 meses para elaborar iogurtes, indicando não haver diferença significativa entre a lipólise do leite controle e os concentrados de leite fresco e congelado. Além disso foi observado que a oxidação da gordura aumentou com o tempo de armazenamento e a contagem de bactérias e coliformes, reduziu no decorrer do período de congelamento. A estabilidade física dos concentrados descongelados e reconstituídos, especialmente aqueles preparados a partir do leite integral, foi excelente mesmo após 6 meses de armazenamento congelado.

Zhang *et al.* (2006) estudaram o congelamento do leite de ovelha durante 6 meses a temperaturas de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , acompanhando as amostras mensalmente. Na temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  percebeu-se que os sólidos totais do leite, proteínas, caseína, nitrogênio não proteico e a lactose não foram afetados ao longo do tempo. Em exame visual, o leite possuía boa estabilidade e homogeneidade durante os 6 meses. No entanto, a temperatura de congelamento de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  demonstrou floculação da proteína, mas a homogeneidade foi restaurada quando se fez a pasteurização do leite descongelado a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 30 min. Quanto ao conteúdo de lipídios, em ambas as temperaturas diminuiu seu teor ao longo do tempo. Provavelmente os cristais de gelo formados durante o congelamento possam ter danificado os glóbulos de gordura (MUIR,1984; KEENAN; MATHER, 2006).

Katsiari, Voutsinas e Kondyli (2002) relataram que não houve diferenças significativas entre as características físico-químicas, microbiológicas e de estabilidade física dos leites de ovelha frescos e armazenados congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por até 6 meses, sendo que os iogurtes fabricados a partir do leite congelado, após descongelamento por imersão em banho-maria a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , apresentaram características físico-químicas, sensoriais e de estabilidade física semelhantes às do preparado a partir de leite fresco. Tribst *et al.* (2018) congelaram o leite de ovelha durante um mês, de forma lenta a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 24 h, e posteriormente descongelaram separadamente, de forma lenta (24 h) e rápida (imediatamente antes do uso), sendo o lento indicado como o método de menor impacto no iogurte produzido.

Fava, Külkamp-Guerreiro e Pinto (2014a) avaliaram as características físico-químicas do leite de ovelha da raça Lacaune fresco, refrigerado e congelado durante 7 dias, indicando que o congelamento do leite, neste período, não interferiu nas características físico-química, permitindo o armazenamento da matéria-prima até obtenção de volume suficiente para o processamento. Além disso, em trabalho posterior, Fava, Külkamp-Guerreiro e Pinto (2014b), avaliaram o resfriamento e o congelamento do leite de ovelha, por um período de 7 dias, e verificaram que a coalhada produzida com leite congelado resultou em maior rendimento quando comparada a produzida com leite resfriado.

### 3.4 MATRIZ PROTEICA: MASSA DE QUEIJO

O leite de ovelha é uma excelente matriz para produção de queijo, devido aos seus altos níveis de proteína, gordura e cálcio por unidade de caseína (MOATSOU *et al.*, 2004; BARLOWSKA *et al.*, 2011), resultando assim, mais sensibilidade ao coalho, produção de coágulo mais firme, coagulação mais rápida, e então maior rendimento de queijo por unidade de leite do que os leites de outras espécies, sendo necessários cerca de 4 a 5 L de leite de ovelha para a produzir 1 kg de queijo. Esse fato é devido as frações de caseína do leite de ovelha serem diferentes do bovino, além disso, dependem do sistema de manejo, qualidade do leite e forma de armazenamento (WENDORFF, 2002).

A integridade das proteínas do leite de ovelha é de suma importância para a elaboração de queijo, visto uma alta contagem de psicrotróficos podem gerar degradações parcialmente as frações de caseína  $\kappa$ -caseína e  $\beta$ -caseína, ocasionando perda de compostos nitrogenados no soro, redução do rendimento dos queijos (DE LA VARA *et al.*, 2018; FURTADO, 2005). Além de apresentar perda de consistência na formação do coágulo, alterações no sabor e odor (DATTA; DEETH, 2001; WIKING *et al.*, 2002; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

A origem das alterações das proteínas do leite pode estar relacionada ao processo de refrigeração, onde em períodos longos de conservação ocorre a diminuição do fosfato de cálcio micelar, com a conseqüente desintegração das micelas de caseína (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), bem como, pela ação de proteases extracelulares oriundas de psicrotróficos (ZHANG *et al.*, 2015; CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016). O congelamento lento também pode desestabilizar a micela de caseína (FENNEMA; WILLIAM; ELMER, 1973; ZHANG *et al.*, 2006).

A tecnologia de fabricação do queijo compreende as seguintes etapas básicas: seleção e pasteurização do leite, coagulação do leite, corte da coalhada para liberação do lactosoro,

enformagem e prensagem, salga e embalagem (PERRY, 2004). A coagulação é a etapa decisiva na produção de queijos e visa concentrar a proteína do leite retendo também a gordura. A coagulação do leite atribui-se à caseína, que perde a sua estabilidade em função de vários agentes físicos e/ou químicos, dos quais a acidificação e a ação de enzimas proteolíticas são os que interessam para a produção de queijos (OLIVEIRA, 1986).

A obtenção da massa proteica pode ser realizada por meio de três processos: o tradicional, em que a massa é obtida por fermentação láctica; a coagulação enzimática, em que a massa é obtida pela adição de renina (coalho); e a acidificação direta, em que se adiciona ácido láctico ou acético ao leite aquecido (CUNHA, 2007).

A coagulação enzimática ocorre por produto denominado coalho ou coagulante (VAN DENDER, 2014). A principal enzima responsável por essa ação é a renina, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens. Ela atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em para-caseína que precipita em presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  formando então a coalhada. Este processo é dependente da temperatura, do pH e do teor de cálcio do leite. A massa obtida por coagulação enzimática é altamente mineralizada e com pH muito semelhante ao encontrado no leite (6,7 - 6,8) (BERGER *et al.*, 1989; VAN DENDER; GALLINA; ZACARCHENCO, 2014).

A coagulação ácida ocorre devido a diminuição do pH até chegar ao ponto isoelétrico da caseína, em torno de 4,6. Com essa acidificação, as cargas elétricas das partículas coloidais da caseína se neutralizam ou se igualam e a força de repulsão, devido ao excesso de cargas negativas existentes na caseína em um pH próximo da neutralidade, deixa então de existir, permitindo assim, que as partículas coloidais se unam formando o coágulo ou gel. Neste pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam (PERRY, 2004; OLIVEIRA, 1986).

Na coagulação ácida por fermentação, a acidificação do leite ocorre por meio da adição de cultura mesófila acidificante, composta normalmente por *Lactococcus lactis spp lactis* e *Lactococcus lactis spp cremoris*. A cultura utiliza a lactose do leite como substrato, produzindo ácido láctico e, com isso, reduz o pH e desestabiliza a caseína (VAN DENDER, 2014) e a massa obtida encontra-se completamente desmineralizada (OLIVEIRA, 1986).

Uma massa, quando submetida ao processo de acidificação direta a quente, apresenta uma elevação do ponto isoelétrico das caseínas devido à ação conjunta do calor e do ácido. Assim, a precipitação ocorre em um pH maior que 4,6, geralmente entre 5,2 a 5,5 (BERGER *et al.*, 1989; ALAIS, 1970; VAN DENDER; GALLINA; ZACARCHENCO, 2014). Desse modo, forma-se um coágulo com características intermediárias entre o coágulo ácido e o enzimático.

As massas obtidas em cada processo podem apresentar características diferentes, sendo que a principal delas é o pH (VAN DENDER; GALLINA; ZACARCHENCO, 2014), já que alterações deste influenciam a microestrutura e textura especialmente de queijos processados, devido aos efeitos sobre interações das proteínas, emulsificação de gordura e hidratação da caseína (MARCHESSEAU *et al.*, 1997). Barth, Tormena e Viotto (2017) evidenciaram que pequenas variações no pH da massa utilizada na fabricação de requeijão cremoso afetariam substancialmente a sua estrutura e propriedades.

Rapacci (1997) avaliou a influência da forma de acidificação do leite para produção de massa de queijo ácida usada em requeijões cremosos. A acidificação direta a quente demonstrou ser uma técnica prática para obtenção da massa, no entanto o sabor dos requeijões cremosos foi pouco pronunciado, quando comparado com o produzido com a massa de fermentação láctica, sendo que nesta foi evidenciado maior número de bandas eletroforéticas possivelmente devido a ação proteolítica da cultura adicionada. Ambas massas apresentaram capacidade de fusão, exibindo propriedades elásticas e formação de fio, porém em relação ao rendimento dos requeijões cremosos, a fermentação láctica foi maior (12,97%) frente a fermentação direta a quente (11,69%).

### 3.5 REQUEIJÃO CREMOSO

O requeijão cremoso é um produto tipicamente brasileiro, que ocupa importante lugar nas vendas e no consumo de lácteos, apresenta-se com variações de tecnologia e características de região para região (BOSI, 2008; VAN DENDER *et al.*, 2012). No mercado nacional de requeijão cremoso há diferentes possibilidades de variação do sabor, seja por meio da combinação de diferentes queijos para compor a mistura, ou ainda e, principalmente, mediante a utilização de condimentos ou outros ingredientes alimentícios de sabor característico (VAN DENDER; SPADOTI, 2009).

O requeijão é obtido pela fusão da massa ácida e/ ou enzimática, cozida ou não, dessorada e lavada e tem consistência que pode ser espalhada com uma faca à temperatura ambiente. Esta característica é devida à ausência de uma matriz proteica rígida como resultado da forte agitação e homogeneização com que o produto é submetido durante o processamento (RAMOS *et al.*, 2012; BELSITO *et al.*, 2017).

A massa de queijo deve ser misturada com o sal fundente e os outros ingredientes (creme, água e conservantes). Na etapa de fusão, a adição de sais fundentes ou emulsificantes é indispensável para o processamento de requeijão cremoso, estes quando dissolvidos na fase

aquosa, rompem as ligações de fosfato de cálcio que existem entre as micelas de caseína, substituindo o cálcio bivalente por sódio monovalente ou outro íon, permitindo a exposição dos grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos e assim as frações proteicas podem atuar como emulsificantes da dispersão óleo-água e conseqüentemente ocorre a formação de um sistema homogêneo e estável (MEYER, 1973;; FERNANDES, 1981; BERGER *et al.*, 1989; ZEHREN; NUSBAUM, 1992).

Os sais fundentes empregados são citratos, fosfatos e monofosfatos, ambos à base de sódio e potássio, com diferentes tamanhos de cadeia, selecionados em função das características desejadas de textura e funcionalidade do produto final. Os ortofosfatos, pirofosfatos, tripolifosfatos e os polifosfatos de cadeia longa são os mais utilizados (MAURER-ROTHMANN; SCHEURER, 2005). Sais de polifosfatos em geral possuem uma alta capacidade de retenção de água, no entanto, alguns tipos, se usados isoladamente, levam a uma supercremificação e a uma textura muito firme (BERGER *et al.*, 1989).

A cremificação é definida como o aumento na viscosidade da massa fundida, ocorre durante a fusão da massa, através da ação dos sais fundentes, sob aquecimento e agitação, com progressivas dispersões e hidratações da paracaseína, através das interações proteína-proteína e exposição dos grupos polares e apolares, a caseína liga-se a água e a gordura, e durante o resfriamento ocorre a formação de um gel (GUINEE; CARIĆ; KALAB, 2004; VAN DENDER, 2006). Este processo é controlado pelo tempo de fusão e rápida refrigeração, deste modo o produto retém a consistência cremosa e a estrutura curta necessária para se obter a untabilidade ideal (FERNANDES, 1981), sendo mantido sob refrigeração para sua adequada conservação (OLIVEIRA, 1986).

Os valores de pH do requeijão influenciam no processo de cremificação, quando abaixo de 5,4 danificam a estrutura e o sabor, tendem a formar uma textura muito firme e granular, enquanto que as amostras com valores de pH entre 5,5 e 5,7 resultam em queijos de consistência cremosa e firme. Os valores de pH superiores a 6,2, podem diminuir a interação proteína-proteína e aumentar a hidratação proteica, deixando a coalhada menos firme, diminuindo sua durabilidade, causando alterações na estrutura e alterando a consistência do produto (VAN DENDER, 2006).

A textura do requeijão pode ser determinada pelo conteúdo de proteínas, devido sua influência na reação de cremificação (VAN DENDER, 2006). Os principais parâmetros de textura do requeijão cremoso são: dureza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade e gomosidade (VAN DENDER, 2006) se espera que o produto seja fácil de espalhar, que não escorra após ser espalhado, permanecendo com textura cremosa. Em termos reológicos, isso

significa que o produto deve escoar (característica viscosa), porém manter a estrutura original (ou pelo menos boa parte dela) assim que cessa a aplicação da deformação (característica elástica) (SILVA *et al.*, 2012). Assim, as propriedades de textura indicam a aceitabilidade e consumo do produto final (RAPACCI, 1997; SZCZESNIAK *et al.*, 2002), sendo igualmente importante a um atributo de sabor e aroma (SILVA; VAN DENDER; MELLO, 2004).

A dureza dos queijos processados aumenta com o acréscimo do comprimento da cadeia dos polifosfatos aplicados individualmente. Este fenômeno pode ser explicado pela maior capacidade dos polifosfatos de realizar trocas iônicas do sódio do fosfato pelo cálcio da caseína, dispersando-a e estabilizando a água e gordura no sistema. Por outro lado, o pirofosfato tetrassódico confere dureza aos queijos processados devido à capacidade de formar complexos entre o pirofosfato, o cálcio e a caseína (NAGYOVÁ *et al.*, 2013).

Cunha, Alcântara e Viotto (2012) ao estudarem diferentes tipos de sais fundentes na elaboração de requeijões cremosos verificaram que a rede de proteínas com a maior quantidade de interações moleculares foi obtida com hexametáfosfato de sódio, evidenciada pelo alto grau de emulsificação de gordura encontrado no requeijão adicionado deste sal. O pirofosfato tetrassódico apresentou maior índice de consistência, que pode ser atribuída ao efeito combinado de seu pH elevado e distribuição homogênea do tamanho das partículas de gordura, considerando que em ordem decrescente de pH dos sais usados no estudo foram, tripolifosfato de sódio > pirofosfato tetrassódio > citrato de sódio > hexametáfosfato de sódio.

Dimitreli *et al.* (2005) verificaram que, para um queijo processado com umidade na faixa de 40% a 58%, o tripolifosfato pentassódico foi o sal que apresentou maior coeficiente de peptização, quando comparado com o pirofosfato tetrassódico, e ao mesmo tempo manteve o pH na faixa (5,5 - 6,1). O pirofosfato tetrassódico, por outro lado, resultou em queijos com pH muito elevado ( $\geq 6,1$ ) não sendo capaz de formar emulsões estáveis quando a umidade foi reduzida a 42,5% ou menor.

Rapacci (1997) avaliou a influência da forma de acidificação do leite para produção de massa de queijo ácida usada em requeijões cremosos, além de diferentes concentrações de sais fundentes (S9 e S10), verificando que com o aumento da quantidade de sal fundente nas formulações com massa de queijo proveniente da fermentação láctica, ocorria a produção de requeijões mais firmes, enquanto que as obtidas por acidificação direta a quente apresentaram redução deste parâmetro, independente do sal fundente utilizado.

Há também diversos estudos sobre redução dos teores de sódio e gordura dos requeijões cremosos, buscando ingredientes substitutos que garantam características físico-químicas e tecnológicas semelhantes ao tradicional (BOSI, 2008; VAN DENDER *et al.*, 2012; BELSITO

*et al.*, 2017). Para redução da gordura são indicados concentrado proteico de soro (WPC-34) como substituto (BOSI, 2008), visto que o mesmo auxilia na absorção da água, diminuindo a sensação da redução de gordura no alimento (CICHOSKI *et al.*, 2008). Já a redução de sódio pode ser obtida através da substituição de sais fundentes que contenham menor quantidade de sódio em sua composição à base de fosfatos de potássio e/ou cálcio e/ou sódio (VAN DENDER *et al.*, 2012).

A disponibilidade e integridade das caseínas é de extrema importância para a produção e definição das características do requeijão, o que pode estar correlacionado com a qualidade do leite e métodos de conservação da matéria-prima, bem como do tratamento térmico, visto que no período de refrigeração do leite, podem ocorrer modificações na estrutura da caseína devido as proteases produzidas por micro-organismos psicotróficos, e estas alterações podem interferir no rendimento e consistência coágulo (RAPACCI, 1997; DATTA; DEETH, 2001; WIKING *et al.*, 2002; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; ZHANG *et al.*, 2015; CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016; DE LA VARA *et al.*, 2018).

Com relação ao congelamento lento, este processo também pode provocar perda da estabilidade das micelas de caseína, devido ao aumento da concentração de cálcio, pois à medida que o leite congela, os solutos se concentram na parte líquida (BERGER, 2001; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Além disso, devido aos cristais de gelo formados pode ocorrer a modificação dos glóbulos de gordura (FENNEMA; WILLIAM; ELMER, 1973; MUIR, 1984; KEENAN; MATHER, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; PAZZOLLA *et al.*, 2013), sendo, portanto, importante verificar a temperatura que preserve as características do leite, que segundo Wendorff (2001) e Zhang *et al.* (2006) para o leite de ovelha seria pelo congelamento rápido (-27 °C e -25 °C) e assim, possibilitar a produção de queijo e requeijões com qualidade.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este ítem apresenta a metodologia utilizada no presente estudo. As análises físico-químicas, microbiológicas, enzimáticas, eletroforese e os parâmetros tecnológicos foram realizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA

O leite de ovelha da raça Lacaune foi fornecido pela Cabanha Três Leites, localizada em Lajeado Grande/SC. No Quadro 3, estão apresentados os meses e ano das referidas coletas com o volume de leite total produzido na Cabanha, estações correspondentes, bem como os dados sobre a precipitação mensal, temperatura média do ar diária, da região de Chapecó/SC, com latitude (Graus, DD) -27,09, longitude (DD) -52,64, fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), sendo estes relativos a região mais próxima do local de produção do leite.

Quadro 3 – Condições ambientais de precipitação e temperatura média do ar mensais, nas estações/meses de coleta de leite de ovelha, volume de leite total produzido na Cabanha neste mesmo período

<b>Estação</b>	<b>Meses de coleta</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Precipitação mensal (mm)</b>	<b>Temperatura média do ar mensal (°C)</b>	<b>Leite produzido (L/mês)</b>
Outono	Abril	2017	155,80	19,36	2407
Inverno	Agosto	2017	169,20	18,04	2909
	Agosto	2018	119,80	14,64	2408
Primavera	Novembro	2017	169,60	21,14	3722
Verão	Março	2017	100,80	22,76	2723
	Janeiro	2018	341,20	23,06	3161

Os dados de precipitação mensal, temperatura média do ar diária (°C) foram fornecidos pela EPAGRI. Leite produzido (volume total de leite de ovelha produzido no mês de coleta) fornecidos pela Cabanha Três Leites.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019, adaptado de EPAGRI e Cabanha Três Leites.

O procedimento de coleta para as 6 bateladas foi realizado após a ordenha da manhã, sendo o leite resfriado até 4 °C em tanque de resfriamento na cabanha e então envasado em embalagens plásticas de 1 L acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas até a UDESC, onde a temperatura foi verificada e o conteúdo homogeneizado manualmente e fracionado em frascos de polipropileno de 100 mL. O quantitativo de leite coletado foi utilizado para avaliação dos métodos de conservação e produção de requeijão cremoso, bem como para

verificar a influência das estações do ano na composição físico-química, contagens de mesófilos, psicrotróficos e suas atividades lipolíticas e proteolíticas do leite fresco.

Denominou-se leite de ovelha fresco (LF) para o leite de ovelha analisado no primeiro dia, ou seja, o da ordenha e coleta; leite de ovelha refrigerado (LR) para os mantidos sob refrigeração em incubadora refrigerada (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01), à  $4 \pm 0,1$  °C, avaliados ao longo de 10 dias, conforme definição de estudos preliminares, também apresentados neste documento; leite de ovelha congelado (LC), os quais foram congelados em freezer vertical (Consul, CVU26E) à  $-29,80 \pm 0,40$  °C e mantidos no mesmo até serem avaliados ao longo de 90 dias. Os referidos equipamentos foram monitorados em relação a temperatura durante o período de conservação, através de termostato digital.

Os leites submetidos aos diferentes métodos de conservação (LR e LC) foram avaliados em relação ao LF. Todas as amostras de leite de ovelha foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises, incluindo as de LC que foram descongeladas por 24 h de acordo com Nurliyani, Suranindyah e Pretiwi (2015), sob refrigeração à  $4 \pm 0,1$  °C em incubadora refrigerada (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01).

## 4.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

As análises do leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC), assim como, dos produtos elaborados (massa de queijo (MQ) e requeijão cremoso (RC)), e subproduto (soro (S)), são apresentadas na Tabela 1. As metodologias serão descritas posteriormente no item 4.5.1.

Inicialmente foram realizadas análises preliminares do leite de ovelha refrigerado durante 10 dias em relação ao pH, acidez e análises microbiológicas de contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos das coletas de março, abril e agosto de 2017. Considerando que o leite de ovelha não apresenta legislação específica no Brasil, utilizou-se os parâmetros acidez e pH em comparação com a contagem de mesófilos definido como padrões de qualidade do regulamento N° 853 da União Europeia (2004) para determinação do tempo de refrigeração no qual o leite apresentasse características aceitáveis para consumo e processamento.

A segunda etapa ocorreu nos meses de janeiro e agosto de 2018 e consistiu na avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do leite de ovelha, além das análises de estabilidade térmica do leite frente ao álcool e do coágulo no teste de ebulição (COB), bem como análises enzimáticas de atividade proteolítica e lipolítica e eletroforese. O leite de ovelha

refrigerado foi avaliado em 6 (definido em etapa preliminar) e 10 dias e o congelado, nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 dias (WENDORFF, 2001; ZHANG *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Planejamento das análises realizadas no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC), na massa de queijo (MQ), no soro (S) e no requeijão cremoso (RC) nos diferentes tipos de conservação, refrigeração (1 à 10 dias) e congelam

Tempo (dias)	Leite de ovelha (LO)	MQ	S	RC
	G, P, L, C, ST, SNG, M	pH, G, P, C, ST, SNG, M		
LF	pH, A, EA, COB, Micro, AP, AL, EF	R	-	Cor, TPA
LR2 a LR5 LR7 a LR9	pH, A, EA, COB, Micro, AP, AL	-	-	-
		pH, G, P, C, ST, SNG, M		
LR6 e LR10	pH, A, EA, COB, Micro, AP, AL, EF	R	-	Cor, TPA
LC15 e LC45	pH, A, EA, COB, Micro, AP, AL, EF	-	-	-
		pH, G, P, C, ST, SNG, M		
LC30, LC60 e LC90	pH, A, EA, COB, Micro, AP, AL, EF	R	-	Cor, TPA

Gordura (G), proteína (P), lactose (L), cinzas (C), sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), minerais (M): sódio, potássio, cálcio e magnésio, pH, acidez (A), estabilidade térmica através da análise de estabilidade ao álcool (EA) e o coágulo no teste de ebulição (COB). Análises microbiológicas (Micro) de contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, atividade proteolítica (AP) e atividade lipolítica (AL), eletroforese (EF), avaliação da cor instrumental (cor) e análise do perfil de textura (TPA) e rendimento (R).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Concomitante as análises do leite de ovelha, foram elaboradas massas de queijo e, posteriormente, requeijões cremosos a partir das massas de queijos produzidas com leite fresco, leite refrigerado com 6 e 10 dias e também no leite congelado em 30, 60 e 90 dias. A fim de analisar as características físico-químicas das massas de queijo, soros e requeijões cremosos, rendimento das massas de queijo, cor e textura dos requeijões cremosos. E assim, verificar o efeito dos processos de conservação do leite nestes parâmetros em relação aos produzidos a partir da massa de queijo obtida com leite de ovelha fresco.

#### 4.3 MASSA DE QUEIJO (MQ)

Primeiramente, os leites LF, LR6, LR10, LC30, LC60 e LC90 foram pasteurizados à  $65 \pm 0,1$  °C, por 30 min, sob agitação (300 rpm) em panela (Thermomix, Vorwerk), retirou-se uma alíquota para serem analisados quanto a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e de psicrotróficos para fins do controle do processo. Posteriormente, os leites

provenientes de cada tempo de conservação selecionados foram utilizados para elaboração das massas de queijo (MQ), denominadas MQLF, MQLR6, MQLR10, MQLC30, MQLC60 e MQLC90. E como subproduto, obteve-se os soros (S) denominados de SLF, SLR6, SLR10, SLC30, SLC60 e SL90.

Para produção da massa de queijo (MQ) utilizou-se 1,5 L de leite de ovelha pasteurizado e processo de coagulação mista, conforme metodologia descrita por Hanauer *et al.* (2016) com adaptações. A coagulação mista ocorreu adicionando, para cada litro de leite 0,40 mL de cloreto de cálcio 50% (Rica Nata), 0,02 g cultura láctica (*cultura starter*) (Ricaferm MT3, Rica Nata), previamente ativada em incubadora de bancada refrigerada (Lucadema, LUCA-223) com 150 mL de leite, à  $32 \pm 0,5$  °C, por 3h. A cultura láctica é composta das bactérias ácido-láticas *Lactococcus lactis sp lactis*, *Lactococcus lactis sp cremosis* e *Streptococcus salivarius sp thermophilus*. Posteriormente, adicionou-se 1,4 mL de coagulante líquido contendo a enzima quimosina (Ha-La, Chr Hansen), por litro de leite. Os ingredientes foram adicionados na ordem da descrição e homogeneizados por 1 min e acondicionados em embalagens retangulares de polipropileno e incubados (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01), à  $36 \pm 0,1$ °C, por 40 min.

Após a incubação, realizou-se o corte manual da coalhada, em cubos de  $1 \pm 0,2$  cm<sup>2</sup>, utilizando faca. Manteve-se em repouso por 5 min, para então realizar a mexedura por 3 min, seguida de repouso por 2 min, repetidamente, por 4 vezes. A coalhada foi dessorada e posteriormente a MQ foi acondicionada em forma cilíndrica (diâmetro de 15 cm), mantida a  $9 \pm 0,1$  °C, sob prensagem, utilizando peso de 950,2 g, por 20 h, em incubadora refrigerada (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01). Após a prensagem, as amostras foram encaminhadas para as análises de gordura, pH e umidade, sendo estas determinantes para definição da formulação do RC, além das anteriormente indicadas na Tabela 1, incluindo o soro. Foram realizadas duas coletas de leite em estações diferentes (replica de coleta) e destas elaborou-se uma massa de queijo em cada amostra de leite avaliada, para posteriormente produzir os requeijões cremosos.

#### 4.4 ELABORAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO (RC)

As formulações dos requeijões cremosos foram realizadas conforme descrito em Van Dender *et al.* (2012) e Belsito *et al.* (2017) com modificações. Objetivou-se um produto padrão contendo 14% de sólidos não gordurosos, 61% de umidade e 25% de gordura. Para isso, utilizou-se creme de leite considerando o teor de gordura e umidade de cada massa de queijo, a fim de compor o restante de gordura necessária para a formulação, sendo este ingrediente adicionado de maneira variável conforme a Tabela 2, considerando 100 g de massa de queijo.

Já as quantidades de sal fundente e sal comercial foram fixadas e corresponderam a 3% e 0,7% e respectivamente.

Os ingredientes utilizados para as formulações dos requeijões cremosos estão apresentados a seguir.

MQ produzida com o leite proveniente do LF e dos diferentes tempos de conservação LR6, LR10, LC30, LC60 e LC90, foram denominados de RCLF, RCLR6, RCLR10, RCLC30, RCLC60 e RCLC90. Sendo que os requeijões obtidos, foram elaborados com as MQ a partir de duas coletas de leite em estações diferentes (replica de coleta).

- Creme de leite comercial (Piracanjuba), com  $17 < 0,01\%$  de gordura,  $2,92 \pm 0,05\%$  de proteína,  $0,60 \pm 0,01\%$  de cinzas,  $25,30 \pm 0,17\%$  de sólidos totais,  $8,30 \pm 0,17\%$  de sólidos não gordurosos,  $80 < 0,01$  mg/100 g de sódio,  $48,01 \pm 10,11$  mg/100g de potássio,  $402,54 \pm 62,36$  mg/100 g de cálcio e  $51,57 \pm 2,06$  mg/100 g de magnésio e valores de pH de  $6,83 \pm 0,12$ ;
- Sal fundente JOHA S 9B, fornecido pela ICL FOODS. Segundo o fabricante, é composto polifosfatos de sódio e pirofosfato tetrassódico, e contém 28 g/100 g de sódio em sua composição. Sendo este, considerado um sal emulsificante de cadeia curta (DIAS, 2015);
- Sal comercial (cloreto de sódio) da marca Cisne, contendo 42,73 g/100 g de sódio em sua composição (DIAS, 2015).

Tabela 2 – Formulações de requeijão cremoso (RC) obtidos a partir das massas de queijo (MQ) elaboradas com leite fresco (MQLF), refrigerado (MQLR6, MQLR10) e congelado (MQLC30, MQLC60, MQLC90) e assim denominados RCLF, RCLR6, RCLR10, RCLC30, RCLC60 e RCL

*Formulações	Creme de leite (g)	**Umidade excedente (g)
RCLF	$82,88 \pm 19,82$	$25,45 \pm 8,96$
RCLR6	$122,22 \pm 2,38$	$28,45 \pm 8,35$
RCLR10	$95,97 \pm 13,16$	$21,50 \pm 8,98$
RCLC30	$104,08 \pm 4,65$	$29,34 \pm 6,64$
RCLC60	$114,90 \pm 11,92$	$27,52 \pm 7,19$
RCLC90	$101,42 \pm 0,82$	$29,00 \pm 2,82$

Média dos valores de cada batelada  $\pm$  desvio padrão.

\*Denominados RCLF (requeijão cremoso de massa de queijo de leite fresco), RCLR6 e 10 (requeijões cremosos de massas de queijos de leite refrigerado (LR) por 6 e 10 dias), RCLC30, 60 e 90 (requeijões cremosos de massas de queijos de leite congelado (LC) por 30, 60 e 90 dias).

\*\*Umidade excedente: consiste no conteúdo de água da MQ e ou do creme de leite (17% de gordura) que foi adicionado na formulação, buscando padronizar o teor de gordura da formulação padrão.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A elaboração do requeijão cremoso foi realizada adicionando todos ingredientes à Thermomix, Vorwerk, compondo 400 g em cada batelada e então submetidos à fundição à temperatura de  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação (500 rpm), por 7 min. Amostras foram retiradas para

realização de análise de umidade e pH, além do fracionamento em 50 g para acondicionamento em frascos de polipropileno de 200 mL, e posterior refrigeração à  $4 \pm 0,1$  °C (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01) durante 48 h, para realização das análises de cor instrumental, perfil de textura (TPA), bem como as demais análises físico-químicas, conforme descrição da Tabela 1.

#### 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A seguir estão dispostos os métodos analíticos utilizados no presente estudo, sendo estes realizados em triplicata.

##### 4.5.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas foram pH, acidez (A), gordura (G), proteína (P), lactose (L), cinzas (C), sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), minerais (M): sódio, potássio, cálcio e magnésio. Na Tabela 3 estão apresentados de forma sucinta as análises físico-químicas, métodos e referência utilizadas no leite e seus produtos.

Tabela 3 – Análises físico-químicas, métodos e referências utilizados para as análises do leite de ovelha, massa de queijo (MQ), soro (S) e requeijão cremoso (RC) obtidos a partir dos diferentes tempos de conservação do leite de ovelha

<b>***Análises</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<b>pH</b>	(Potenciométrico)	Medidor de pH de bancada (Hanna, HI 2221)
<b>A</b>	(Titulométrico n° 947.05)	(AOAC, 2016)
<b>G</b>	*(Gerber n° 2000.18)	(AOAC, 2016)
	** (Gerber)	(BSI, 1989)
<b>P</b>	(Micro - Kjeldahl para N total, F 6,38)	
	*(n° 991.20)	(AOAC, 2016)
	** (n° 2001.14)	
<b>L</b>	(Glicídios redutores em lactose)	(LANE; EYNON, 1923)
<b>C</b>	(Gravimétrico n° 935.42)	
<b>ST</b>	(n° 990.20)	
<b>SNG</b>	(n° 990.21)	(AOAC, 2016)
<b>M</b>	(Espectrofotometria de absorção atômica n° 985.35)	

\* Método usado somente no leite de ovelha;

\*\* Método utilizado para os demais MQ, S, RC;

\*\*\* Acidez (A), gordura (G), proteína (P), lactose (L), cinzas (C), sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), minerais (M): sódio, potássio, cálcio e magnésio.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

## 4.5.2 Estabilidade térmica do leite de ovelha

A seguir estão dispostas as análises de estabilidade térmica utilizadas no presente estudo.

### 4.5.2.1 Coágulo no teste de ebulição

A estabilidade do leite de ovelha pela análise do coágulo no teste de ebulição (COB) foi realizada utilizando 10 mL de amostra em um tubo de ensaio submetido à fervura, em bico de Bunsen, sob agitação constante manualmente, para se observar a presença (+) ou ausência (-) de coagulação e/ou precipitação, adaptado de Wasiksiri *et al.* (2010) e Lai *et al.* (2016).

### 4.5.2.2 Estabilidade ao álcool

A estabilidade do leite de ovelha frente ao álcool foi determinada utilizando 2 mL de amostra e etanol na proporção 1:1 em placa de Petri. As concentrações de etanol utilizadas foram de 70% a 40%, variando a cada 2% adaptado de Wasiksiri *et al.* (2010) e Lai *et al.* (2016). O processo foi padronizado, adicionando, primeiramente o leite de ovelha e depois a solução de etanol, lentamente sob agitação durante  $35 \pm 5$  s. Após  $30 \pm 5$  s do término da adição, ainda sob agitação, a presença de precipitações foi verificada, sendo estável a concentração de etanol na qual o leite apresentasse aspecto sem grumos ou com uma ligeira precipitação, com poucos grumos muito finos nas paredes do recipiente (WASIKSIRI *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2016).

## 4.5.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas do leite de ovelha cru e pasteurizado foram realizadas conforme o método de plaqueamento em superfície e usou-se o ágar padrão para contagem (PCA- *Plate Count Agar*) da marca Reatec. As amostras foram submetidas a diluições seriadas até  $10^{-8}$  em água peptonada (0,1%) estéril e inoculadas em placas contendo PCA.

#### 4.5.3.1 Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos

A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos foi realizada segundo Morton (2001). Após a inoculação das placas de PCA, estas foram invertidas e incubadas à  $35 \pm 1$  °C, por 48 h, e em seguida realizou-se a contagem das colônias que apareceram nas placas.

#### 4.5.3.2 Contagem total de micro-organismos aeróbios psicotróficos

A contagem total de micro-organismos aeróbios psicotróficos foi realizada segundo Cousin, Jay e Vasavada (2001). Após a inoculação das placas de PCA, estas foram invertidas e incubadas à  $7 \pm 1$  °C, por 10 dias. Passado este período, ocorreu a contagem das colônias que apareceram nas placas.

### 4.5.4 Análise de atividade proteolítica e lipolítica

A seguir estão dispostas as análises enzimáticas utilizadas no presente estudo.

#### 4.5.4.1 Atividade Proteolítica

A determinação da atividade proteolítica do leite de ovelha foi realizada de acordo com o método relatado por Bendicho *et al.* (2002), adaptado para o leite de ovelha segundo Palomba *et al.* (2017).

A curva padrão foi construída relacionando a atividade da protease líquida de *Bacillus spp.* (Sigma, Aldrich), usando uma amostra de leite de ovelha fresco, caracterizada por possuir uma atividade proteolítica baixa. A solução estoque foi obtida adicionando 330 mg de protease em 30 mL de leite de ovelha. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi calculado por meio de análise de mínimos quadrados, após três repetições das 5 concentrações diferentes (0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 mU/mL) previamente selecionadas para a faixa de absorvância do leite de ovelha fresco, segundo Palomba *et al.* (2017). Os valores de absorvância obtidos foram quantificados por comparação com a curva padrão (Apêndice 1).

A análise foi conduzida através da adição de 4 mL de solução de azocaseína (1%) (Sigma Aldrich), preparada com tampão fosfato de sódio pH 7,2 e 400 µL de leite de ovelha, em tubo Falcon, seguida de incubação em banho-maria (Solab, SL-157) à  $35,5 \pm 0,5$  °C, sob agitação orbital (40 rpm), durante 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 8 mL de

ácido tricloroacético (TCA) (5%). Após, centrifugou-se (4000 rpm) em centrífuga de bancada (Solab, SL-700), à temperatura ambiente, durante 4 min. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo Whatmann 2 (Sigma, Aldrich), e a absorbância determinada a 345 nm no espectrofotômetro UV-visível (Biospectro, espectrofotômetro SP-22), sendo que este contém o grupo cromógeno liberado pela atividade da protease na azocaseína, enquanto o precipitado inclui os componentes do leite e a fração de azocaseína não degradada.

O espectrofotômetro foi zerado com o branco do aparelho que consistia na substituição da alíquota de amostra na reação, pelo tampão fosfato de sódio pH 7,2. O branco da amostra foi obtido através da adição do TCA (5%) antes da amostra de leite, a fim de impedir a reação do leite com a azocaseína, sendo que passou pelas mesmas etapas conduzidas para a reação, assim como o branco do aparelho.

#### 4.5.4.2 Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica do leite de ovelha foi determinada utilizando como substrato o azeite de oliva extravirgem, considerando que segundo Zhang *et al.* (2006) o leite de ovelha congelado possui os ácidos graxos C<sub>16:0</sub> variam de 22,1% a 22,4%, e as de C<sub>18:1</sub> de 17,5% a 17,7% como frações majoritárias e o azeite de oliva comercial, da mesma forma os ácidos graxos C<sub>16:0</sub> 12,36 ± 0,47% e C<sub>18:1</sub> de 58,56 ± 0,51% (CARDOSO *et al.*, 2010).

O azeite de oliva extravirgem (10% m/v) foi emulsionado em agitador mecânico (Tecnal, TE -139) por aproximadamente 3 min com goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). Para o preparo da reação foi adicionado 2 mL de leite de ovelha e 18 mL da emulsão conforme Rigo *et al.* (2012). A reação foi realizada sob agitação (160 rpm), a 37 °C, em *shaker* de bancada (Lucadema, LUCA-223) (MA; BARBANO; SANTOS, 2003), durante 15 min (RAJMOHAN; DODD; WAITES, 2002; RIGO *et al.*, 2012). A reação foi interrompida pela adição de 20 mL de mistura de acetona-etanol (1:1) e os ácidos graxos produzidos extraídos através da titulação com solução NaOH 0,1 N, até o ponto final, verificado ao atingir o pH 11 (GOMBERT *et al.*, 1999; RIGO *et al.*, 2012), sob agitação (200 rpm), durante 10 min (GOMBERT *et al.*, 1999). Os ensaios em branco foram realizados adicionando o leite logo após a adição da solução acetona-etanol.

#### 4.5.5 Eletroforese

As análises das frações de proteína  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína foram realizadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a qual foi realizada conforme Laemmli (1970) com modificações e os géis foram corados segundo método descrito por Merrill (1990), com adaptações.

##### 4.5.5.1 Preparo das amostras

As amostras de leite de ovelha foram diluídas 1:50 com água ultrapura buscando a formação de bandas nítidas. O preparo da amostra foi realizado em tubo de Eppendorf devidamente identificado, utilizando-se 200  $\mu$ L de amostra diluída e 40  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) (60%), sem agitação. A solução foi preparada em *overnight* e mantida em congelador (Consul Frost Free Facilite, CRB36AB) para sua desnaturação.

Para realizar a desnaturação das amostras utilizou-se centrifuga refrigerada à 4 °C (Quimis, Q222e) com velocidade de 10.000 rpm, por 30 min. Após, o líquido contido nos tubos Eppendorf foi retirado cuidadosamente para que o pellet permanecesse intacto, e então foi adicionado 100  $\mu$ L de solução de acetona 90% refrigerada, sem agitação. As amostras foram centrifugadas novamente, repetindo-se o processo por 2 vezes.

Na terceira centrifugação (última), retirou-se a solução de acetona 90% adicionou-se 50  $\mu$ L do tampão da amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol, sem agitação para que o pellet permanecesse intacto. Após, as tampas dos tubos Eppendorf foram furadas com auxílio de uma agulha e aquecidas a 100 °C, por 10 min. Depois congeladas (1 h) até o momento da corrida, em caso de não realizar a produção do gel. O tampão da amostra era composto de 1,2 mL de tampão TRIS 0,5 M (pH 6,8), 2 mL de solução de SDS 10%, 1 mL de glicerol 100%, 0,5 mL de solução alcoólica de Bromofenol blue 0,5%, 4,8 mL de água destilada e 0,5 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol.

##### 4.5.5.2 Preparo dos géis e corrida eletroforética

O preparo dos géis foi realizado concomitantemente com o preparo e desnaturação das amostras, sendo a composição dos géis utilizados a base de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para o gel de resolução (15%) foi utilizado 4,925 mL de solução de acrilamida/bis acrilamida (30:08), 5,00 mL de tampão Tris – HCl – SDS 0,75 M (pH 8,8), 75  $\mu$ L de persulfato de amônio

10% (m/v), 5 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina). Já o gel de empilhamento (3%) foi elaborado com 0,50 mL de solução de acrilamida/bis acrilamida (30:08), 2,50 mL de tampão Tris – HCl – SDS 0,25 M (pH 6,8), 75 µL de persulfato de amônio 10% (m/v), 7,5 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina). A geleificação dos géis foi realizada em incubadora refrigerada (BOD) (Lucadema, LUCA-161/01), à (25 °C ± 0,1), por 40 min.

As condições de corrida foram ajustadas definindo a voltagem de 250 V, amperagem 30 A e tempo de 1 h, em cuba eletroforética vertical LCV (Armstrong Biosciences) e fonte LPS (Loccus Biotecnologia). A quantidade de proteína aplicada em cada poço do gel foi a mesma para todas as amostras (20 µL), já para o marcador de massa molecular (3,4 - 100 kDa) (Sinapse Biotecnologia), utilizou-se 15 µL.

Ao final da eletroforese, as proteínas foram reveladas em solução corante azul brilhante (BLUER - 250), onde permaneceram por 24 h. As bandas foram expostas com água destilada e aquecimento em micro-ondas por 10 s, sendo este procedimento repetido.

#### 4.5.6 Análise de rendimento

O rendimento da MQ foi calculado conforme Silveira e Abreu (2003) através da divisão do volume de leite utilizado (L) pela massa de produto obtido (kg). Para expressar o volume total de soro eliminado no processo, dividiu-se o mesmo pelo volume total de leite utilizado na produção da MQ.

#### 4.5.7 Avaliação da cor instrumental

A avaliação da cor instrumental do requeijão cremoso (RC) foi realizada com auxílio do colorímetro digital (HunterLab, MiniScan EZ 4500 L). A Equação 1 apresenta a variação de cor ( $\Delta E$ ), relacionando as variações de luminosidade  $L^*$  (branco ao negro) e cromaticidade  $b^*$  (azul ao amarelo). Para a avaliação das amostras de RC, somente os parâmetros  $L^*$  e  $b^*$  foram utilizados, pois a cor dos queijos fundidos varia do creme ao branco (BOSI, 2008).

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (1)$$

Para o  $\Delta E$ , segundo Francis e Clydesdale (1975) com adaptações, valores próximos de zero indicam que as formulações resultaram em um produto com características semelhantes ao

padrão e, diferenças, iguais ou superiores a dois, podem ser consideradas como uma diferença entre dois tratamentos perceptivelmente visíveis ao olho humano. O  $\Delta$  é a diferença entre cada parâmetro de cor da amostra padrão e a amostra teste.

#### 4.5.8 Análise do perfil de textura (TPA)

As análises do perfil de textura das amostras de requeijão cremoso foram realizadas em sextuplicata, e ocorreram com o auxílio do texturômetro (Brookfield, CT3 Texture Analyzer), probe cilíndrica de acrílico com 25,4 mm de diâmetro, movida perpendicularmente sobre a amostra ( $10 \pm 0,1$  °C). As condições do teste foram: célula de carga de 500 N, distância de compressão de 20% da altura do produto, velocidade de 1,0 mm/s, tempo de contato de 5 s com dois ciclos de penetração, sendo analisadas as características mecânicas de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade de acordo com Silva *et al.* (2012) com modificações.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata, exceto a análise do perfil de textura em sextuplicata. Posteriormente, os resultados foram verificados pela análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média de Tukey a 5%, através *Software* STATISTICA 13.2 Trial (Statsoft), considerando um nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Ao todo foram realizadas 6 coletas de leite de ovelha, em diferentes estações do ano, buscando verificar a repetitividade dos resultados analíticos. Além disso, alguns dados foram submetidos a análise de componentes principais (APC), utilizando o software XLSTAT versão 2015.2.02 (Addinsoft, Paris, França).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e discussão referentes ao comportamento do leite de ovelha fresco e os conservados sob refrigeração e congelamento, bem como dos seus produtos elaborados na presente pesquisa.

### 5.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO LEITE DE OVELHA FRESCO, REFRIGERADO E CONGELADO EM RELAÇÃO AOS PADRÕES DE QUALIDADE E FRAÇÕES PROTEICAS.

Os resultados do estudo preliminar realizado com o leite de ovelha coletado em março, abril e agosto de 2017 e mantido sob refrigeração durante 10 dias, são apresentados buscando avaliar o padrão de qualidade pela relação do pH e acidez com a contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotóxicos. Em etapa posterior, são abordados os resultados sobre as coletas de leite de ovelha de janeiro e agosto de 2018, em relação ao leite fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC), e a composição química, pH, estabilidade térmica das proteínas, análises microbiológicas, atividades proteolíticas e lipolíticas, e o comportamento das frações proteicas por SDS-PAGE.

#### 5.1.1 Estudos preliminares

Os resultados médios sobre a composição dos leites frescos obtidos nas coletas de março, abril e agosto de 2017 foram: gordura ( $6,10 \pm 0,07\%$ ), proteína ( $5,01 \pm 0,21\%$ ), lactose ( $4,57 \pm 0,09\%$ ), cinzas ( $0,90 \pm 0,03\%$ ), sólidos totais ( $16,42 \pm 0,16\%$ ), sólidos não gordurosos ( $10,27 \pm 0,22\%$ ).

Os valores obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Hanauer *et al.* (2016), do leite de ovelha da raça Lacaune produzido em região próxima ao do presente trabalho, de gordura ( $6,73 \pm 0,35\%$ ), proteína ( $5,04 \pm 0,03\%$ ), lactose ( $4,84 \pm 0,38\%$ ) e cinzas ( $0,89 \pm 0,01\%$ ). Fava, Kulkamp-Guerreiro e Pinto (2014a) ao avaliar o leite de ovelhas da raça Lacaune no Rio Grande do Sul, relataram valores de gordura e sólidos totais ( $8,28 \pm 0,48\%$  e  $19,59 \pm 0,55\%$ ), respectivamente, superiores ao presente estudo, no entanto os teores de proteína ( $5,27 \pm 0,20\%$ ) e lactose ( $4,44 \pm 0,18\%$ ) foram próximos. Entre os teores de gordura pode estar associada à produção média de leite por dia, estação do ano (SILVEIRA *et al.*, 2017), período de lactação (BRITO *et al.*, 2006), entre outros fatores.

Na Tabela 4 são descritos o pH, acidez, contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos no leite de ovelha refrigerado pelo período de 10 dias. Todos os parâmetros avaliados apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de refrigeração. O pH do LF apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas com o LR10, considerando que em 10 dias de refrigeração o menor pH foi evidenciado. Já a acidez após oito dias de refrigeração (LR8) aumentou consideravelmente em relação ao LF sendo estes estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Na contagem de micro-organismos mesófilos ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o LF e os leites refrigerados após 6 dias de conservação (LR6), enquanto que a contagem de psicrotróficos apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) após 5 dias (LR5). Isto mostrou que a refrigeração teve maior efeito nos micro-organismos psicrotróficos, uma vez que após 5 dias de refrigeração estes tiveram alterações, seguido da contagem de mesófilos, acidez e pH.

Em relação a qualidade do leite de ovelha refrigerado, observou-se que os leites oriundos de três coletas em meses distintos até o sexto dia de refrigeração (LR6) estaria com padrões microbiológicos aceitáveis dentro do limite ( $6,18 \log \text{ UFC/mL}$ ) de contagem em placas à  $30^\circ\text{C}$ , para leite cru de ovelha que seja submetido a um processo com tratamento térmico antes da obtenção de produtos segundo a legislação europeia UE (2004) para leite de ovelha. Cabe ressaltar que no Brasil devido à ausência de uma legislação específica para o leite de ovelha, a IN 62 (BRASIL, 2011) é considerada como a única vigente, mesmo que estabeleça critérios para o leite bovino, neste sentido, os valores encontrados no presente estudo, estariam superiores aos recomendados na referida ( $5,95 \log \text{ UFC/mL}$ ).

A correlação da contagem de mesófilos com os valores pH (-0,83) e acidez (0,85), indicaram que com o aumento da contagem microbiana, ocorreu a redução dos valores de pH e aumento da acidez, refletindo nos padrões de qualidade do leite. O aumento da acidez poderia causar perda de estabilidade da caseína, considerando estaria relacionada com o aumento da contagem de mesófilos observada após o LR6 e conseqüentemente no LR8 para acidez. Cabe ressaltar que alguns componentes do leite podem contribuir para o aumento da acidez, sem causar alteração na estabilidade da caseína (BRITO *et al.*, 2006), uma vez que estudos relatam que o leite de ovelha com acidez de 0,3% apresentou capacidade de processamento de iogurte (REVERS *et al.*, 2016). Contudo, no presente estudo onde o LF com 0,19% de acidez e LR10 com 0,3% de acidez indicou não ser acidez natural do leite, e sim a desenvolvida de acordo com De La Vara *et al.* (2018).

A acidez e o pH apresentaram correlação negativa (-0,94), indicando que conforme ocorria o aumento da acidez no decorrer do tempo de refrigeração, o pH diminuía. Fava,

Külkamp-Guerreiro e Pinto (2014a) observaram o mesmo comportamento para leite de ovelha em relação a redução do pH e estabilidade térmica frente ao álcool, enquanto que a acidez aumentava.

O desenvolvimento de bactérias psicotróficas segundo Silva e Torres (1995) é favorecido a temperaturas na faixa de 2 °C a 10 °C, comportamento verificado ao comparar a contagem do LF (3,65 log UFC/mL) com as obtidas nos tempos de refrigeração, sendo que até sexto dia apresentaram contagem menor que 6 log UFC/mL, cabendo ressaltar que Santos *et al.* (2013), relataram que o número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção, ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado.

Tabela 4 – Avaliação do pH, acidez, contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicotróficos no período de 10 dias do leite de ovelha refrigerado (LR) em comparação ao leite fresco (LF)

Amostra	pH	Acidez (%)	Mesófilos (log UFC/mL)	Psicotróficos (log UFC/mL)
LF	6,45 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,35 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,05 <sup>a</sup>
LR2	6,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 < 0,01 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,71 <sup>abd</sup>	4,00 ± 0,04 <sup>ab</sup>
LR3	6,45 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,82 <sup>ad</sup>	4,02 ± 0,08 <sup>ab</sup>
LR4	6,43 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,21 < 0,01 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,16 <sup>abd</sup>	4,53 ± 0,07 <sup>ab</sup>
LR5	6,44 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,23 < 0,01 <sup>a</sup>	5,75 ± 0,64 <sup>abcdef</sup>	5,14 ± 0,79 <sup>bcd</sup>
LR6	6,39 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,23 < 0,01 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,47 <sup>bcddef</sup>	5,85 ± 0,50 <sup>cdefg</sup>
LR7	6,34 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,70 ± 0,84 <sup>cdef</sup>	6,11 ± 0,43 <sup>defg</sup>
LR8	6,30 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>bcd</sup>	7,23 ± 0,95 <sup>cdef</sup>	6,52 ± 0,52 <sup>efg</sup>
LR9	6,29 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>cd</sup>	6,54 ± 0,29 <sup>ef</sup>	6,63 ± 0,37 <sup>fg</sup>
LR10	6,21 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,30 < 0,01 <sup>d</sup>	6,61 ± 0,08 <sup>f</sup>	6,73 ± 0,27 <sup>g</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais na coluna em cada análise indicam que não há diferença significativa entre as médias do leite fresco e dos leites refrigerados pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Considerando os dados analisados, os demais resultados do LR serão avaliados no tempo de 6 dias de refrigeração (LR6), sendo que neste foram obtidas contagens de mesófilos limites de acordo com a legislação europeia (UE, 2004). Já o LR10, será acompanhado para verificar as características do leite de ovelha com contagem microbiana acima de 6,18 log. UFC/mL, buscando o viés científico, uma vez que com este padrão de qualidade microbiológica, o mesmo não seria recebido em plantas industriais.

Cabe ressaltar que a composição química e a qualidade do leite de ovelha podem variar conforme muitos fatores, dentre eles as condições ambientais e a localidade de produção (PARK *et al.*, 2007), evidenciando a importância de estudos sobre a caracterização do leite

produzido em diferentes estações e condições, permitindo a elaboração de uma legislação brasileira que descreva os padrões de identidade e qualidade do leite de ovelha.

### **5.1.2 Análise do comportamento do leite de ovelha refrigerado e congelado ao longo do tempo de conservação em comparação ao leite de ovelha fresco**

Os valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas das bateladas coletadas em janeiro e agosto de 2018 foram: gordura ( $6,52 \pm 0,33\%$ ), proteína ( $5,35 \pm 0,11\%$ ), lactose ( $4,22 \pm 0,04\%$ ), cinzas ( $0,89 \pm 0,02\%$ ), sólidos totais ( $16,59 \pm 0,33\%$ ), sólidos não gordurosos ( $10,07 \pm 0,33\%$ ), sódio ( $63,95 \pm 7,85$  mg/100 g), potássio ( $98,46 \pm 5,50$  mg/100 g), cálcio ( $178,45 \pm 9,33$  mg/100 g), magnésio ( $26,05 \pm 4,03$  mg/100 g).

Os valores obtidos neste estudo foram semelhantes aos relatados por Bianchi *et al.* (2014) para ovelhas Lacaune em período de lactação ( $\pm 10$  dias), com o mesmo peso, número de parições, idades e volume de produção de leite e assim como o presente trabalho, coletado na região Oeste de SC. Ao longo dos experimentos (0, 60 e 120 dias), foram relatados valores médios de  $6,61 \pm 0,21\%$  de gordura,  $4,75 \pm 0,36\%$  de proteína,  $4,68 \pm 0,25\%$  de lactose e  $1,73 \pm 0,30$  L/dia produção de leite sem diferença significativa. Este comportamento também foi observado no presente estudo, com relação as coletas realizadas nos experimentos preliminares e as avaliações desta seção.

Giroux, Veillette e Britten (2018) relataram valores médios de gordura ( $6,42 \pm 0,04\%$ ), sólidos não gordurosos de ( $12,4 < 0,01\%$ ), proteína ( $5,79 \pm 0,12\%$ ), lactose ( $4,62 \pm 0,03\%$ ), para o leite de ovelha em estudo realizado no Canadá. Os valores de gordura e sólidos não gordurosos foram semelhantes ao presente trabalho. Quanto aos minerais, os teores do presente estudo foram maiores em relação ao sódio ( $35,40 < 0,01$  mg/100 g), cálcio ( $114,30 \pm 7,00$  mg/100 g) e magnésio ( $18,40 \pm 1,00$  mg/100 g), representando 1,8; 1,5; 1,4 vezes, respectivamente os relatados por Giroux, Veillette e Britten (2018). No entanto, o potássio foi superior ao presente estudo ( $151,00 \pm 24,00$  mg/100 g).

#### *5.1.2.1 Micro-organismos mesófilos, pH, acidez, estabilidade térmica frente ao álcool e análise do coágulo no teste de ebulição no leite de ovelha fresco, refrigerado e congelado*

Na Tabela 5 estão apresentados a contagem de micro-organismos mesófilos e os valores de pH, acidez e estabilidade térmica frente ao álcool no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC). A contagem de micro-organismos mesófilos desta etapa do estudo

apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do LR em relação ao LF, porém não deste último em relação ao LC, ou seja, o LR apresentou um aumento nas contagens enquanto o LC manteve estas.

A contagem de mesófilos do LF foi semelhante aos obtidos na etapa do estudo preliminar (Tabela 4), sendo que no LR6 (Tabela 5), a contagem foi maior até mesmo que o limite permitido pela UE (2004). O leite de ovelha refrigerado durante 7 dias à  $(4 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C})$  em estudo de Balthazar *et al.* (2018) também apresentou aumento da contagem de mesófilos no decorrer do período de estocagem. Os resultados encontrados nesta pesquisa para o leite de ovelha congelado durante 90 dias à  $-29,80 \pm 0,40 \text{ }^\circ\text{C}$ , não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao LF. Balthazar *et al.* (2018) indicaram a redução da contagem microbiana de leite de ovelha cru desnatado congelado à  $(-20 \pm 1,00 \text{ }^\circ\text{C})$  até 180 dias. A mortalidade durante o descongelamento dos produtos pode ocorrer devido à exposição das células a efeitos osmóticos (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014; TRIPATHI; GIRI, 2014). Contudo, o descongelamento realizado nesta etapa da pesquisa possivelmente, não causou alterações na contagem de mesófilos, uma vez que estas não apresentaram diferença em relação ao LF.

A acidez não apresentou diferença significativa entre o LF, LR6 e os congelados (LC) ( $p < 0,05$ ). O aumento da acidez do leite de ovelha ao longo do tempo de refrigeração, especialmente no LR10 pode estar relacionado com a contagem de aeróbios mesófilos, visto que eles possuem atividade acidificante (FAGUNDES *et al.*, 2006). Os resultados indicaram correlação positiva entre a acidez e mesófilos considerando os valores de LF, LR (0,86) assim como, LF, LC (0,69).

A correlação da contagem de mesófilos e os valores de acidez para os estudos preliminares no LF, LR (0,85) foram semelhantes ao encontrado nesta seção (0,86). Embora na presente etapa da pesquisa o crescimento microbiano no período de refrigeração (LR6) tenha sido maior do que nos experimentos preliminares, a acidez apresentou-se dentro dos limites aceitáveis relatados por Park *et al.* (2007), de 0,22% a 0,25% (ácido láctico). Este parâmetro é normalmente utilizado como indicador do estado de conservação do leite, em função da relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico, por ação microbiana, que acarreta aumento da acidez e diminuição do teor de lactose (PARK *et al.*, 2007).

O pH e a estabilidade ao álcool do leite de ovelha reduziram ao longo do tempo de refrigeração, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no LR10 em relação ao LF e LC. No congelamento não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras ao longo do tempo de conservação. O pH e a estabilidade ao álcool foram inversamente proporcionais a

acidez, apresentando correlação positiva entre eles considerando os valores de LF, LR (0,96) assim como, LF, LC (0,24).

Tabela 5 – Avaliação da atividade microbiana por micro-organismos mesófilos e seu efeito no pH, acidez e estabilidade térmica frente ao álcool no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo

Amostra	Mesófilos (log UFC/mL)	pH	Acidez (%)	Estabilidade ao álcool (%)
LF	4,19 ± 0,56 <sup>a</sup>	6,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	65 ± 3,46 <sup>a</sup>
LR6	7,06 ± 0,27 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 < 0,01 <sup>a</sup>	63 ± 3,46 <sup>a</sup>
LR10	7,89 ± 0,43 <sup>b</sup>	6,26 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>b</sup>	50 ± 6,93 <sup>b</sup>
LC15	6,18 ± 1,71 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	64 ± 4,62 <sup>a</sup>
LC30	5,67 ± 1,26 <sup>a</sup>	6,59 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	64 ± 4,62 <sup>a</sup>
LC45	5,64 ± 1,54 <sup>a</sup>	6,56 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	63 ± 3,46 <sup>a</sup>
LC60	5,75 ± 1,50 <sup>a</sup>	6,57 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	63 ± 3,46 <sup>a</sup>
LC90	5,61 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,56 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	63 ± 3,46 <sup>a</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais nas colunas em cada análise indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), a estabilidade da proteína do leite diminui à medida que a acidez aumenta, comportamento observado na Tabela 5, ou seja, uma redução significativa na estabilidade do leite durante a análise do álcool no leite refrigerado (LR10), possivelmente devido à sua maior acidez, oriunda da contagem de mesófilos. Os resultados indicaram correlação negativa entre a acidez e estabilidade térmica considerando os valores de LF, LR (0,98) assim como, LF, LC (0,87). Estudos indicam que a estabilidade do leite é negativamente relacionada à acidez, já que a redução do pH do leite diminui o teor de caseinato de fosfato de cálcio e aumenta a concentração do cálcio iônico, que reduz as forças de repulsão entre caseínas e favorece a coagulação do leite (GUO *et al.*, 1998; HORNE, 2016; DE LA VARA *et al.*, 2018).

O valor médio de estabilidade ao álcool do LF, foi de 65%, característico aos encontrados para pequenos ruminantes em torno de 63% (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014<sup>a</sup>; DE LA VARA *et al.*, 2018), quando comparadas as de leite bovino, esta diferença está associada a acidez, concentração de fosfato e citrato, cálcio iônico e força iônica (DAVIES; WHITE, 1958; CHAVEZ *et al.*, 2004; HORNE, 2016; MACHADO *et al.*, 2017), teor de gordura, proteína, bem como sólidos totais, maior acidez, além do conteúdo mineral com diferentes proporções (DE LA VARA *et al.*, 2018; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018). O leite de ovino encontra-se na faixa intermediária entre o caprino e o bovino, uma vez

que, segundo Guo *et al.* (1998) relacionaram os menores valores de estabilidade ao álcool do leite de cabra fresco as suas proporções de sódio/potássio (WASIKSIRI *et al.*, 2010; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; LAI *et al.*, 2016; DE LA VARA *et al.*, 2018).

Além da estabilidade ao álcool, na análise do coágulo no teste de ebulição (COB) observou-se que, no período avaliado, todas as amostras não apresentaram precipitação, apesar do LR10 apresentar acidez elevada (0,31%), pH reduzido (6,26) e o menor valor de estabilidade ao álcool (50%). Aparentemente, o LR10 possuía maior quantidade de partículas suspensas, em comparação aos demais, o que de acordo com Walstra, Wouters e Geurts (2006) possa estar relacionado a dissolução dos fosfatos de cálcio coloidais, que resultam na dissociação da caseína, assim como, devido aos ácidos graxos produzidos pela lipólise diminuírem o pH e elevar a acidez do leite. Porém, cabe ressaltar que o aumento da acidez também pode ocorrer devido a contagem de aeróbios mesófilos (FAGUNDES *et al.*, 2006), o que possivelmente seria o mais provável devido ao seu aumento significativo neste período.

Os valores obtidos de pH, acidez e estabilidade ao álcool foram semelhantes aos encontrados por Fava, Külkamp-Guerreiro e Pinto (2014a), sendo para o leite fresco de ovelhas da raça Lacaune produzidos no Rio Grande do Sul mensalmente avaliado durante 1 ano, assim como para o refrigerado e congelados, no tempo de 7 dias, relataram valores pH ( $6,68 \pm 0,12$ ;  $6,57 \pm 0,26$ ;  $6,71 \pm 0,20$ ), acidez ( $0,24 \pm 0,15\%$ ;  $0,28 \pm 0,41\%$ ;  $0,24 \pm 0,16\%$ ) e estabilidade ao álcool ( $63,17 \pm 3,64\%$ ;  $53,91 \pm 12,51\%$ ,  $63,00 \pm 3,29\%$ ), respectivamente, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ), somente para o refrigerado em relação ao congelado e fresco, corroborando com o comportamento verificado neste estudo.

#### *5.1.2.2 Micro-organismos psicrotróficos, atividades proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha fresco, refrigerado e congelado*

A contagem dos micro-organismos psicrotróficos, as atividades proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha e seus tratamentos estão apresentadas na Tabela 6. A contagem de micro-organismos psicrotróficos apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o LF com o LR6 e LR10, já que não foi observada diferença significativa entre LR6 e LR10. Além disso, a contagem de psicrotróficos foi maior do que nos experimentos preliminares (Tabela 4) para o LR6 e LR10. Este fato já era esperado para o LR, uma vez que houve aumento da multiplicação de bactérias psicrotróficas (2,07 vezes) em relação ao LF. As temperaturas de na faixa de 2 °C a 10 °C são consideradas ótimas para o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas (SILVA; TORRES, 1995; SANTOS *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Avaliação da contagem de micro-organismos psicotróficos, atividades proteolíticas (AP) e lipolíticas (AL) no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo

Amostra	Psicotróficos (log. UFC/mL)	Atividade Proteolítica (mU/mL)	Atividade Lipolítica (U/mL)
LF	3,85 ± 0,98 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,52 <sup>a</sup>
LR6	7,70 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,29 <sup>b</sup>
LR10	8,28 ± 0,27 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>abc</sup>	1,40 ± 0,23 <sup>c</sup>
LC15	4,87 ± 1,47 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>abc</sup>	1,01 ± 0,37 <sup>acd</sup>
LC30	4,88 ± 1,25 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,15 <sup>abcd</sup>	0,41 ± 0,21 <sup>acd</sup>
LC45	4,54 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,05 <sup>bcd</sup>	1,87 ± 0,58 <sup>def</sup>
LC60	4,47 ± 0,61 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,07 <sup>cd</sup>	2,44 ± 1,01 <sup>cef</sup>
LC90	4,71 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,66 ± 0,42 <sup>def</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais nas colunas em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Segundo Haryani *et al.* (2003), a contagem de bactérias psicotróficas não necessariamente resultaria em atividade proteolítica e lipolítica, mas sim dependente da espécie de bactéria psicotrófica presente no leite. Algumas cepas podem apresentar tanto a capacidade lipolítica quanto proteolítica ou alternarem de acordo com o substrato e ainda condições e tempo reacionais (DEETH, 2006; CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016; JÚNIOR *et al.*, 2018).

Ao contrário do LR, o LC em todos os períodos manteve contagem de micro-organismos psicotróficos igual ( $p < 0,05$ ) ao LF. Cabe ressaltar que o descongelamento do leite foi realizado em 24 h, à 4 °C, o que poderia favorecer a retomada do desenvolvimento das bactérias psicotróficas, visto que a temperatura ótima de multiplicação destes micro-organismos esteja entre na faixa (2 °C a 10 °C) (SILVA; TORRES, 1995; SANTOS *et al.*, 2013). Balthazar *et al.* (2018) avaliaram o leite de ovelha descongelado sob refrigeração e, após 7 dias analisado, e verificaram o aumento das contagens de micro-organismos mesófilos em comparação com o primeiro dia de descongelamento. Cabe salientar que os autores não verificaram o comportamento dos psicotróficos. Assim, o tempo de permanência do presente estudo foi curto em relação ao do Balthazar *et al.* (2018) e poderia ser a justificativa dos resultados encontrados nesta seção.

A atividade proteolítica (AP) do leite de ovelha foi crescente ao longo do período de armazenamento, sendo que a alta contagem de psicotróficos não influenciou estatisticamente este parâmetro ( $p < 0,05$ ) no LR. Já no LC, o comportamento da atividade proteolítica permaneceu independente da contagem microbiana, apresentando crescente aumento com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) a partir de LC45. Embora as atividades proteolíticas tenham apresentado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), os valores mensurados são ínfimos (cerca de

10 vezes menor), quando comparados com a atividade proteolítica de 1,66 mU/mL do leite de ovelha relatados por Palomba *et al.* (2017) na Itália, com o mesmo método de análise.

Quando comparado com o leite bovino a ordem de grandeza passa de U/mL para mU/mL do leite de ovelha, como pode ser observado em estudo realizado por Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), nos quais quando as contagens de micro-organismos psicrotróficos foi  $6,43 \pm 0,35$  log UFC/mL, apresentou  $12,3 \pm 9,1$  U/mL de atividade proteolítica. E com isso favorece a utilização do leite de ovelha conservado sob refrigeração e congelamento por mais tempo.

A atividade lipolítica (AL) do leite de ovelha (LF) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos refrigerados (LR6 e LR10), sendo no LR6 observada a maior atividade. Os LC15 e LC30 foram iguais significativamente ( $p < 0,05$ ) ao LF, e o LC45, 60 e 90 iguais entre si ( $p < 0,05$ ). A diferença nos valores de atividade lipolítica entre os LR6 e LR10, assim como em relação a todos os LC parece não estar relacionada com a contagem de micro-organismos psicrotróficos. Neste sentido, cabe ressaltar que a redução da atividade lipolítica foi acompanhada pelo aumento da atividade proteolítica, indicando, possivelmente a hidrólise das lipases pelas proteases (GOMBERT *et al.*, 1999).

Cardoso (2006), estudou a influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal, estocado sob refrigeração e obteve contagens de psicrotróficos de 6,8 log UFC/mL e valores de atividade proteolítica de 1,99 U/mL e atividade lipolítica de 16,09 U/mL, maiores que os obtidos no presente estudo. Isto já era esperado, pois segundo Chandan, Parry e Shahani (1968), a atividade das enzimas lipolíticas no leite de ovelha é cerca de um décimo do que no leite bovino.

A quantificação das atividades proteolíticas e lipolíticas do leite de ovelha é pouco elucidada na literatura. Geralmente encontra-se tais atividades determinadas no leite bovino, e ainda, por métodos microbiológicos, visando identificar a flora microbiana e verificar qualitativamente a porcentagem de amostras que apresentam atividade lipolítica e proteolítica, como por exemplo, o estudo de Capodifoglio *et al.* (2016).

### 5.2.2.3 Comportamento das frações proteicas do leite de ovelha fresco LF, refrigerado LR e congelado LC.

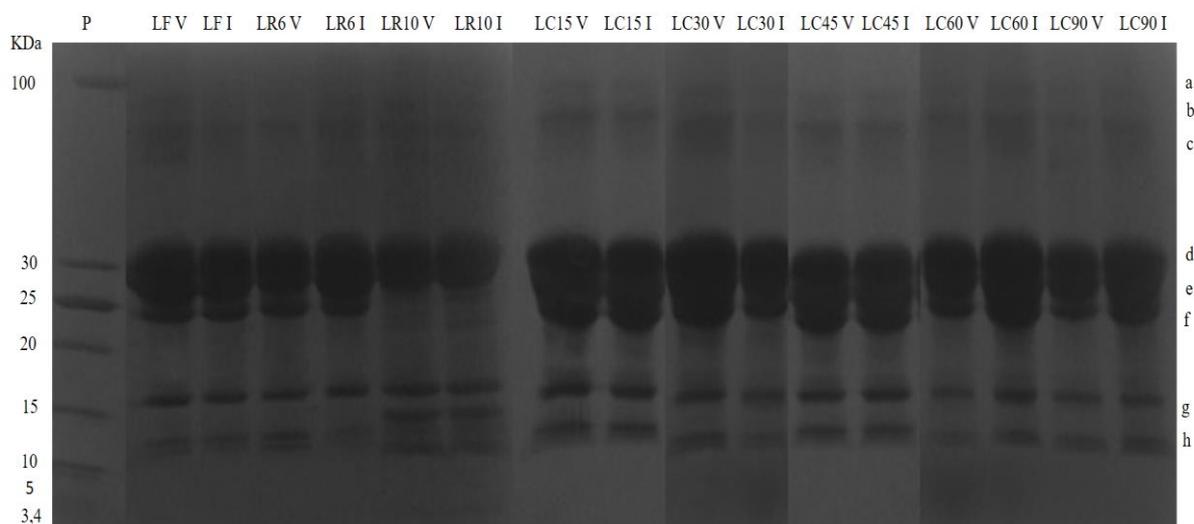
A Figura 1 elucidada o comportamento das proteínas do leite de ovelha fresco em relação aos submetidos a conservação por refrigeração e congelamento, pela relação dos perfis eletroforéticos, obtidos em condições desnaturantes, ou seja, com adição de SDS (dodecil sulfato de sódio, detergente aniônico), sendo que o padrão (P) de massa molecular usado foi

definido segundo dados da literatura relatados por Nguyen *et al.* (2017, 2018) e Balthazar *et al.* (2018) sobre as massas moleculares e proporções médias das frações proteicas características dos leites de ovelha.

A relação entre o peso molecular (padrão) com as bandas de proteínas é identificada na Figura 1, com as letras a (imunoglobulina); b (lactoferrina); c (albumina sérica); d ( $\alpha$ -caseína); e ( $\beta$ -caseína); f ( $\kappa$ -caseína); g ( $\beta$ -lactoglobulina); h ( $\alpha$ -lactoalbumina). Cabe ressaltar que a  $\beta$ -lactoglobulina é apresentada em maior quantidade do que outras proteínas do soro do leite (imunoglobulina, lactoferrina, albumina sérica,  $\alpha$ -lactoalbumina) no leite de ovelha, o que está de acordo com Selvaggi *et al.* (2014) e Balthazar *et al.* (2018).

A divisão entre  $\alpha$  e  $\beta$ -caseína é dificilmente visível no gel de eletroforese devido à maior quantidade dessas proteínas no leite de ovelha (BALTHAZAR *et al.*, 2017). Também a intensidade mais escura das frações de caseínas, quando comparadas com as proteínas do soro, o que indica a maior concentração de caseína no leite de ovelha (BALTHAZAR *et al.*, 2018).

Figura 1 – Representação das proteínas pela técnica de Eletroforese em gel SDS-PAGE no leite de ovelha fresco (LF), refrigerado (LR) e congelado (LC) ao longo do tempo



P (padrão); LF (leite de ovelha fresco); LR (leite de ovelha refrigerado (6 e 10) dias); LC (leite de ovelha congelado (15, 30, 45, 60 e 90) dias); V (batelada do verão); I (batelada do inverno); a (imunoglobulina); b (lactoferrina); c (albumina sérica); d ( $\alpha$ -caseína); e ( $\beta$ -caseína); f ( $\kappa$ -caseína); g ( $\beta$ -lactoglobulina); h ( $\alpha$ -lactoalbumina).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Como mostrado na Figura 1, o LF e o LR6 possivelmente não apresentaram hidrólise das frações de caseína uma vez que as bandas tiveram intensidade semelhante. Este comportamento corrobora com os resultados apresentados na (Tabela 6) onde as maiores atividades proteolíticas foram evidenciadas no leite congelado. No LR10 pode ter ocorrido a hidrólise da  $\kappa$ -caseína, considerando que neste tratamento foi obtida a maior contagem dos

micro-organismos psicrotróficos (8,28 log UFC/mL) do estudo, sendo evidenciado também o surgimento de bandas intermediárias mais intensas na faixa de 15 a 10 kDa, indicando a formação de peptídeos.

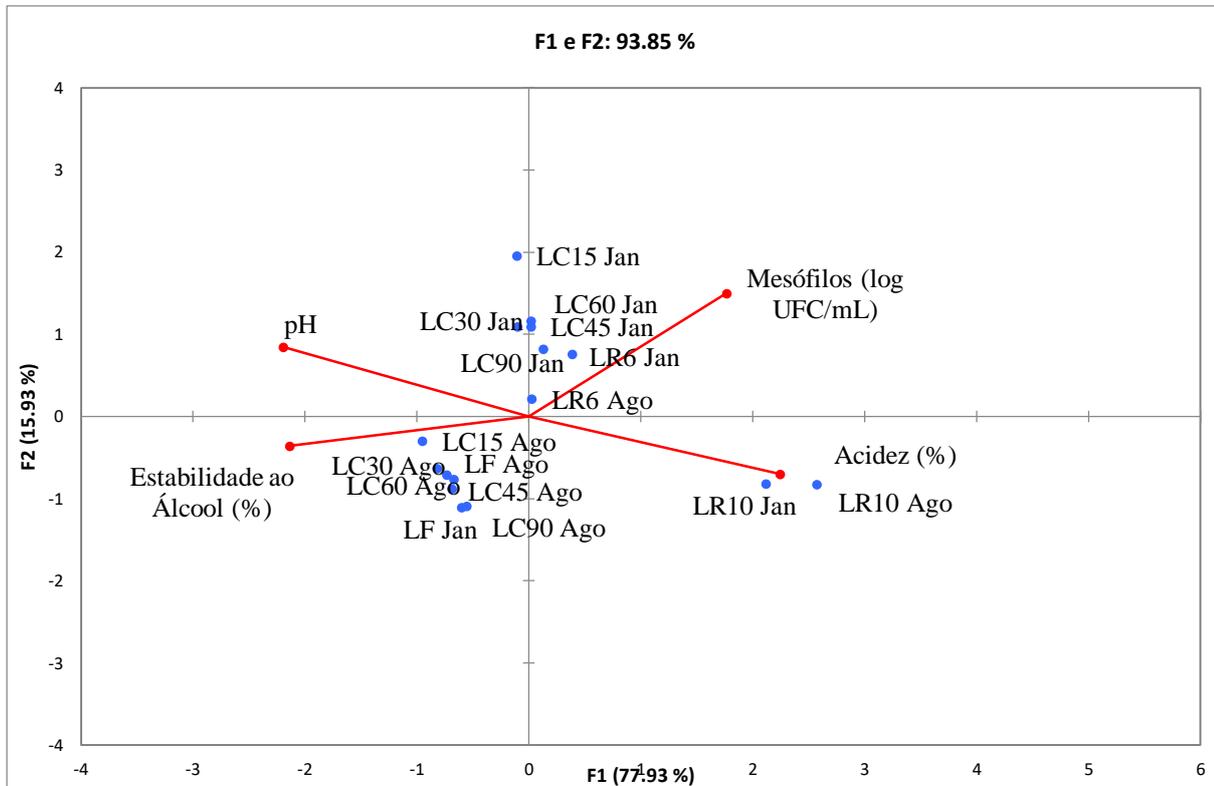
Quanto ao congelamento do leite, observou-se que assim como o LR6, as bandas foram semelhantes ao LF, mostrando que a estrutura das proteínas permaneceram intactas. Apesar das atividades proteolíticas ter apresentado aumento com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao LF após LC45, como explicado anteriormente, os valores foram inexpressivo quando comparado com a literatura. Possivelmente devido a contagem de micro-organismos psicrotróficos não ter atingido valores superiores a 6 log UFC/mL, e com isso, a produção de enzimas proteolíticas não ser suficiente para realizar a degradação das frações de caseína no LC (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), contudo esta contagem limite foi definida para leite bovino. A proteólise das proteínas do leite pode ser atribuída às proteases produzidas por bactérias psicrotróficas durante o armazenamento resfriado de leite cru fresco (ZHANG *et al.*, 2015).

No presente estudo não foi realizada a etapa de identificação das espécies dos micro-organismos psicrotróficos presentes nas amostras de leite de ovelha analisados, para então relacionar com a atividade proteolítica, e sim verificado a presença por contagem total conforme Cousin, Jay e Vasavada (2001) e a atividade proteolítica segundo Palomba *et al.* (2017).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são evidenciadas como produtoras de proteases que podem gerar amargor no leite, devido à formação de peptídios específicos (ZHANG *et al.*, 2015). A protease preferencialmente degrada as caseínas nas seguintes ordem  $\kappa$ -caseína >  $\beta$ -caseína >  $\alpha$ s-caseína. A hidrólise preferencial da  $\kappa$ -caseína é presumivelmente devido à sua localização na superfície da micela. Segundo Sorhaug e Stepaniak (1997), as proteases não hidrolisam as proteínas do soro do leite, proteínas na mesma medida que as caseínas. A estabilidade do sistema micelar de caseína pode ser atribuído diretamente às propriedades únicas de  $\kappa$ -caseína. Assim, a hidrólise da  $\kappa$ -caseína pela protease pode causar desestabilização da micela levando à agregação de caseínas, resultando em gelificação e coagulação observadas em produtos UHT (ZHANG *et al.*, 2015).

Na Figura 2 está apresentado a análise dos componentes principais (APC) para reunir o impacto dos métodos de conservação do leite (leite refrigerado (LR) e congelado (LC)) em relação ao leite fresco (LF). A ACP explicou 93,85% do total variação entre as amostras. Os dados incluídos foram acidez, mesófilos, pH e estabilidade ao álcool.

Figura 2 – Análise dos componentes principais dos métodos de conservação do leite de ovelha (refrigerado (LR) e congelado (LC)) em relação ao leite fresco (LF) das bateladas coletadas em janeiro (Jan) e agosto (Ago)



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os LF de janeiro (Jan) e agosto (Ago), bem como todos os LC de Ago foram caracterizados por apresentar maior estabilidade ao álcool. Enquanto que os LR6 Jan e Ago, bem como todos LC de Jan foram apresentaram maiores contagens de mesófilos. Já os LR10 tanto de Jan, quanto de Ago apresentaram maiores teores de acidez do que os demais. Embora as coletas de leite tenham algumas variações, o comportamento em relação a acidez foi semelhante. Com base nesses resultados e os da Figura 1, pode-se perceber que a hidrólise da  $\kappa$ -caseína no LR10 pode ter ocorrido principalmente pela acidez elevada, uma vez que a estabilidade da proteína do leite diminui à medida que a acidez aumenta (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), e a atividade proteolítica apresentou valores ínfimos para causar tal degradação.

## 5.2 INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE DE OVELHA NA ELABORAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO

Este estudo apresenta os dados obtidos da massa queijo (MQ) elaboradas com leite de ovelha fresco (LF) e os conservados sob refrigeração (LR) e congelamento (LC), bem como do soro de queijo (S) e requeijões cremosos (RC) formulados com cada uma das MQ. A fim de verificar o efeito do processo de conservação no rendimento e nas características físico-químicas da massa de queijo e do soro. E ainda comparar as características físico-químicas, cor e textura dos requeijões cremosos produzidos a partir da massa de queijo obtida com leite de ovelha fresco em relação as massas de queijo onde o leite foi submetido aos processos de conservação. As características do leite utilizado nas diferentes formulações das MQ e RC foram apresentadas no (item 5.1.2), utilizando as coletas de leite de ovelha de janeiro e agosto de 2018.

### 5.2.1 Rendimento da massa de queijo e soro drenado

Após a pasteurização dos leites de ovelha utilizados para elaboração das massas de queijo, os mesmos apresentaram contagens de  $\leq 2 \log$  UFC/mL para ambos micro-organismos mesófilos e psicrotróficos. Na Tabela 7 estão apresentados os valores do rendimento da massa de queijo (MQ) e do percentual de soro drenado (S) obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC). Os valores do rendimento médio das MQ obtidas do leite submetido aos processos de conservação, assim, como o soro drenado, não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos provenientes do LF.

No presente estudo, não foi observado influência dos métodos de conservação do leite de ovelha com o rendimento da massa de queijo, mesmo que de acordo com a Figura 1, o LR10 teria as frações de proteínas alterada. Apesar de não haver diferença no rendimento, segundo Guinee (2003) e Cipolat-Gotet *et al.* (2018) as concentrações e proporções de cada fração de caseína desempenham um papel essencial na estrutura e nas propriedades reológicas do coágulo.

Os efeitos da caseína na produção de queijos podem ser influenciados pelas condições de processamento e pela categoria de queijo produzido. A microestrutura do coágulo e depois a estrutura da coalhada formada afetam acentuadamente as propriedades reológicas e de sinérese e, posteriormente, no rendimento do queijo, devido às diferentes recuperações dos componentes do leite (proteína e gordura) na coalhada (GUINEE *et al.*, 1995). Por outro lado,

é menos conhecido sobre a contribuição do conteúdo de cada fração de proteína na capacidade de produção para queijo e a eficiência do processo de sua produção (CIPOLAT-GOTET *et al.*, 2018).

Tabela 7 – Rendimento da massa de queijo (MQ) e percentual de soro drenado (S) obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC)

	<b>Rendimento da massa de queijo (L/kg)</b>	<b>Soro drenado (%)</b>
LF	3,99 ± 0,26 <sup>a</sup>	74,15 ± 2,93 <sup>a</sup>
LR6	4,57 ± 0,66 <sup>a</sup>	76,54 ± 3,63 <sup>a</sup>
LR10	4,48 ± 0,55 <sup>a</sup>	75,22 ± 2,61 <sup>a</sup>
LC30	4,35 ± 1,06 <sup>a</sup>	72,80 ± 3,49 <sup>a</sup>
LC60	4,59 ± 0,57 <sup>a</sup>	75,59 ± 1,18 <sup>a</sup>
LC90	4,22 ± 0,77 <sup>a</sup>	73,64 ± 2,88 <sup>a</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais na coluna em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Fava (2012) avaliou o rendimento e o soro drenado da massa de queijo obtida a partir de coagulação enzimática, utilizando leite de ovelha fresco e os refrigerados (5 °C) e congelados (-18°C) por 7 dias. O rendimento e o soro drenado da massa obtida do leite fresco foram 3,38 ± 0,22 L/kg e 67,89 ± 2,27%, respectivamente, para o leite refrigerado 3,64 ± 0,34 L/kg e 65,81 ± 3,68% e para o leite congelado 3,18 ± 0,23 L/kg e 61,02 ± 3,05%. Os autores observaram diferença significativa na MQ obtida de leite refrigerado ( $p < 0,05$ ), já a do congelado foi igual ( $p < 0,05$ ), ao leite fresco. Em relação ao presente estudo, os menores rendimentos podem estar relacionados com a diferença da coagulação, além de os queijos não terem sido prensados, e ainda o leite avaliado apresentar maior teor de gordura em comparação ao encontrado no presente estudo. Cabe ressaltar ainda, que as massas foram elaboradas com leite de ovelha da mesma raça, obtidas no Rio Grande do Sul, região próxima do presente trabalho (Oeste de Santa Catarina).

Zhang *et al.* (2006), ao analisarem mensalmente o rendimento do queijo Tipo Cheddar, obtido a partir de leite de ovelha fresco e congelado (-15 °C e -25 °C) por até 6 meses, indicando redução expressiva no rendimento da MQ do leite a -15 °C, quando comparado ao do leite fresco e congelado a menor temperatura, o que pode ser atribuído à diminuição da capacidade de retenção de água, causada pela alteração da estrutura das proteínas durante o processo de congelamento a maiores temperaturas (FONTECHA *et al.*, 1993). Wendorff (2001) salientou que para manter a alta qualidade do leite de ovelha este deve ser congelado e armazenado a temperaturas inferiores a -20 °C. Cabe ressaltar que no presente estudo o rendimento da MQ dos leites congelados (-29,80 ± 0,40 °C) foram iguais a obtida com LF.

Em estudos realizados por Cipolat-Gotet *et al.* (2018) a eficiência do rendimento do queijo foi associada principalmente à  $\beta$ -caseína, devido em especial à sua maior capacidade de retenção de água, ainda, as quantidades de  $\alpha$ S1-caseína e  $\kappa$ -caseína influenciaram a eficiência do rendimento, como consequência, a relação com as taxas de recuperação de proteína e gordura na coalhada. Em termos de rendimento diário de queijo, as proteínas do soro também foram de grande importância, pois exibiram relações positivas com  $\alpha$ - lactoalbumina e relações negativas com  $\beta$ - lactoglobulina. Um aumento na quantidade da  $\alpha$ S1-caseína no leite teve um efeito positivo na consolidação e na sinérese da coalhada, que são provavelmente responsáveis pela maior retenção de nutrientes na coalhada. Assim, o rendimento igual ( $p < 0,05$ ) da MQLR10 em relação a MQLF e as MQ dos LC pode ser justificada ao fato de que o leite submetido a 10 dias de refrigeração (LR10), apresentou fracionamento da  $\kappa$ -caseína de acordo com a Figura 1.

### 5.2.2 Características físico-químicas da massa de queijo, soro e requeijão cremoso

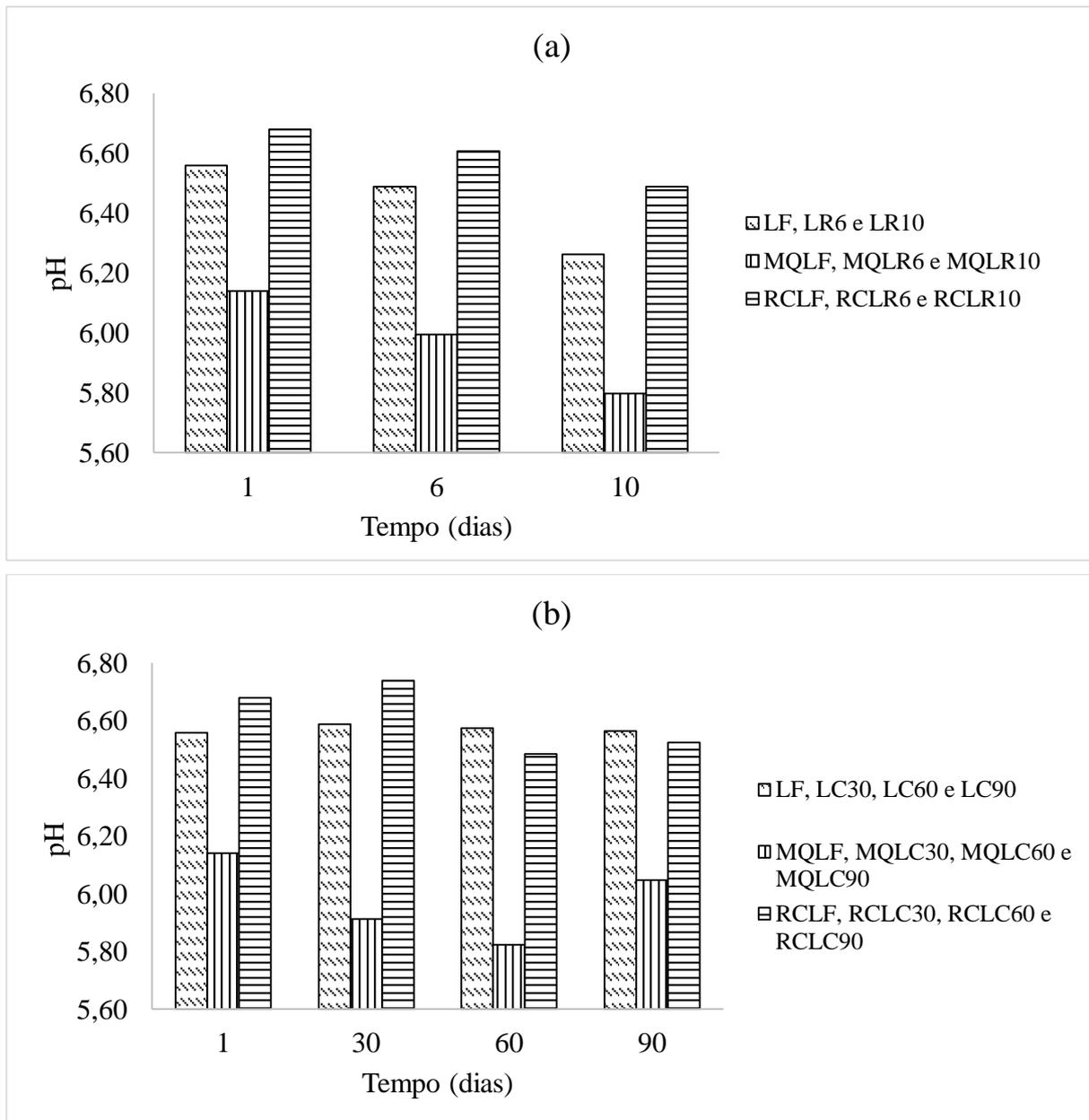
Nas formulações dos requeijões cremosos alguns parâmetros em relação ao queijo ou massa fresca são fundamentais para definir a característica do produto final, como o pH, gordura e umidade (RAPACCI,1997; CUNHA; ALCÂNTARA; VIOTTO, 2012; VAN DENDER *et al*, 2012).

#### 5.2.2.1 pH

O pH é um fator importante para a identidade e qualidade do queijo, pois afeta diretamente sua estrutura e propriedades reológicas, alterando as interações químicas entre os componentes estruturais (proteínas, água e minerais) (BELSITO *et al.*, 2017). Neste sentido, a Figura 2 apresenta o comportamento do pH do leite de ovelha (LF) e ao longo do período de refrigeração (LR) e de congelamento (LC), das massas de queijo (MQ) elaboradas com os leites submetidos aos processos de conservação, bem como dos requeijões cremosos (RC) obtidos destas das MQ.

O comportamento do pH no período de refrigeração (Figura 3 (a)) da MQLR e RCLR apresentaram uma tendência com correlação positiva para ambas (0,98) e (0,99) respectivamente, com o LR, considerando que a redução do pH do leite ao longo do tempo de refrigeração foi acompanhada pela MQLR e RCLR. Cabe ressaltar que a acidez e contagem de mesófilos no LR6 e LR10 aumentaram em relação ao LF, refletindo na diminuição do pH do leite, das massas e do requeijão.

Figura 3 – Comportamento do pH: (a) do leite de ovelha fresco (LF) e refrigerado por 6 e 10 dias (LR6 e LR10); massa de queijo (MQ) elaborada com leite fresco (MQLF) e refrigerado (MQLR6, MQLR10); requeijões cremosos (RC) obtidos das massas elaboradas com leite fresco (RCLF) e refrigerado (RCLR6 e RCLR10). (b) do leite de ovelha fresco (LF) e congelado por 30, 60 e 90 dias (LC30, LC60 e LC90); massa de queijo (MQ) elaborada com leite fresco (MQLF) e congelado (MQLC30, MQLC60 e MQLC90); requeijões cremosos (RC) obtidos das massas elaboradas com leite fresco (RCLF) e congelado (RCLC30, RCLC60 E RCLC90)



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Já o pH do leite congelado foi estável no decorrer dos 90 dias de conservação (Figura 3 (b)), não apresentando tendência com a MQLC e RCLC, assim como com o LC. Contudo foi

verificado correlação da MQ com o RC (0,92), que pode estar relacionada com a cultura *starter*, da coagulação mista do leite, embora o processo de ativação da cultura e coagulação foram fixos o pH da coalhada não utilizado para determinar seu pondo final, mas sim o tempo de 40 minutos de coagulação, o que pode ter resultado nas diferenças observadas. Além disso, a coagulação mista, apresenta características diferentes da enzimática que teria pH próximo ao do leite, assim como da obtida por acidificação direta a quente, ou por fermentação láctica (pH de 5,2 a 5,5) (VAN DENDER; GALLINA; ZACARCHENCO, 2014).

Segundo Park *et al.* (2007), os valores de pH do leite de ovelha variam de 6,51 a 6,85, enquanto que o leite bovino de 6,65 a 6,71. No presente estudo, os valores de pH do LF foram  $6,56 \pm 0,02$ , com redução no período de refrigeração (LR6 e LR10) e constante durante os 90 dias de congelamento (LC) (Tabela 5). Com relação a obtenção da MQ os valores médios de pH foram  $6,04 \pm 0,52$ . Privatti (2017) obteve valores de pH do leite bovino de  $6,72 \pm 0,04$  e o pH do queijo minas frescal, obtido por coagulação enzimática de  $6,59 \pm 0,04$ , corroborando com o presente estudo, visto que embora a coagulação mista foi usada, a massa de queijo apresentou comportamento semelhante a enzimática, em virtude dos valores de pH próximos ao do leite. E ainda, o leite de ovelha possui maior poder tamponante do que o leite bovino, por esse motivo a redução é menor (TAMIME; ROBINSON, 2007).

A MQ elaborada com LF, LR e LC em relação ao pH quando comparado aos RC elaborados com cada uma das respectivas massas resultou em um aumento dos valores de pH, o que pode ser atribuído ao sal fundente, sendo que, o utilizado foi pirofosfato tetrassódico e polifosfato de sódio. Este aumento de pH da MQ para o RC, já era esperado, visto que na ficha técnica do sal fundente (ICL Foods) utilizado indica o acréscimo de (0,2 - 0,4) no pH. No entanto, ocorreu o aumento médio de  $0,63 \pm 0,19$ . A concentração de creme de leite utilizado na formulação e as suas características, pode ter contribuído para este comportamento, considerando que segundo Dias (2015) formulou o RC com creme de pH de  $6,67 \pm 0,01$ , e 35% de gordura, em comparação ao deste estudo, onde o pH foi de  $6,83 \pm 0,12$  e gordura de 17% (item 4.4).

Corroborando com o presente estudo, um aumento dos valores de pH das MQ para os RC, foi observado por Dias (2015), com 1,8% de diferentes sais fundente, entre eles o utilizado neste estudo, mas com massa de queijo obtida por acidificação direta a quente pH ( $5,48 \pm 0,01$ ), com leite bovino, o requeijão culinário composto de pirofosfato tetrassódico e polifosfato de sódio apresentou a maior elevação de pH de  $6,03 \pm 0,17$ . Isso provavelmente ocorreu devido à baixa capacidade tamponante dos polifosfatos de cadeia longa, visto que esta diminui com o

aumento da cadeia, chegando a praticamente zero em sais com mais de dez fosfatos (FOX *et al.*, 2000).

O valor médio de pH ( $6,67 \pm 0,44$ ) de todos RC, sendo estes elaboradas com leite fresco, refrigerado ou congelado foram superiores ao descrito por Van Dender (2006) como ideal para requeijão cremoso (5,4 a 6,2) resultando em consistência cremosa e firme. Contudo, pH de RC superior a 6,2, como foi o caso desta pesquisa, poderiam diminuir a interação proteína-proteína e aumentar a hidratação proteica, reduzindo a firmeza da massa e sua durabilidade, causando alterações na estrutura e na consistência do produto. Contudo, estas definições não especificam a diferença de proteínas e valores de pH que possam existir em detrimento do leite de diferentes espécies. Cabe salientar que estes valores são para leite bovino e foram utilizados como referência.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química da massa de queijo, do soro e do requeijão cremoso obtidos do leite fresco (LF), refrigerado (LR) e do congelado (LC). O pH da MF e do RC não diferiram estatisticamente ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ) para ambos métodos de conservação. Enquanto que o pH do SLR6 e SLR10 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao SLF. Em relação ao período de congelamento, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao SLF. A redução do pH do S no período refrigerado pode estar associada a redução do pH do leite (Tabela 5), uma vez que o pH do soro teve correlação com o pH do leite (0,79).

Tabela 8 – Resultados físico-químicos da massa de queijo (MQ), soro (S) e requeijão cremoso (RC) obtidos de leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC)

Análises	Amostra	Massa de Queijo	Soro	Requeijão Cremoso
pH	LF	6,14 ± 0,33 <sup>a</sup>	6,46 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,48 <sup>a</sup>
	LR6	6,00 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,61 ± 0,41 <sup>a</sup>
	LR10	5,80 ± 0,42 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,56 <sup>a</sup>
	LC30	5,91 ± 0,52 <sup>a</sup>	6,47 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,74 ± 0,43 <sup>a</sup>
	LC60	5,82 ± 0,69 <sup>a</sup>	6,39 ± 0,02 <sup>ab</sup>	6,48 ± 0,41 <sup>a</sup>
	LC90	6,05 ± 0,44 <sup>a</sup>	6,36 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,52 ± 0,47 <sup>a</sup>
Gordura (%)	LF	21,00 ± 1,78 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,73 <sup>a</sup>	20,50 ± 3,00 <sup>a</sup>
	LR6	20,67 ± 2,38 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,55 <sup>a</sup>	20,50 ± 1,97 <sup>a</sup>
	LR10	22,90 ± 2,27 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,75 <sup>a</sup>	19,40 ± 1,34 <sup>a</sup>
	LC30	20,70 ± 1,79 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,38 <sup>a</sup>	19,25 ± 0,96 <sup>a</sup>
	LC60	20,60 ± 1,98 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,10 <sup>a</sup>	19,50 ± 0,55 <sup>a</sup>
	LC90	20,42 ± 0,86 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,38 <sup>a</sup>	19,33 ± 0,52 <sup>a</sup>
Proteína (%)	LF	15,44 ± 1,43 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,36 <sup>a</sup>	8,81 ± 0,51 <sup>a</sup>
	LR6	16,24 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,22 <sup>a</sup>	9,07 ± 0,20 <sup>a</sup>
	LR10	16,28 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,17 <sup>a</sup>	9,08 ± 0,08 <sup>a</sup>
	LC30	15,88 ± 1,37 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	9,05 ± 0,60 <sup>a</sup>
	LC60	16,03 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,18 <sup>a</sup>	9,32 ± 0,36 <sup>a</sup>
	LC90	15,38 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,15 <sup>a</sup>	9,33 ± 0,17 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	LF	1,89 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,08 <sup>a</sup>
	LR6	1,79 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,29 <sup>acde</sup>
	LR10	1,68 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,02 <sup>bcd</sup>
	LC30	1,96 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,12 <sup>acde</sup>
	LC60	1,95 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,07 <sup>d</sup>
	LC90	1,82 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,02 <sup>ae</sup>
Sólidos totais (%)	LF	39,43 ± 0,88 <sup>a</sup>	9,01 ± 1,20 <sup>a</sup>	35,17 ± 0,06 <sup>a</sup>
	LR6	39,76 ± 0,33 <sup>a</sup>	9,20 ± 1,01 <sup>a</sup>	36,35 ± 1,59 <sup>abc</sup>
	LR10	42,76 ± 1,79 <sup>b</sup>	9,52 ± 0,75 <sup>a</sup>	37,76 ± 1,73 <sup>bc</sup>
	LC30	40,20 ± 2,12 <sup>ab</sup>	9,23 ± 0,26 <sup>a</sup>	36,61 ± 1,52 <sup>abc</sup>
	LC60	40,65 ± 1,22 <sup>ab</sup>	9,36 ± 0,23 <sup>a</sup>	37,98 ± 0,21 <sup>bc</sup>
	LC90	40,11 ± 0,90 <sup>ab</sup>	9,49 ± 0,16 <sup>a</sup>	36,82 ± 1,39 <sup>abc</sup>
Sólidos não gordurosos (%)	LF	18,43 ± 0,88 <sup>a</sup>	7,14 ± 1,20 <sup>a</sup>	14,67 ± 0,06 <sup>a</sup>
	LR6	19,09 ± 0,33 <sup>a</sup>	7,32 ± 1,01 <sup>a</sup>	15,85 ± 1,59 <sup>ace</sup>
	LR10	19,86 ± 1,79 <sup>a</sup>	7,44 ± 0,75 <sup>a</sup>	18,36 ± 1,73 <sup>bcdde</sup>
	LC30	19,50 ± 2,12 <sup>a</sup>	7,41 ± 0,26 <sup>a</sup>	17,36 ± 1,52 <sup>cde</sup>
	LC60	19,86 ± 1,26 <sup>a</sup>	7,37 ± 0,23 <sup>a</sup>	18,48 ± 0,21 <sup>de</sup>
	LC90	19,69 ± 0,90 <sup>a</sup>	7,76 ± 0,16 <sup>a</sup>	17,49 ± 1,39 <sup>e</sup>
GES (%)	LF	-	-	58,29 ± 0,10 <sup>a</sup>
	LR6	-	-	56,50 ± 2,51 <sup>a</sup>
	LR10	-	-	51,47 ± 2,25 <sup>b</sup>
	LC30	-	-	52,66 ± 2,23 <sup>b</sup>
	LC60	-	-	51,34 ± 0,28 <sup>b</sup>
	LC90	-	-	52,57 ± 2,00 <sup>b</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras diferentes na coluna em cada avaliação indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

### 5.2.2.2 Gordura e proteína

Os teores de gordura e de proteína (Tabela 8) da MQ, do S e do RC elaborados com o LF, LR e LC não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de conservação do leite. Os valores de proteína e gordura do soro doce relatados por Giroux, Veillette e Britten (2018) foram de 1,71% e 0,10%, respectivamente. Os valores de proteína foram próximos ao presente trabalho, no entanto os teores de gordura foram inferiores. O alto conteúdo de gordura do soro pode estar relacionado à problemas de processo na elaboração da massa, tais como corte, agitação na mexedura, prensagem da coalhada (PINTO JUNIOR, 2012), visto que a elaboração do queijo é artesanal.

As proporções de proteína da RC/MQ foram de  $0,57 \pm 0,02$ , assim como a relação proteína/gordura da MQ  $0,75 \pm 0,02$ , mostraram-se pouco variável em relação a cada MQ e RC elaboradas com LF, LR e LC. A redução de proteína da MQ para RC, possivelmente pode ser devido a adição do creme de leite, o qual apresenta baixo teor de proteína, quando comparado ao teor de gordura.

Na elaboração dos requeijões cremosos, a determinação do teor de umidade e da gordura da massa de queijo contribuem para o ajuste da formulação, visto que quanto maior o teor de gordura obtido na MQ, menor quantidade de creme de leite necessita ser adicionado. E ainda, a adição maior de creme de leite, pode contribuir para o aumento da quantidade de umidade em excesso da formulação do requeijão. Ressalta-se que no presente estudo utilizou-se uma formulação base, adaptada do RC de leite bovino, não sendo avaliada variáveis de processo.

### 5.2.2.3 Cinzas

Os teores de cinzas da MQLR10 (Tabela 8) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com os MQLF, possivelmente devido ao pH do LR10 deste dia, visto que o mesmo obteve valor de pH inferior e acidez superior aos indicados por Park *et al.* (2007), além de estar com contagens de mesófilos superiores as estabelecidas pela união europeia (UE, 2004), indicando impróprio para o consumo. Mesmo assim, o LR10 foi estudado a fim de verificar quais alterações seriam mensuradas nos produtos. Apesar do conteúdo proteico do MQLR10 não apresentar diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com o MQLF, no leite LR10 foi verificada possível degradação da k-caseína, conforme evidenciado na análise da eletroforese (Figura 1). Observou-se também, que as frações de caseína do LR6 e de todos LC foram semelhantes ao LF, sendo que nestes, os parâmetros de qualidade foram mantidos.

Os teores de cinzas do soro resultante das MQ elaboradas LF, LR e LC não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de conservação do leite. Em relação aos RC elaborados com o LF, LR e LC, somente o RCLR10 e RCLC60 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de cinzas em relação ao RCLF. A diferença do RCLR10, deve-se em razão da qualidade do leite neste dia, já discutida anteriormente. Já a diferença para o RCLC60 pode ser atribuída, possivelmente, ao maior teor de sólidos totais. E, portanto, essas diferenças não seriam em virtude do tempo e processo de conservação.

#### 5.2.2.4 Sólidos totais, sólidos não gordurosos e GES.

O teor de sólidos totais (Tabela 8) da MQ apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente para a elaborada com o LR10 em relação à elaborada com LF. A MQLR10 apresentou maior quantidade de sólidos totais possivelmente devido à redução do pH do LR10 (Tabela 5), o que pode ter influenciado a capacidade de retenção de água das proteínas.

O conteúdo de sólidos totais do soro retirado das MQ elaboradas com LF, LR e LC não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de conservação do leite. Quanto aos sólidos totais do RC, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente nos obtidos a partir do LR10 e LC60 (RCLR10 e RCLC60) em relação ao RCLF. As diferenças observadas podem estar relacionadas a alterações ocorridas nas proteínas para o LR10, e ou pelo processo da MQ ser artesanal.

O teor de sólidos não gordurosos (Tabela 8) das MQ e do S elaborados com o LF, LR e LC não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de conservação do leite. Em relação ao RC, somente o RCLR6 foi significativamente igual ao RCLF ( $p < 0,05$ ), o que pode estar associado a outros compostos, como a lactose, já que o conteúdo de proteína dos RC não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Os RCLC não apresentaram diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ).

Cabe salientar que a umidade do requeijão cremoso é economicamente importante, pois aumenta o rendimento do produto e influencia diretamente na textura (VAN DENDER, 2006). Os RC apresentaram teores de umidade de 61,96 a 64,83 g / 100 g, de acordo com o preconizado pela legislação oficial vigente para leite bovino (BRASIL, 1997), um teor máximo de 65 g/100 g, além da padronização dos teores de sólidos.

Os RCLF e RCLR6 apresentaram maiores teores de GES (Tabela 8) sendo estes significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos RCLR10, RCLC30, RCLC60 e RCLC90, provavelmente devido as maiores quantidades de gordura presente na MQ formuladas com o

LF e os submetidos aos procedimentos de conservação. Somente RCLF e RCLR6 atingiram a exigência da legislação brasileira para requeijão cremoso de leite bovino de GES 55 g /100 g (BRASIL, 1997). Apesar da redução da GES nos RCLC, os mesmos ficaram próximos da legislação.

#### 5.2.2.5 *Minerais*

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das análises dos minerais: sódio, potássio, cálcio e magnésio da massa de queijo, soro e requeijão cremoso elaborados a partir do leite fresco (LF) e leite refrigerado (LR) e ainda leite congelado (LC) ambos, em diferentes tempos de conservação. Os teores de sódio, potássio, cálcio e magnésio de todas as amostras avaliadas de MQ, S, e RC não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os métodos de conservação ao longo do tempo, exceto para os teores de cálcio na MQR10, SLR10. Além dos teores de magnésio dos RC.

A diferença nos teores de cálcio da MQLR10 e SLR10 possivelmente ocorreu devido a degradação da fração k - caseína observada no LR10, ocasionando maior desmineralização da massa, também em virtude da acidez elevada, verificada pela diminuição do cálcio na MQLR10 e o aumento deste no SLR10 (Tabela 9). Embora a MQLR10 tenha apresentado menor conteúdo de cálcio, o RCLR10 não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), possivelmente devido a adição do creme de leite, visto que este apresentou  $402,54 \pm 62,36$  mg/100 g de cálcio em sua caracterização.

Os teores de magnésio observados nos RC diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), possivelmente devido ao processo ser artesanal, além do creme de leite possuir  $51,57 \pm 2,06$  mg/100 g. O teor de potássio da MQ está associado a composição do leite, visto que não há adição de nenhum componente contendo esse mineral. O potássio no RC pode ser devido a incorporação de creme de leite, no qual apresentou  $48,01 \pm 10,11$  mg/100 g em sua caracterização.

Os RC elaborados apresentaram teores de sódio acima do estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) e Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) 541 mg de sódio por 100 g de requeijão cremoso tradicional, não atendendo a meta de redução de sódio para o requeijão (ABIQ, 2013). Em nota do Ministério da Saúde (2016) mostrou o resultado de 80 produtos avaliados, os quais em 2012 os teores de sódio encontrado nos produtos foi de (659,47 mg/100g) e em 2016 de (524,44 mg/100g), apresentando redução de 20,47%.

Tabela 9 – Análise dos minerais sódio, potássio, cálcio e magnésio da massa de queijo, soro e requeijão cremoso elaborados a partir do obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) ao longo do tempo

<b>Análises</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa de Queijo</b>	<b>Soro</b>	<b>Requeijão Cremoso</b>
<b>Sódio (mg/100g)</b>	LF	219,99 ± 110,55 <sup>a</sup>	61,04 ± 17,97 <sup>a</sup>	697,28 ± 78,12 <sup>a</sup>
	LR6	248,93 ± 96,63 <sup>a</sup>	61,53 ± 5,57 <sup>a</sup>	617,77 ± 97,39 <sup>a</sup>
	LR10	207,71 ± 114,55 <sup>a</sup>	66,37 ± 31,68 <sup>a</sup>	619,40 ± 74,55 <sup>a</sup>
	LC30	150,18 ± 56,61 <sup>a</sup>	63,18 ± 22,93 <sup>a</sup>	646,80 ± 30,39 <sup>a</sup>
	LC60	113,20 ± 23,62 <sup>a</sup>	62,44 ± 9,74 <sup>a</sup>	663,32 ± 67,29 <sup>a</sup>
	LC90	95,17 ± 39,66 <sup>a</sup>	62,87 ± 6,34 <sup>a</sup>	636,77 ± 84,68 <sup>a</sup>
<b>Potássio (mg/100g)</b>	LF	83,59 ± 9,69 <sup>a</sup>	105,41 ± 19,77 <sup>a</sup>	113,28 ± 8,65 <sup>a</sup>
	LR6	90,56 ± 10,94 <sup>a</sup>	100,76 ± 16,31 <sup>a</sup>	108,16 ± 9,44 <sup>a</sup>
	LR10	84,01 ± 14,38 <sup>a</sup>	100,54 ± 11,07 <sup>a</sup>	109,03 ± 12,33 <sup>a</sup>
	LC30	82,59 ± 10,96 <sup>a</sup>	103,33 ± 10,53 <sup>a</sup>	125,00 ± 9,65 <sup>a</sup>
	LC60	79,53 ± 10,33 <sup>a</sup>	105,45 ± 13,41 <sup>a</sup>	118,90 ± 12,39 <sup>a</sup>
	LC90	83,11 ± 10,29 <sup>a</sup>	102,76 ± 3,29 <sup>a</sup>	116,70 ± 14,09 <sup>a</sup>
<b>Cálcio (mg/100g)</b>	LF	532,64 ± 18,28 <sup>a</sup>	79,87 ± 17,46 <sup>a</sup>	400,64 ± 91,56 <sup>a</sup>
	LR6	595,71 ± 31,39 <sup>a</sup>	82,55 ± 29,17 <sup>a</sup>	372,38 ± 68,82 <sup>a</sup>
	LR10	364,56 ± 27,83 <sup>b</sup>	118,89 ± 11,85 <sup>b</sup>	369,68 ± 45,04 <sup>a</sup>
	LC30	563,90 ± 50,75 <sup>a</sup>	66,90 ± 4,29 <sup>a</sup>	386,69 ± 86,29 <sup>a</sup>
	LC60	509,31 ± 57,55 <sup>a</sup>	63,04 ± 13,24 <sup>a</sup>	366,21 ± 135,46 <sup>a</sup>
	LC90	552,36 ± 44,65 <sup>a</sup>	66,64 ± 18,47 <sup>a</sup>	348,84 ± 71,87 <sup>a</sup>
<b>Magnésio (mg/100g)</b>	LF	131,30 ± 22,15 <sup>a</sup>	27,65 ± 2,70 <sup>a</sup>	67,91 ± 10,58 <sup>a</sup>
	LR6	137,70 ± 12,85 <sup>a</sup>	27,89 ± 4,92 <sup>a</sup>	85,83 ± 4,95 <sup>b</sup>
	LR10	143,34 ± 9,23 <sup>a</sup>	28,09 ± 3,21 <sup>a</sup>	80,18 ± 5,54 <sup>abc</sup>
	LC30	157,24 ± 3,30 <sup>a</sup>	31,19 ± 4,04 <sup>a</sup>	91,70 ± 6,07 <sup>bcd</sup>
	LC60	133,01 ± 4,37 <sup>a</sup>	30,72 ± 0,39 <sup>a</sup>	99,62 ± 1,73 <sup>d</sup>
	LC90	127,29 ± 15,36 <sup>a</sup>	29,22 ± 1,56 <sup>a</sup>	72,73 ± 5,84 <sup>ab</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais na coluna em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Ao avaliar 5 marcas distintas de requeijões cremosos tradicionais, obtidos de leite bovino, os mesmos apresentaram teores de gordura ( $22,00 \pm 1,44\%$ ), proteína ( $8,93 \pm 2,78\%$ ), sódio ( $573,33 \pm 40,48$  mg/100 g) e cálcio ( $317,50 \pm 39,19$  mg/100 g), os demais minerais não foram indicados nos rótulos. Sendo que 3 dos 5 RC comerciais estavam acima da legislação vigente para o sódio. O RC elaborados no presente estudo apresentou teores próximos aos apresentados aos comerciais, mas ainda assim maiores do que estabelecido pela ANVISA. Os teores de gordura, proteína e de cálcio dos RC do presente estudo foram semelhantes aos encontrados nos RC comerciais. No entanto, cabe salientar que por serem matérias-primas diferentes, possivelmente pode haver mudança no conteúdo mineral. O teor de sódio do leite de ovelhas obtido por Giroux, Veillette e Britten (2018) foi aproximadamente 20% maior do que os encontrados no bovino. Além disso, os ingredientes das formulações podem variar, tipo de

matriz proteica, de sal fundente, quantidade, e variedade, podem ter influenciado nas diferenças da composição do RC do presente estudo em relação aos comerciais.

Segundo Rapacci (1997) o pH exerce forte influência sobre o grau de desmineralização da massa, e a redução do pH causa progressiva remoção de cálcio das micelas de caseína. Segundo Bonell (1971), a eliminação de cálcio do caseinato é um fator desejável para que a massa possua características de fusão. O cálcio atua como agente ligante das frações da caseína ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  - caseína) através de ligações de fosfato de cálcio formando a micela de caseína. Os sais emulsificantes rompem essas ligações através da troca iônica do sódio do sal emulsificante pelo cálcio da micela de caseína dissociando-a e expondo seus grupos hidrofóbicos, tornando-as adequadas para que atue como emulsificante (GUINEE; CARIĆ; KALAB, 2004; BRICKLEY *et al.*, 2008).

Os requeijões cremosos elaborados no presente estudo apresentaram características semelhantes aos elaborados por Rapacci (1997) e de Dias (2015), embora tenha ocorrido algumas variações, o que já era esperado, visto que a matéria-prima, obtenção da matriz proteica, formulação e composição dos ingredientes foram diferentes. Em virtude da coagulação da MQ ter sido mista, as características dos RC elaborados no presente estudo, apresentaram valores semelhantes aos requeijões obtidos por Rapacci (1997) por acidificação direta, tais como pH, gordura, sólidos totais, enquanto que os oriundos da fermentação láctica, tiveram valores próximos de GES, e proteína. Já os teores de cinzas e minerais deste estudo foram superiores para ambos requeijões cremosos obtidos por Rapacci (1997), embora os valores de acidificação direta tenham sido superiores aos encontrados na fermentação láctica.

### 5.2.3 Avaliação da cor instrumental

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da avaliação da cor instrumental dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) em diferentes tempos de conservação. Os RCLR6, RCLC30, RCLC60 e RCLC90 apresentaram características de cor semelhantes ao RCLF (padrão), com valores próximos de zero, demonstrando que não houve diferença de cor perceptível ao olho humano (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975) nos RC elaborados LR6 e LC em relação a aqueles com LF, possivelmente em virtude dos LO estarem em boas condições de consumo, visto que a acidez ainda estava nos limites descritos por Park *et al.* (2007).

Tabela 10 – A avaliação da cor instrumental dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) em diferentes tempos de conservação

Amostra	$\Delta E$
RCLF	-
RCLR6	0,91 $\pm$ 0,42
RCLR10	4,42 $\pm$ 0,14
RCLC30	0,46 $\pm$ 0,30
RCLC60	1,17 $\pm$ 0,01
RCLC90	1,57 $\pm$ 0,33

Média de três valores de cada batelada  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os resultados mostram que apenas o RCLR10 apresentou diferença de cor perceptível ao olho humano ( $\Delta E \geq 2$ ), (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975) em relação ao RCLF (padrão). Possivelmente, esta diferença pode ser atribuída a qualidade do leite deste dia, uma vez que o mesmo apresentou características de acidez elevadas, além de altas contagens microbianas que podem ter contribuído para essas discrepâncias. Visto que a MQLR10 e RCLR10 produzidos, apresentaram modificações nesse dia.

Faccia *et al.* (2015) estudaram o queijo Fior di latte elaborado com leite de ovelha e de cabra e verificaram que a percepção da cor branca, embora não seja estatisticamente significativa, foi mais evidente nos queijos elaborados com o leite de ovelha do que os elaborados com leite bovino. A diferença de cor dos leites ocorre devido à baixa concentração de caroteno em cabras e ovelhas no leite (PARK *et al.*, 2007).

#### 5.2.4 Análise do perfil de textura (TPA)

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da análise do perfil de textura (TPA) dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) ao longo do tempo de conservação. A dureza dos RCLR não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao RCLF e RCLC. Já todos os RCLC apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao RCLF. Os resultados mostram que não houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da dureza ao longo do tempo de conservação nos RCLC, visto que o RCLC30 e RCLC60 foram iguais ( $p < 0,05$ ) ao RCLC90. Possivelmente, a maior dureza dos RCLC pode ser associada com o maior teor de sólidos não gordurosos e o aumento dos sólidos totais (redução da umidade). Sabe-se que umidade e gordura são os principais fatores que influenciam na textura de queijos e requeijão, a redução de gordura promove o aumento nos teores de sólidos totais como consequência aumento da dureza, assim, torna-se necessária a

dissolução dos sólidos não gordurosos para que ocorra um equilíbrio na textura do requeijão (VANDENDER, 2006).

Os teores de matéria gorda nos sólidos totais devem ser controlados, pois a consistência do produto final depende basicamente do teor de gordura e umidade. Variações no conteúdo de gordura não influenciam na dureza quanto o conteúdo de umidade, mas a maior influência é exercida pelo conteúdo de sólidos não gordurosos (RAPACCI, 1997). Cunha (2007) ao avaliar a caracterização de requeijões comerciais, obteve maior intensidade das propriedades de textura avaliadas (dureza, elasticidade, gomosidade e adesividade) nos produtos com maior teor de sólidos não gordurosos.

Pereira (2013) ao avaliar diferentes formulações envolvendo diferentes teores de gordura e água, verificou que todas as propriedades de textura tiveram influência negativa do teor de água e de gordura, isto se deve à relação destes constituintes (gordura e água) com o sólidos não gordurosos, pois quanto menor o teor de água e de gordura, maior é a concentração de caseína e, conseqüentemente, maior é o número de interações proteína-proteína, causando o enrijecimento da matriz proteica e o aumento das propriedades de textura (FOX *et al.*, 2000).

A adesividade dos RC apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os dias avaliados em relação ao RCLF. Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) entre os RC elaborados com o LR ao longo do tempo. Já para os leites congelados não observou esse comportamento.

Os parâmetros de coesividade e a elasticidade dos RC elaborados com o leite refrigerado e congelado não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os dias avaliados em relação ao RCLF. Exceto a elasticidade do RCLC90 que apresentou valor significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que os demais.

Em relação a gomosidade, para os RC formulados com os LR não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação com LF. Já para o período congelado, ocorreu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) deste parâmetro para os RCLC em relação ao RCLF. No entanto, a gomosidade para os RCLC foi a mesma para os diferentes tempos de armazenamento congelado do leite. Os mesmos parâmetros que influenciam a dureza têm impactos também sobre a gomosidade, já que a energia necessária para desintegrar o alimento está relacionada à força necessária para comprimi-lo (CUNHA, 2007).

O parâmetro mastigabilidade do RCLR6 não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com RCLF, no entanto, para os obtidos a partir da massa elaborada com o leite de 10 dias (RCLR10), bem como os RCLC foram diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) do RCLF. Assim como a gomosidade que relaciona a dureza e a coesividade, a mastigabilidade relaciona

a gomosidade e a elasticidade, com isso, as alterações causadas na dureza, impactaram nos demais parâmetros.

Tabela 11 – Análise do perfil de textura (TPA) dos requeijões cremosos obtidos a partir do leite fresco (LF), leite refrigerado (LR) e leite congelado (LC) ao longo do tempo

Amostra	Dureza (N)	Adesividade (mJ)	Coabilidade	Elasticidade (mm)	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (mJ)
RCLF	0,92 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	10,44 ± 0,93 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,40 ± 1,24 <sup>a</sup>
RCLR6	1,19 ± 0,05 <sup>abd</sup>	8,75 ± 2,54 <sup>bcd</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	11,60 ± 0,74 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,08 <sup>ab</sup>	9,87 ± 1,64 <sup>ab</sup>
RCLR10	1,46 ± 0,12 <sup>abcd</sup>	10,73 ± 2,73 <sup>cdef</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>a</sup>	11,05 ± 1,16 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,23 <sup>abcd</sup>	12,88 ± 1,88 <sup>b</sup>
RCLC30	1,64 ± 0,86 <sup>bcd</sup>	8,77 ± 3,28 <sup>def</sup>	0,70 ± 0,06 <sup>a</sup>	11,33 ± 1,16 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,64 <sup>bcd</sup>	11,64 ± 7,52 <sup>b</sup>
RCLC60	2,16 ± 0,22 <sup>cd</sup>	12,44 ± 1,36 <sup>ef</sup>	0,72 ± 0,06 <sup>a</sup>	11,56 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,17 <sup>cd</sup>	15,91 ± 1,01 <sup>b</sup>
RCLC90	1,94 ± 0,76 <sup>d</sup>	11,82 ± 4,11 <sup>f</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>a</sup>	12,19 ± 1,21 <sup>b</sup>	1,52 ± 0,17 <sup>d</sup>	12,42 ± 2,04 <sup>b</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais na coluna em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Dias (2015) obteve para requeijões culinários, a partir de leite bovino, elaborados com o mesmo sal fundente, com quantidades diferentes das utilizadas neste estudo, os valores de dureza ( $2,77 \pm 0,10$  N), adesividade ( $9,34 \pm 1,40$  mJ), coabilidade ( $0,61 \pm 0,09$ ) e elasticidade ( $0,92 \pm 0,05$  mm). A dureza encontrada no presente estudo foi inferior para todos os RC, no entanto, a adesividade foi semelhante. Enquanto que a coabilidade ligeiramente maior, já a elasticidade do RC de leite de ovelha foi, na média, aproximadamente 10 vezes maior.

O pirofosfato, sal fundente usado neste estudo, além do efeito tampão, é conhecido por conferir textura firme, estrutura curta, sem formação de fios e baixo derretimento ao requeijão, o que possivelmente se deve à capacidade deste formar ligações cruzadas com a caseína, especialmente em pH próximo a 6,0 (que aumenta a carga negativa da caseína), resultando em uma rede mais aberta que possibilita uma maior capacidade de ligação com a água (LU; SHIRASHOJI; LUCEY, 2008). Os valores de pH dos RC do presente estudo (Tabela 8), foram superiores a 6,0, e ainda, a MQ apresentou alta umidade, e pouca gordura, fazendo com que a adição de creme de leite aumentasse ainda mais a umidade em excesso da formulação, com isso, além do alto pH dos RC, fez com que o requeijão apresentasse bastante umidade.

Barth, Tormena e Viotto (2017) ao avaliar diferentes pH das matrizes proteicas e sua influência nos requeijões cremosos produzidos a partir de diferentes graus de hidrólise de polifosfato de sódio mostraram que os requeijões cremosos a partir da matriz proteica cujo pH 5,2, exibiu uma aparência mais dura e mais frágil quando comparado com amostras feitas em valores de pH (6,0 a 6,8), a estrutura era contínua, homogênea e mais fluida. Em valores de pH mais altos (acima de 6,0), o queijo apresentou comportamento de emulsão proteica concentrada, com “textura longa” e menos adesivo que queijos feitos com menor pH. Cabe salientar que o

pH (5,20; 5,60; 6,00; 6,40; 6,80) da massa de queijo, obteve pH (5,20; 5,59; 5,75; 6,08; 6,22) do requeijão cremoso, respectivamente. No presente estudo, foi observado o mesmo comportamento, embora os valores de pH da matriz proteica não sejam correspondentes aos valores de pH, em virtude de inúmeros fatores já mencionados ao discutir sobre o pH da MQ no item (5.2.2.1).

### 5.3 INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES DO ANO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, CONTAGEM MICROBIANA, ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS DO LEITE DE OVELHA

Para o presente estudo utilizou-se as coletas realizadas em abril de 2017 (outono), agosto de 2017 e 2018 (inverno), novembro de 2017 (primavera) e em março de 2017 e janeiro de 2018 (verão). Os resultados que serão apresentados consistem nas características do leite denominado fresco, sendo este analisado em até 12 horas após a sua produção.

#### 5.3.1 Características físico-químicas do leite de ovelha

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados da influência das estações do ano nas características físico-químicas do leite de ovelha. Os valores de pH apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as estações do ano, tendo maior valor na primavera e menor no outono. Já a acidez, não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as estações, permanecendo dentro dos limites aceitáveis, conforme relatado por Park *et al.* (2007) de 0,22% a 0,25% (ácido láctico).

Fava, Külkamp-Guerreiro e Pinto (2014a) observaram um aumento dos valores de pH do leite de ovelha no mês de março ao mês de abril (outono) e consecutiva diminuição no mês de maio (inverno), comportamento contrário do presente estudo, contudo a acidez foi inferior em comparação ao relatado pelos autores referenciados e estável durante as estações, característica importante, uma vez que para ambas pesquisas o leite era proveniente da raça Lacaune produzido no Oeste de Santa Catarina e na Serra do Rio Grande do Sul.

Segundo Park *et al.* (2007), os valores de pH do leite de ovelha variam entre (6,51 - 6,85), enquanto que os obtidos na literatura internacional encontrados estão entre (6,50 - 6,69) (FACCIA *et al.*, 2015; TABLA *et al.*, 2016; DE LA VARA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018) e acidez (0,23%) (DE LA VARA *et al.*, 2018).

Tabela 12 – Influência das estações do ano nas características físico-químicas do leite de ovelha coletado em 2017 e 2018

Parâmetros	Outono	Inverno	Primavera	Verão
<b>pH</b>	6,45 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,58 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,62 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,54 ± 0,01 <sup>d</sup>
<b>Acidez (%)</b>	0,20 < 0,01 <sup>a</sup>	0,22 < 0,01 <sup>a</sup>	0,19 < 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>Gordura (%)</b>	6,40 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,85 ± 0,16 <sup>b</sup>	5,87 ± 0,21 <sup>c</sup>	6,23 ± 0,10 <sup>ad</sup>
<b>Proteína (%)</b>	5,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,44 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,27 ± 0,09 <sup>b</sup>	5,41 ± 0,10 <sup>b</sup>
<b>Lactose (%)</b>	4,35 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,11 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (%)</b>	0,89 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,89 < 0,01 <sup>a</sup>
<b>Sólidos totais (%)</b>	16,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	16,61 ± 0,14 <sup>a</sup>	16,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	16,16 ± 0,09 <sup>c</sup>
<b>Sólidos não gordurosos (%)</b>	10,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,76 ± 0,16 <sup>b</sup>	10,48 ± 0,02 <sup>ac</sup>	9,93 ± 0,09 <sup>ab</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais nas linhas em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

No Brasil, o pH e a acidez relatados para o leite de ovelha da raça Lacaune seria entre 6,58 a 6,70 e 0,22% a 0,30%, respectivamente (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; HANAUER *et al.*, 2016; REVERS *et al.*, 2016). Os valores médios de acidez obtidos no presente estudo (0,20%), relativo aos dois anos de coleta, independentemente das estações foram inferiores aos relatados na literatura para a mesma raça e regiões próximas. Levando em consideração que todos os leites foram amostrados, imediatamente refrigerados até o momento da análise, sendo estas realizadas em até 12 h após a ordenha, a acidez encontrada poderia ser classificada como natural e não a acidez desenvolvida, já que esta estaria atrelada ao tempo de armazenamento do leite, segundo De La Vara *et al.* (2018).

Os teores de gordura apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as estações do ano, sendo que no inverno foram encontrados os maiores teores. Segundo Alais (1985) a gordura é possivelmente o componente do leite que apresenta maiores variações em relação as condições de produção do leite, as quais foram relatadas em Park *et al.* (2007) para leites de cabra e ovelha, especialmente em função das estações do ano e estas especialmente associadas a mudanças na dieta e não especificamente à estação. No entanto, a temperatura ambiente que seria, uma das principais causas das variações estacionais, causaria alteração na quantidade ingesta dos animais, devido à perda de apetite, diminuindo assim a produção de leite (ALAIS, 1985; MAHIEU, 1991, SILVEIRA *et al.*, 2017). Como pode ser observado no Quadro 3, onde em menores temperaturas, houve menor produção de leite e concentração dos teores de gordura (Tabela 12).

Em estudo realizado por Peana *et al.* (2017) onde avaliaram os efeitos das condições meteorológicas de inverno e primavera na produção por pastoreio de leite de ovelhas em condições mediterrânicas, verificaram que o estresse térmico causou reduções na produção de

leite, quando as temperaturas eram baixas (0 °C - 3°C) no inverno, assim como, nas elevadas (25°C) durante a primavera considerando o desconforto dos animais. Ainda, observaram que as temperaturas de 6 °C a 21 °C no inverno e 9°C a 24°C na primavera, favoreceram a produção, indicando que esta consiste em um fator determinante para composição do leite.

Os teores de gordura do presente estudo, encontram-se entre os relatados em outras pesquisas do leite de ovelha da raça Lacaune, produzidos no Brasil, entre 4,40% a 9,00% (TRIBST *et al.*, 2018; HANAUER *et al.*, 2016; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; REVERS *et al.*, 2016). Já para o leite de ovelha produzido em outros países uma faixa menor foi observada (6,20% a 7,56%) (FACCIA *et al.*, 2015; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; TABLA *et al.*, 2016; DE LA VARA *et al.* 2018; PALOMBA *et al.*, 2017).

As diferenças entre o teor de gordura para o leite de ovelha, podem estar associadas à produção média de leite por dia, sendo que a média relatada na cabana onde as coletas do presente estudo foram realizadas seria em torno de 1,7 L/dia com 160 dias de lactação, semelhante ao encontrado para as ovelhas da raça Lacaune na França e Espanha (1,8 e 2,2 L/dia), respectivamente, com 160 dias de lactação (PULINA *et al.*, 2018) e no Brasil (1,7 L por dia) para ovelhas com até 120 dias de lactação (BIANCHI *et al.*, 2014). Neste período de lactação, no Brasil, Brito *et al.*, (2006), indicaram 1,3 L por dia, sendo assim, observado a concentração de alguns componentes como gordura e sólidos totais em relação ao volume total obtido, podendo justificar os teores mais baixos destes quando a produção for maior, conforme relatado em Silveira *et al.* (2017).

O conteúdo de proteína foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) somente em relação ao outono, onde apresentou valor inferior aos demais. Fava (2012) também observou variações do conteúdo proteico quando ocorria a mudança de estação. Os valores encontrados no presente estudo estão coerentes com os obtidos na literatura, os quais internacionalmente estariam entre 4,44% a 5,90% (ZHANG *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2018; PALOMBA *et al.*, 2017; FACCIA *et al.*, 2015; TABLA *et al.*, 2016; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; DE LA VARA *et al.*, 2018). Enquanto que no Brasil para raça Lacaune o teor de proteína de 5,10% a 5,80% foi relatado (TRIBST *et al.*, 2018; HANAUER *et al.*, 2016; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; REVERS *et al.*, 2016).

Os teores de lactose não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações do ano. Isto já era esperado, visto que é o parâmetro menos variável entre os componentes do leite bovino (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014). Segundo Park *et al.* (2007) a média de

lactose para o leite de ovelha encontra-se na faixa de 4,9%, valor acima da média obtida no presente trabalho, assim como em estudos para leite de ovelha produzido em outros países (4,40% - 5,59%) (NGUYEN *et al.*, 2018; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018, KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; ZHANG *et al.*, 2006; PALOMBA *et al.*, 2017; DE LA VARA *et al.*, 2018) e do Brasil para raça Lacaune (4,44% - 4,90%) (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; HANAUER *et al.*, 2016; REVERS *et al.*, 2016).

Os teores de cinzas não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações do ano, sendo que o valor médio relatado por Park *et al.* (2007) foi 0,90%, corroborando com o presente estudo. Os teores de cinzas indicados pela literatura internacional variam entre 0,89% a 0,95 % (KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018), enquanto que no Brasil, segundo Hanauer *et al.* (2016) seria de  $0,89 \pm 0,01\%$ , próximos aos obtidos no presente estudo, salientando a importância do fator raça e localização, já que os mesmos foram produzidos na região Oeste de Santa Catarina por ovelhas da raça Lacaune.

Os teores de sólidos totais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações do ano, apenas os valores de outono e inverno foram estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), sendo no inverno observado os maiores valores. No inverno o teor de gordura aumentou, o que pode estar relacionado aos maiores valores de sólidos totais. Isso pode ser explicado devido a temperatura ambiente, visto que o frio e o calor intensos podem provocar aumento da concentração de matéria gorda do leite, devido à diminuição do volume de leite produzido (MAHIEU, 1991; SILVEIRA *et al.*, 2017).

Os sólidos não gordurosos seguem o mesmo princípio, os mesmos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações do ano, com maior valor na primavera, o que pode ser atribuído ao menor teor de gordura, já que os parâmetros de lactose e proteína não variaram entre inverno, primavera e verão. Notou-se que apenas o inverno foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação as demais estações, onde o maior teor de gordura foi observado.

Os valores encontrados de sólidos totais bem como de sólidos não gordurosos relatados para leite de ovelha produzido em outros países foram de 15,18% a 18,82% (ZHANG *et al.*, 2006; FACCIA *et al.*, 2015; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; DE LA VARA *et al.*, 2018; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018) e 10,21% a 12,40% (ZHANG *et al.*, 2006; FACCIA *et al.*, 2015; KATSIARI; VOUTSINAS; KONDYLI, 2002; GIROUX; VEILLETTE; BRITTEN, 2018). No Brasil, para a raça Lacaune, foram evidenciados valores de sólidos totais de 17,5% a 19,59% (TRIBST *et al.*, 2018; FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a)

e sólidos não gordurosos de 10,96% a 12,40% (FAVA; KÜLKAMP-GUERREIRO; PINTO, 2014a; TRIBST *et al.*, 2018).

Os resultados deste estudo mostraram que os parâmetros de pH, gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos tiveram influência com relação as estações do ano, enquanto que a lactose, acidez e cinzas não apresentaram o mesmo comportamento, contudo os valores obtidos foram coerentes com dados encontrados na literatura.

### **5.3.2 Contagem microbiana e atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha**

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da influência das estações do ano na contagem microbiana e na atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha. A contagem de micro-organismos mesófilos apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para a primavera, onde apesar do seu aumento nesta estação, não foi observado alteração da acidez do leite, uma vez que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a acidez do leite de ovelha nas estações do ano.

O Brasil não apresenta legislação específica para o leite de ovelha, assim utilizou-se o regulamento específico N° 853 para ovinos e caprinos da União Europeia, que preconiza a contagem em placas à 30 °C de  $\leq 5,69 \log \text{UFC/mL}$  para produtos elaborados com leite cru de outras espécies por um processo que não inclua tratamento térmico, e  $\leq 6,18 \log \text{UFC/mL}$  para as que os incluem (UE, 2004; PMO, 2015). Segundo os dados apresentados na Tabela 13 a contagem de mesófilos encontra-se dentro destes parâmetros, com exceção da primavera.

A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos é utilizada como método oficial indicativo de qualidade microbiológica para o leite, essas bactérias são responsáveis pela rápida acidificação e degradação do leite, resultado da inadequada higienização de ordenha ou ineficiente temperatura de armazenamento (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015). Contudo Faccia *et al.* (2015) investigaram o leite de ovelhas das raças Sarda, Leccese, e Comisana, na Itália e encontraram contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos de  $5,01 \log \text{UFC/mL}$  para o leite de ovelha fresco, valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Ressalta-se que a contagem determinada para a União Europeia pode não ser a ideal para o Brasil, evidenciando a necessidade por estudos que viabilizem a determinação dos limites de qualidade para o leite de ovelha, uma vez que a composição química deste pode variar conforme muitos fatores, dentre eles as condições ambientais e localização dos rebanhos

(PARK *et al.*, 2007), possibilitando a elaboração de uma legislação brasileira que descreva os padrões de identidade e qualidade deste leite.

Tabela 13 – Influência das estações do ano na contagem microbiana e na atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas no leite de ovelha

Parâmetros	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Mesófilos (log UFC/mL)	4,72 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,40 <sup>a</sup>	5,86 ± 0,10 <sup>b</sup>	4,15 ± 0,51 <sup>a</sup>
Psicrotróficos (log UFC/mL)	3,83 ± 0,15 <sup>ac</sup>	3,30 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,01 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,17 ± 0,61 <sup>c</sup>
Atividade Proteolítica (mU/mL)	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,31 < 0,01 <sup>c</sup>	0,04 ± 0,02 <sup>b</sup>
Atividade Lipolítica (U/mL)	2,19 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,55 <sup>b</sup>	< 0,01 <sup>c</sup>	< 0,01 <sup>c</sup>

Média de três valores de cada batelada ± desvio padrão. Letras iguais nas linhas em cada avaliação indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao leite produzido nas diferentes estações do ano, sendo na primavera os maiores observados (Tabela 13), o que possivelmente exerceu influência na atividade proteolítica do leite de ovelha, visto que nesta a maior atividade proteolítica foi encontrada. A contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos está relacionada com as condições de higiene da ordenha. Além disso, estas bactérias multiplicam-se em temperaturas de refrigeração, inferiores a 7 °C, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas termo resistentes, as quais deterioram o leite (DEETH, 2006). Em boas condições de higiene, somente 10% da microflora total é representada por psicrotróficos, em comparação com um valor superior a 75% em condições não higiênicas (SUHREN, 1989).

Da Silva *et al.* (2010) e Capodifoglio *et al.* (2016) indicaram que durante a estação chuvosa, a saúde do rebanho, a qualidade da água, as condições das camas, higiene de equipamento e dos ordenhadores contribuíram decisivamente para o aumento da contagem psicrotrófica, especialmente *Pseudomonas spp.* Na região sul do país, de clima temperado, com estações bem definidas, durante a primavera segundo a Epagri (2018), o quantitativo de chuva são mais elevados em relação aos meses anteriores, com acumulados significativos em curto espaço de tempo, demonstrando que a estação chuvosa, possa justificar a contagem microbiana da primavera observada no presente estudo.

Bactérias psicrotróficas, não representam um problema para indústria, pois são eliminadas pelo tratamento térmico, entretanto as enzimas lipolíticas e proteolíticas produzidas e secretadas por estes micro-organismos promovem efeitos deteriorantes. Tais enzimas são frequentemente muito estáveis ao calor e resistentes ao processo térmico convencional aplicado

ao leite (SAMARŽIJA; ZAMBERLIN; POGAČIĆ, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015; BAGLINIÈRE *et al.*, 2017).

A atividade proteolítica, apresentou diferença significativa entre as estações do ano ( $p < 0,05$ ), sendo maior na primavera, seguida de outono, inverno e verão. Palomba *et al.* (2017) avaliaram a atividade proteolítica do leite de ovelha na Itália e relataram ( $1,66 \pm 0,47$  mU/mL), valores superiores aos encontrados no presente trabalho. Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) estudaram a contagem de micro-organismos psicrotróficos e atividade proteolítica de leite bovino cru, sendo as contagens obtidas em torno de  $6,43 \pm 0,35$  log UFC/mL de psicrotróficos e  $12,3 \pm 9,1$  U/mL de atividade proteolítica. Cabe ressaltar que quando o número de psicrotróficos atinge contagens superiores a 6 log UFC/mL, o meio estaria suscetível a produção elevada de enzimas termorresistentes, responsáveis por alterações como a gelatinização do leite UAT, além do desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Cabe ressaltar que o leite permaneceu refrigerado até 12 horas entre a ordenha e realização das análises, e com isso, a atividade proteolítica observada pode estar relacionada com as enzimas presentes no próprio leite, como a plasmina oriunda do sangue (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A atividade lipolítica apresentou diferença significativa entre as estações do ano ( $p < 0,05$ ), sendo maior no outono e inverno e não apresentando atividade na primavera e verão. Cardoso (2006) estudou a microbiota psicrotrófica no leite estocado sob refrigeração e obteve valores de atividade proteolítica 1,99 U/mL e atividade lipolítica de 16,09 U/mL. A contagem de bactérias psicrotróficas do leite cru refrigerado relatada por Cardoso (2006) foi menor do que 5 log UFC/mL, isso pode ter refletido na atividade proteolítica, uma vez que os autores indicaram atividade 6 vezes menor quando comparado a Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009).

Capodifoglio *et al.* (2016) verificaram a porcentagem de amostras de leite bovino cru que apresentaram as atividades lipolíticas foram principalmente na estação seca, já as atividades proteolíticas na estação das chuvas. A quantificação das atividades proteolíticas e lipolíticas do leite de ovelha são pouco elucidadas na literatura. Haryani *et al.* (2003) descreve que a contagem de bactérias psicrotróficas não determina a existência de atividade proteolítica e lipolítica, entretanto, o tipo de bactéria presente no leite é o determinante para tal ocorrência. Desta forma, o leite de ovelha avaliado no presente trabalho contendo menor contagem de psicrotróficos em relação a que a literatura relata como limitante para causar alterações perceptíveis no leite pelas enzimas, tornaria este uma excelente matéria-prima independente da estação do ano considerando este parâmetro e as amostras avaliadas.

## 6 CONCLUSÃO

A conservação do leite de ovelha fresco torna-se uma medida necessária para o desenvolvimento da sua produção, comercialização e processamento, ainda a influência dos métodos existentes, como refrigeração e congelamento são igualmente importantes na definição de parâmetros de processos e de requisitos de qualidade.

Neste sentido, os métodos de conservação abordados neste estudo, mostraram que o leite de ovelha refrigerado à 4 °C, por 6 dias, e congelado à -29,80 °C, por 90 dias, manteve sua qualidade físico-químicas e microbiológicas, bem como suas frações proteicas. Já o leite refrigerado por 10 dias teve sua qualidade influenciada especialmente em relação ao pH, acidez, estabilidade, maior contagem dos micro-organismos psicotróficos, resultando em degradações proteicas, evidenciadas pelo surgimento de bandas intermediárias mais intensas na faixa de 15 a 10 kDa, indicando a formação de peptídeos.

Os métodos de conservação do leite de ovelha não influenciaram o rendimento da massa de queijo, porém ocorreu redução de cálcio da elaborada com o leite refrigerado durante 10 dias. A refrigeração do leite de ovelha por até 6 dias não modificou as características físico-químicas, de cor e perfil de textura dos requeijões cremosos em comparação aos obtidos com leite fresco.

O requeijão elaborado com o leite refrigerado por 10 dias apresentou comportamento do perfil de textura igual (adesividade, gomosidade e mastigabilidade) em relação aos obtidos com leite congelado. No geral, os requeijões cremosos elaborados com leite congelado apresentaram valores maiores de dureza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade.

Os resultados do estudo com o leite de ovelha refrigerado e congelado indicam a possibilidade de tornar a prática da conservação uma forma de manter a qualidade da matéria-prima, o que favorece a produção de derivados e, conseqüentemente, agrega valor ao leite ovino. Contudo, em função das diversas peculiaridades relativas à raça, manejo e produção leiteira, entre outras, ressalta-se que os parâmetros físico-químicos dos leites avaliados nesta pesquisa, como pH, gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos, contagem microbiana e atividades enzimáticas, foram influenciados pelas estações do ano, implicando na dificuldade da definição dos requisitos de qualidade e evidenciando a necessidade de outros estudos e a definição de uma legislação específica para o leite de ovelha.



## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Acredita-se que seja de suma importância avaliar a maneira com que a gordura se comporta (microestruturas) quando submetido a refrigeração e principalmente no congelamento. Seria interessante também avaliar a microbiota presente no leite, de maneira a identificar os micro-organismos que apresentam atividade proteolíticas e lipolíticas.

Além disso, necessita-se otimizar o procedimento tanto da MQ, quanto do RC. Em virtude de melhorar a quantidade de gordura presente na matriz proteica, para que seja realizado um requeijão cremoso com menos creme de leite. Estudar os melhores sais fundentes para elaborar os requeijões. Enfim, há ainda um campo a ser explorado, em virtude de ser uma matéria-prima diferente do costume.



## REFERÊNCIAS

- ALAIS, C. **Ciencia de la leche - Principios de técnica lechera**. ed. 4. Barcelona: Editorial Reverté, S. A, 1985.
- ALAIS, C. **Ciencia de la leche**: princípio de técnica lechera. Compania comercial e Editorial Continental S. A., Barcelona, 1970.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; AVONDO, M.; NUDDA, A.; CHESSA S.; PIRISI, A.; BANNIF, S. Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 3-12, 2016.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; MARINO, R.; DELLA MALVA, A.; CAROPRESE, M.; SEVI, A. Identification of peptides in functional Scamorza ovine milk cheese. **Journal Dairy Science**, v. 98, p. 1-5, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). 2013. **ABIQ firma com ANVISA acordo para a redução de sódio em queijos**. Disponível em: [http://www.abiq.com.br/abiq\\_noticias\\_ler.asp?codigo=1401&codigo\\_categoria=6&codigo\\_subcategoria=3](http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=1401&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=3) . Acesso em: 11 nov. 2018.
- BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DE CARVALHO, A. F.; VANETTI, M. C. D. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International dairy journal**, v. 68, p. 38-45, 2017.
- BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANT'ANA, A. S.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 247-262, 2017.
- BALTHAZAR, C. F.; SANTILLO, A.; FIGLIOLA, L.; SILVA, H. L. A.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G.; ALBENZIO M. Sensory evaluation of a novel prebiotic sheep milk strawberry beverage. **LWT**, v. 98, p. 94-98, 2018.
- BALTHAZAR, C. F.; SANTILLO, A.; GUIMARÃES, J. T.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S.L.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G.; ALBENZIO, M. Ultrasound processing of fresh and frozen semi-skimmed sheep milk and its effects on microbiological and physical-chemical quality. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 51, p. 241-248, 2019.
- BARŁOWSKA, J.; SZWAJKOWSKA M.; LITWINCZUK Z.; KRÓL J. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p. 291-302, 2011.

BARTH, A. P.; TORMENA, C. F.; VIOTTO, W. H. pH influences hydrolysis of sodium polyphosphate in dairy matrices and the structure of processed cheese. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 11, p. 8735-8743, 2017.

BELSITO, P. C.; FERREIRA, M. V. S.; CAPPATO, L. P.; CAVALCANTI, R. N.; VIDAL, V. A. S.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; BALTHAZAR, C. F.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; ZACARCHENCO, P. B.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; POLLONIO, M. A. R.; CRUZ, A. G. Manufacture of Requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 869-875, 2017.

BENCINI, Roberta. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: PROCEEDINGS OF THE 7 TH GREAT LAKES DAIRY SHEEP SYMPOSIUM, 7., 2001, Wisconsin. **Anais eletrônicos...** Wisconsin, USA, 2001. p. 52-83. Disponível em: <https://fyi.extension.wisc.edu/wisheepandgoat/files/2012/10/7thGLDSSdairysheep.pdf>. Acesso em: 27 out. 2017.

BENDICHO, S.; MARTÍ, G.; HERNÁNDEZ, T.; MARTÍN, O. Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 245-249, 2002.

BERGER, W.; KLOSTERMEYER, H.; MERKENICH, K.; UHLMANN, G. **Processed cheese manufacture**. A joia Guide. BK Landenburg, 238 p, 1989.

BERGER, Yves M. Milking equipment for dairy ewes. In: **Great lakes dairy sheep symposium**. 2001. p. 9-16.

BIANCHI, A. E.; MACEDO, V. P.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T.; LOPES, L. S.; STEFANI, L. M.; VOLPATO, A.; LIMA, H. L.; PAIANO, D.; MACHADO, G.; DA SILVA, A. S. Effect of adding palm oil to the diet of dairy sheep on milk production and composition, function of liver and kidney, and the concentration of cholesterol, triglycerides and progesterone in blood serum. **Small Ruminant Research**, v. 117, n. 1, p. 78-83, 2014.

BIANCHI, A. E. **Avaliação de sistemas produtivos de ovinos leiteiros em diferentes regiões do Brasil**. 2018. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

BONELL, W. Chimico-physical process in the manufacture of processed cheese. **Deutsche Molkerei Zeitung**, Berlin, v. 92, n. 4, p. 580-82, 1971.

BOSI, M.G. **Desenvolvimento de processo de fabricação de fabricação de requeijão light com e de requeijão sem adição de gordura e com fibra alimentar**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BRASIL, Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de março de 2017. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm). Acesso em: 20 out. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 de dezembro de 2011. Disponível em: [http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-62-2011\\_78285.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-62-2011_78285.html). Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018. Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de novembro de 2018. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137). Acesso em: 18 dez. 2018.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 77, de 26 de novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de novembro de 2018. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887). Acesso em: 18 dez. 2018.

BRASIL. Portaria no 349, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, 8 de setembro de 1997. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-359-de-04-09-1997,675.html>. Acesso em: 15 nov. 2017.

BRICKLEY, C. A.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; JAEGGI, J. J.; JOHNSON, M. E.; MCSWEENEY, P. L. H.; LUCEY, J. A. Influence of emulsifying salts on the textural properties of nonfat process cheese made from direct acid cheese bases. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 1, p. 39-48, 2008.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber Method)**. London: British Standards Institution. 1989.

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, R. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, p. 942-948, 2006.

CAPODIFOGGIO, E.; VIDAL, A. M.; LIMA, J. A.; BORTOLETTO, F.; D'ABREU, L. F.; GONÇALVES, A. C.; VAZ, A. C.; BALIEIRO, J. C.; NETTO, A. S. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5214-5223, 2016.

CARDOSO L. G.V.; BARCELOS, M. F. P.; OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, J. A. R.; ABREU, W. C.; PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, M. C. A. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras

introduzidas no Sul de Minas Gerais–Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 127-136, 2010.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CHANDAN, R. C.; PARRY, R. M.; SHAHANI, K. M. Lysozyme, Lipase, and Ribonuclease in Milk of Various Species<sup>1, 2</sup>. **Journal of Dairy Science**, v. 51, n. 4, p. 606-607, 1968.

CHANDAN, R.C.; ATTAIE, R.; SHAHANI, K. M. Nutritional aspects of goat milk and its products. Vth International Conference on Goats. 2-8 March, New Delhi, India. **Invited papers**, v. II, ed part II, p. 399-420, 1992.

CHÁVARRI, F.; SANTISTEBAN, A.; VIRTO, M.; RENOBALLES, M. Alkaline Phosphatase, Acid Phosphatase, Lactoperoxidase, and Lipoprotein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2926–2932, 1998.

CHAVEZ, M. S.; NEGRI, L. M.; TAVERNA, M. A.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 201-206, 2004.

CHEN, B.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. **Food chemistry**, v. 158, p. 216-223, 2014.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p. 255-275, 2003.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, T. R. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

CIPOLAT-GOTET, C.; CECCHINATO, A.; MALACARNE, M.; BITTANTE, G.; SUMMER, A. Variations in milk protein fractions affect the efficiency of the cheese-making process. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 10, p. 8788-8804, 2018.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. American Public Health Association, Washington, D. C, 2001. p.159-166, cap 13.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 96-100, 1992.

CUNHA, C. R. **Papel da gordura e do sal emulsificante em análogos de requeijão cremoso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007.

CUNHA, C. R.; ALCÂNTARA, M. R.; VIOTTO, W. H. Effect of the type of emulsifying salt on microstructure and rheological properties of “Requeijão Cremoso” processed cheese spreads. **Journal of food science**, v. 77, n. 8, p. 176-181, 2012.

DA SILVA, D. F.; DE SOUZA FERREIRA, S. B.; BRUSCHI, M. L.; BRITTEN, M.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Effect of commercial konjac glucomannan and konjac flours on textural, rheological and microstructural properties of low fat processed cheese. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 308-316, 2016.

DA SILVA, M. A. P.; DOS SANTOS, P. A.; DA SILVA, J. W.; LEÃO, K. M.; DE OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 112-118, 2010.

DARIO, C.; CARNICELLA, D.; CIOTOLA, F.; PERETTI, V.; BUFANO, G. Polymorphism of Growth Hormone GH1-AluI in Jersey Cows and Its Effect on Milk Yield and Composition. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 21, n 1, p. 1-5, 2008.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk—a review. **Food and Bioproducts processing**, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DAVIES, D. T.; WHITE, J. C. D. 713. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, v. 25, n. 2, p. 256-266, 1958.

DE LA VARA, J. A.; BERRUGA, M. I.; CAPPELLI, J.; LANDETE-CASTILLEJOS, T.; CARMONA, M.; GALLEGOS, L.; MOLINA, A. Some aspects of the ethanol stability of red deer milk (*Cervus elaphus hispanicus*): A comparison with other dairy species. **International Dairy Journal**, v. 86, p. 103-109, 2018.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2006.

DIAS, V. R. **Influência do tipo de sal emulsificante nas características de textura e derretimento do requeijão culinário**. 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S.; SMITH, P. G. Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 4, 2005.

EPAGRI /CIRAM. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Centro de **Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina**. Previsão climática trimestral para Santa Catarina, 2018. Disponível em: [http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2405&Itemid=141](http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2405&Itemid=141). Acesso em: 17 out. 2018.

FACCIA, M.; TRANI, A.; GAMBACORTA, G.; LOIZZO, P.; CASSONE, A.; CAPONIO, F. Production technology and characterization of Fior di latte cheeses made from sheep and goat milks, **Journal of Dairy Science**, v.98, ed 3, p. :1402–1410, 2015.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presence of *Pseudomonas* spp. related to different phases of the milking process with different hygienic managements and in refrigerated milk. **Ciência Rural**, v. 36, p. 568-572, 2006.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. Statistics database. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 2 dez. 2018.

FAVA, L. W. **Caracterização físico-química do leite de ovelhas da raça Lacaune e análise do rendimento de coalhada com caracterização física do soro obtido**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FAVA, L. W.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; PINTO, A. T. Evaluation of physico-chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1924-1930, 2014a.

FAVA, L. W.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; PINTO, A. T. Rendimento de coalhada obtida a partir de leite fresco, resfriado e congelado de ovelhas da raça Lacaune e caracterização física do soro obtido. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 937-942, 2014b.

FENNEMA, O. R.; WILLIAM, D.; ELMER, H. **Low-temperature preservation of foods and living matter**. 1973. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc.

FERNANDES, A. G. Parâmetros fundamentais para o processamento de queijos fundidos. *In*: MARTINS, J. F. & FERNANDES, A. G. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, ITAL, v. 5, p. 1-11, 1981.

FERRÃO, L. L.; FERREIRA, M. V. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, A. F. A.; PIMENTEL, T. C.; SILVA, H. L. A.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; NETO R. P. C.; TAVARES, M.I.B.; FREITAS, M. Q.; MENEZES, J. C.V.; CABRAL, J. M.; SILVA, M. C.; MATHIAS, S. S.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, A. G. C. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 137-147, 2018.

FERREIRA, M. I. C.; BORGES, I.; MACEDO JUNIOR, G. L.; RODRIGUEZ, N. M.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; GOMES, M. G. T.; SOUZA, F. A.; CAVALCANTI, L. F. Produção e composição do leite de ovelhas Santa Inês e mestiças Lacaune e Santa Inês e desenvolvimento de seus cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 530-533, 2011.

FONTECHA, J.; BELLANATO, J.; JUAREZ, M. Infrared and Raman spectroscopic study of casein in cheese: effect of freezing and frozen storage. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 11, p. 3303-3309, 1993.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P. L. H. 2000. Processed Cheese and Substitute or Imitation Cheese Products. *In*: FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen. Cap.18, p. 429-451.

FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. Food Colorimetry: Theory and Applications. **Avi Publishing Company**, 1975.

FURTADO, M. M. **Principais problemas com os queijos: causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora, 2005.

GAJO, A. A.; CARVALHO, M. S.; ABREU, L. R.; PINTO, S. M. Avaliação da composição química e características sensoriais de bebidas lácteas fermentadas elaboradas com leite de ovelha. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 374, p. 59-65, 2010.

GIROUX, H. J.; VEILLETTE, N.; BRITTEN, M. Use of denatured whey protein in the production of artisanal cheeses from cow, goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 161, p. 34-42, 2018.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO L. R.; FREIRE D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, p.85-90, 1999.

GUINEE, T. P. Role of protein in cheese and cheese products. *In: Advanced Dairy Chemistry - 1 Proteins*. Springer, Boston, MA, 2003. p. 1083-1174.

GUINEE, T. P.; CARIC, M.; KALAB, M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. *In: Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Academic Press, 2004. p. 349-394.

GUINEE, T. P.; PUDJA, P. D.; REVILLE, W. J.; HARRINGTON, D.; MULHOLLAND, E. O.; COTTER, M.; COGAN, T. M. Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 6, p. 543-568, 1995.

GUO, M. R.; WANG, S.; LI, Z.; QU, J., JIN, L.; KINDSTED, P. S. Ethanol stability of goat's milk. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 57-60, 1998.

HAENLEIN, G. F. W. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 3-6, 2007.

HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L.; Sheep milk. *In: PARK, Y.W., HAENLEIN, G.F.W. (Eds.), Handbook of Non-Bovine Mammals. Blackwell Publishing, Ames, IA, p. 137-194, 2006.*

HANAUER, D. C.; RIGO, E.; BAGATINI, L.; STEFFENS, J.; CAVALHEIRO, D. Influência da substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio em queijo minas frescal de leite de ovelha. **Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 71, p. 119-130, 2016.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; DEETH, H. C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 15, 2003.

HATI, S.; MANDAL, S.; PRAJAPATI, J. B. Novel starters for value added fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255-275, 2013.

HILALI, M.; EL-MAYDA, E.; RISCHKOWSKY, B. Characteristics and utilization of sheep and goat milk in the Middle East. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 92-101, 2011.

HORNE, D. S. Ethanol stability and milk composition. *In: Advanced dairy chemistry*. 4 ed. Springer, New York, NY, 2016. p. 225-246.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S.S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, ed.11, p. 4999-5009, 2010.

JOOYANDEH, H.; ABEROUMAND, A. Physico-Chemical, Nutritional, Heat Treatment Effects and Dairy Products Aspects of Goat and Sheep Milks. **World Applied Sciences Journal**, v. 11, p. 1316-1322, 2010.

JÚNIOR, J. R.; DE OLIVEIRA, A. M.; SILVA, F. D. G.; TAMANINI, R.; DE OLIVEIRA; A. L. M.; BELOTI, V. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2018.

KATSIARI, M. C.; VOUTSINAS, L. P.; KONDYLI, E. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. **Food chemistry**, v. 77, n. 4, p. 413-420, 2002.

KEENAN, T. W.; MATHER, I. H. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. **Advanced Dairy Chemistry**, v.2, ed. 3, p.137-171, 2006.

KOKA, R.; WEIMER B. C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 280-288, 2000.

KOUTSOULI, P.; PATOUNAS, G.; MASSOURAS, TH.; BIZELIS, I.; POLITIS, I. Plasmin-plasminogen system and milk coagulation properties of two Greek dairy sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 124, p. 89-94, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, C. Y.; FATIMAH, A. B.; MAHYUDIN, N. A.; SAARI, N.; ZAMAN, M. Z. Physico chemical and microbiological qualities of locally produced raw goat milk. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 739-750, 2016.

LANE, J. H.; EYNON, L. Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**, London, v. 42, p. 32-37, 1923.

LATIMER, G. W. **Official methods of analysis: of AOAC international**. ed. 20. Maryland: AOAC, 2016. v. 2.

LU, Y.; SHIRASHOJI, N.; LUCEY, J. A. Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. **Journal of food science**, v. 73, n. 8, p. E363-E369, 2008.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO<sub>2</sub> Addition to Raw Milk on Proteolysis and Lipolysis at 4°C. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 1616-1631, 2003.

MACHADO, S. C.; FISCHER, V.; STUMPF, M. T.; STIVANIN, S. C. B. Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and

sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 4, p. 340-347, 2017.

MAHIEU, H. Factores que influyen na la composición de la leche. *In*: **LUQUET, F. M. Leche y produtos lácteos: vaca – oveja – cabra**. Zaragoza: Editora acribia, S.A., 1991. 117 – 179p.

MARCHESSEAU, S.; GASTALDI, E.; LAGAUDE, A.; CUQ, J. L. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1483-1489, 1997.

MASOODI, T. A.; SHAFI, G. Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. **Bioinformation**, v. 4, n. 9, p. 430, 2010.

MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER, G. **Stabilization of Milk Protein Systems A JOHA Guide**. Ludwigshafen: BK Giulini GmbH, 2005. 50p.

MCMAHON, LORI L.; YOON, K. W.; CHIAPPINELLI, VINCENT A. Electrophysiological evidence for presynaptic nicotinic receptors in the avian ventral lateral geniculate nucleus. **Journal of neurophysiology**, v. 71, n. 2, p. 826-829, 1994.

MERLIN JUNIOR, I. A.; COSTA, R. G.; COSTA, L. G.; LUDOVICO, A.; REGO, F. C. A.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Ovinocultura leiteira no Brasil: aspectos e fatores relacionados à composição, ao consumo e à legislação. *In*: **Colloquium Agrariae**, v. 11, p. 38-53, 2015.

MERRIL, C. R. Gel-Staining Techniques. **Methods In Enzymology**, v. 182, p. 477-488, 1990.

MEYER, A. **Process cheese manufacture**. London: Food Trade Press, 1973.

MILANI, F. X.; WENDORFF, W. L. Goat and sheep milk products in the United States (USA). **Small Ruminant Research**, v. 101, ed 1-3, p. 134-139, 2011.

MINAS GERAIS. Lei nº 19.583 de 17 agosto de 2011. Dispõe sobre as condições para manipulação e beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados. **Diário do Executivo e Legislativo**, Belo Horizonte, v. 119, n. 129, p. 1, 18 ago. 2011.

Caderno 1. Disponível em:

[https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=19583&comp=&ano=2011&aba=js\\_textoAtualizado#texto&utm\\_source=CompartilhamentoPorEmail&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=Compartilhar](https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=19583&comp=&ano=2011&aba=js_textoAtualizado#texto&utm_source=CompartilhamentoPorEmail&utm_medium=email&utm_campaign=Compartilhar). Acesso em 15 jan. 2018.

MINAS GERAIS. Lei nº 21.429 de 21 de julho de 2014. Altera a Lei nº 19.583, de 17 de agosto de 2011, que dispõe sobre as condições para manipulação e beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados. **Diário do Executivo e Legislativo**, Belo Horizonte, v. 122, n. 134, p. 1, 22 jul. 2014. Caderno 1. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=272810>. Acesso em 15 jan. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2016. **Acordo para redução de sódio dos alimentos industrializados 2008-2016**. Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/13/sodio-e-alimentacao-saudavel.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2018.

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

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. **New Zealand journal of dairy science and technology**, p. 20-65, 1985.

MOATSOU, G.; SAMOLADA, M.; KATSABEKI, A.; ANIFANTAKIS, E. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. **Lait**, v. 84 p. 285-296, 2004.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. American Public Health Association, Washington, D. C, 2001., p. 63-67, cap 7.

MUIR, D. D. Reviews of the progress of Dairy Science: Frozen concentrated milk. **Journal of Dairy Research**, v. 51, ed.4, p. 649-664, 1984.

NAGYOVÁ, G.; BUŇKA, F.; SALEK, R. N.; ČERNÍKOVÁ, M.; BAČOVÁ, H.; KRÁČMAR, S. The effect of individual phosphate emulsifying salts and their selected binary mixtures on hardness of processed cheese spreads. **Potravinárstvo**, v. 7, p. 191-196, 2013.

NGUYEN, H. T. H.; SAEDEDEH, A.; DAY, L. Differences in the microstructure and rheological properties of low-fat yoghurts from goat, sheep and cow milk. **Food Research International**, v. 108, p. 423-429, 2018.

NGUYEN, H. T.; ONG, L.; LOPEZ, C.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Microstructure and physicochemical properties reveal differences between high moisture buffalo and bovine Mozzarella cheeses. **Food Research International**, v. 102, p. 458-467, 2017.

NOBLE, M. S.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; COOK, J. B.; BLECK, G. T.; HURLEY, W. L.; WHEELER, M. B. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1090-1096, 2002.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, ed. 2, p. 157-163, 2009.

NURLIYANI; SURANINDYAH, Y.; PRETIWI, P. Quality And Emulsion Stability Of Milk From Ettawah Crossed Bred Goat During Frozen Storage. International Symposium on Food and Agro-biodiversity (ISFA2014). **Procedia Food Science**, v. 3, p. 142-149, 2015.

OLIVEIRA, G. B. D.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R. H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313-321, 2015.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. Campinas: Ícone, p. 21-38, 1986.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M.; ÀLVAREZ, L.; SANZ, M.; MINGUILLON, G.; PERALES, L.; CORTECERO, M. **Tecnología de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed. v.1, 2005.

PALOMBA, R.; FORMISANO, G.; ARRICHIELLO, A.; AURIEMMA, G.; SARUBBI, F. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1637-1641, 2017.

PARK, Y. W. Goat milk—chemistry and nutrition. In: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G.F.W. (Eds.), **Handbook of Milk of Non-bovine Mammals**. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa, 2006, p. 34–58.

PARK, Y. W.; CHUKWU, H. I. Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. **Small Ruminant Research**, v. 1, n. 2, p. 157-166, 1988.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN G. F. W. Physico-Chemical Characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, ed. 1-2, p. 88-113, 2007.

PATEL, H. A., ANEMA, S. G., HOLROYD, S. E., SINGH, H., CREAMER, L. K. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, Les Ulis, v. 87, p. 251-268, 2007.

PAZZOLLA, M., DETTORI, M. L., MANCA, F., NOCE, A., PIRAS, G., PIRA, E. MANCA, F.; PUGGIONI, O.; NOCE, A.; VACCA, G. M. The effect of long-term freezing on renneting properties of Sarda sheep milk. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 78, n. 3, p. 275-279, 2013.

PEANA, I.; FRANCESCONI, A. H. D.; DIMAURO, C.; CANNAS, A.; SITZIA, M. Effect of winter and spring meteorological conditions on milk production of grazing dairy sheep in the Mediterranean environment. **Small Ruminant Research**, v. 153, p. 194-208, 2017.

PENNA, C. F. A. M. **Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas Lacaune, Santa Inês e suas mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça**. 2011. Tese (Doutorado Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; LEITE, M. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; BORGES, I. Comparação entre métodos eletrônicos e convencionais para análise da composição do leite de ovelha. **Higiene Alimentar**, v. 27, p. 1080-1084, 2013.

PEREIRA, F. C. **Estudo tecnológico de requeijão cremoso light com teor de sódio reduzido e adição de fibra alimentar**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2013.

PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, p. 30-45, 2001.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo. v. 27, n. 2, p. 293 - 300, 2004.

PINTO JÚNIOR, W. R. **Efeito do congelamento do leite de cabra obtido em diferentes estágios de lactação sobre a qualidade de queijo minas frescal**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento e bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PMO. 2015. **Grade A pasteurized milk ordinance (2015 revision) of the US Food and Drug Administration**. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformatio/milk/ucm513508.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

POLITIS, I. Plasminogen Activator System: Implications for Mammary Cell Growth and Involution. **Journal of Dairy Science**, v. 79, ed. 6, p. 1097-1107, 1996.

PRIVATTI, R. T. **Efeitos da contagem bacteriana total do leite cru refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e rendimento durante a vida útil do queijo Minas Frescal**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

PULINA, G.; WILAN, J.; LAVÍN, P.; THEODORIDIS, A.; MORIN, E.; CAPOTE, J.; THOMAS, D. L.; FRANCESCONI, A. H. D.; CAJA, G. Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-15, 2018.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 205-213, 2002.

RAMOS, F. M.; HADDAD, F. F.; RAMOS, R. A.; PINTO, S. M. Adequacy of creamy requeijão cheese to the Standards of identity and quality and the labeling Standards. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 389, p. 5-14, 2012.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta**. 1997. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

RAYNAL, K.; REMEUF, F. Effect of storage at 4 C on the physicochemical and renneting properties of milk: A comparison of caprine, ovine and bovine milks. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 199-207, 2000.

REVERS, L. M.; DANIELLI, A. J.; ILTCHENCO, S.; ZENI, J.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Obtenção e caracterização de iogurtes elaborados com leites de ovelha e de vaca. **Revista Ceres**, v. 63, n. 6, p. 747-753, 2016.

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, N. V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 438-444, 2007.

RIGO, E.; NINOW J. L.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; REMONATTO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. Preliminary Characterization of Novel Extra-cellular Lipase from *Penicillium crustosum* Under Solid-State Fermentation and its Potential Application for Triglycerides Hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1592–1600, 2012.

SAMARŽIJA, D.; ZAMBERLIN, Š.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANTOS, A. S.; PIRES, C. V.; SANTOS, J. M.; SOBRINHO, P. S. C. Crescimento de micro-organismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado. **Alimentos e Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013.

SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; DARIO, C.; TUFARELLI, V. Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 15, p. 3090-3099, 2014.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. *In: Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações*. São Paulo, SP: Livraria Varela, 1996.

SILANIKOVE, N.; MERINB, U.; LEITNER, G. Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving Picture. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 533-545, 2006.

SILVA, A. T. **Fabricação de requeijão cremoso e de requeijão cremoso “light” a partir de retentado de ultrafiltração acidificado por fermentação ou adição de ácido láctico**. 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SILVA, A. T.; SPADOTI, L. M.; ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F. Desenvolvimento de tecnologia de fabricação de requeijão cremoso com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 64-77, 2015.

SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; MELLO, F. M. Características de fusão de quatro diferentes tipos de massas utilizadas na fabricação de requeijão cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 97-103, 2004.

SILVA, P. D.; TORRES, K. F. Acidez, pH e efeitos tampão no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 296, p. 33-41, 1995.

SILVA, R. C. S. N.; MINIM, V. P. R.; VIDIGAL, M. C. R. T.; SIMIQUELI, A. A.; SILVA, A. N.; MINIM, L. A. Prediction of texture sensory from instrumental measurements in processed cheeses with different fat contents. **Journal of Food Studies**, v. 1, p. 47-68, 2012.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborada com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1340-1347, 2003.

SILVEIRA, R. F.; COSTA, P. T.; FERNANDES, T. A.; MOREIRA, S. M.; SILVEIRA, I. D. B.; DE MORAES, R. E.; DE LIMA GONZALEZ, H. Características produtivas e

comportamentais de ovelhas Lacaune em diferentes estádios de lactação. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 18, p. 1-11, 2017.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SOUKOULIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: Conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 627-655, 2014.

SUHREN, G. Producer microorganism. In: MCKELLER, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC, 1989.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food quality and preference**, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.

TABLA, R.; GÓMEZ, A.; SIMANCAS, A.; REBOLLO, J. E.; MOLINA, F.; ROA, I. Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. **Small Ruminant Research**, v. 145, p. 123-129, 2016.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology**. Elsevier, 2007.

TONDO, E.C.; LAKUS, F. R.; OLIVEIRA, F. A. BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 146-150, 2004.

TRIBST, A. A. L.; RIBEIRO, L. R.; JUNIOR, B. R. D. C. L.; DE OLIVEIRA, M. M.; CRISTIANINI, M. Fermentation profile and characteristics of yoghurt manufactured from frozen sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 36-45, 2018.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia de 29 de Abril de 2004. Estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, 30 de abril de 2004. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:PT:PDF>. Acesso em: 15 abr. 2017.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Setembro Editora, 2014, p. 448.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. Fonte Comunicações e Editora, 2006, p. 392.

VAN DENDER, A. G. F.; GALLINA, D. A.; ZACARCHENCO, P. B. 2014. Características dos sais fundentes e seu papel na obtenção de queijos processados. In: VAN DENDER, A. G.

F. (Ed.). **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado.** São Paulo: Setembro, cap. 2, v. 56, p. 29.

VAN DENDER, A. G.; SPADOTI, L. M.; ZACARCHENCO, P. B.; TRENTO, F. K.; ORMENESE, R. C.; MORGANO, M. A. Efeito dos sais fundentes nas características do requeijão cremoso sem adição de gordura e com teor reduzido de sódio. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 387, p. 38-47, 2012.

VAN DENDER, A.G.F; SPADOTI, L.M. Probióticos e prebióticos em queijo. Campinas: TecnoLat, 2009.

VOUTSINAS, L. P.; KATSIARI, M. C.; PAPPAS, C. P.; MALLATOU, H. Production of yoghurt from sheep's milk which had been concentrated by reverse osmosis and stored frozen. 1. Physicochemical, microbiological and physical stability characteristics of concentrates. **Food Research International**, v. 29, ed 3-4, p. 403-409, 1996.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2nd ed. Taylor & Francis, New York, p. 763, 2006.

WASIKSIRI, S.; CHETHANOND, U.; PONGPRAYOON, S.; SRIMAI, S.; NASAE, B. Quality aspects of raw goat milk in Lower Southern Thailand. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 32, p. 109-113, 2010.

WENDORFF, B. Milk composition and cheese yield. *In: Proceedings of the 7th Great Lakes Dairy Sheep Symposium: 1-3 November 2001; Eau Claire: 2002.* 2002. p. 104-117.

WENDORFF, W. L. Freezing Qualities of Raw Ovine Milk for Further Processing. **Journal of Dairy Science**, v.84, ed Suppl, p. E74- E78, 2001.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein detection methods in proteomics research. **Bioscience reports**, v. 25, n. 1-2, p. 19-32, 2005.

WIKING, L.; FRØST, M. B.; LARSEN, L. B.; NIELSEN, J. H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 4, p. 190-194, 2002.

ZEHREN, V. L. NUSBAUM, D. D. **Process Cheese**. Madison: Cheese Reporter Publishing Company, 1992.

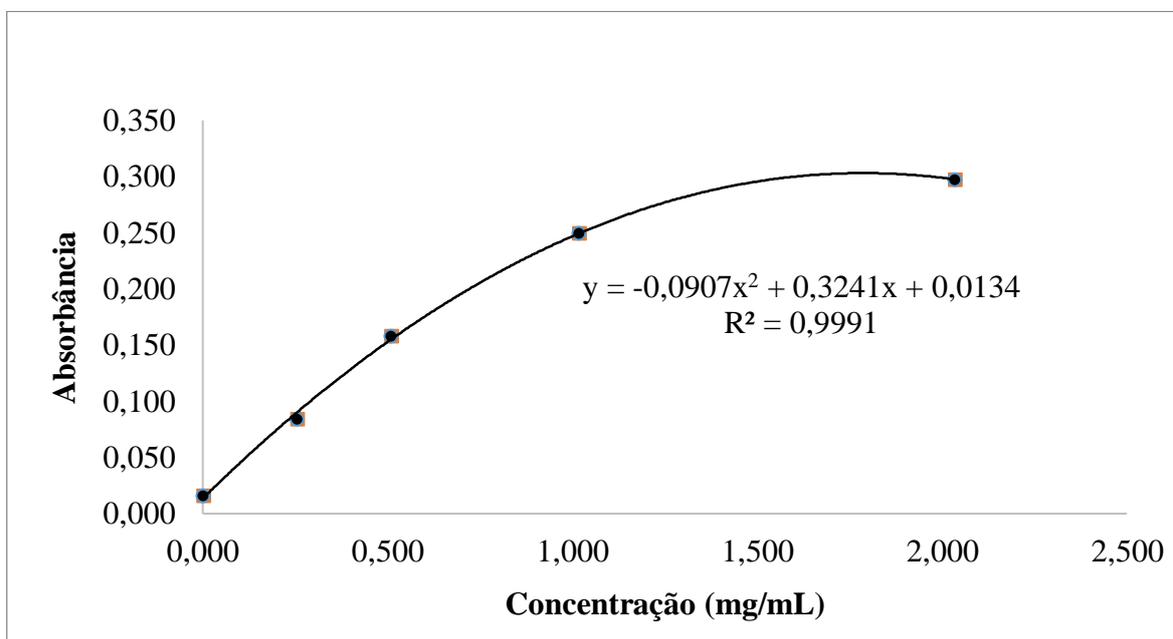
ZHANG, R. H.; MUSTAFA, A. F.; NG- KWAI-HANG, K. F.; ZHAO, X. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles os sheep milk and cheese. **Small Ruminant Research**, v.64, p. 203-210, 2006.

ZHANG, S.; LI, H.; ULUKO, H.; LIU, L.; PANG, X.; LV, J. Investigation of Protease Production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and Degradation on Milk Proteins. **Journal of food processing and preservation**, v. 39, n. 6, p. 2466-2472, 2015.



## APÊNDICE

Apêndice 1 – Curva padrão da protease *Bacillus spp.*



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.