Politécnico
Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Estudo Comparativo da Ação dos Ácidos Láctico e Cítrico na Acidificação do Soro de Leite de Pequenos Ruminantes

Maria Ana Caetano Raposo

Orientadores

Professora Doutora Ana Rita Simões Ferraz

Engenheira Fátima Alexandra Dias Lourenço

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão da Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Rita Simões Ferraz, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e Engenheira Fátima Alexandra Dias Lourenço da Queijaria Lourenço e Filhos, Vila Velha de Ródão.

Setembro 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Grau académico, nome do presidente do júri”

Vogais

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, pelo apoio, dedicação, paciência e por me terem incentivado sempre a seguir os meus sonhos.

De seguida agradeço à minha orientadora, Professora Ana Rita Ferraz, por ter aceitado o desafio de me acompanhar ao longo desta etapa final. Sem as suas sábias palavras e conhecimentos não teria sido possível elaborar um trabalho de que me orgulhasse tanto. Obrigada pela compreensão e preocupação, e por me ter motivado a continuar neste bonito percurso académico.

À Engenheira Fátima Lourenço que tão amavelmente abriu as portas da sua empresa para que fosse possível a realização deste estágio, e ensinar-me os detalhes para a produção de um queijo tão característico. Sem a sua ajuda, este estágio não teria sido o mesmo.

À Engenheira Inês Pitacas, pelas horas passadas no laboratório de Nutrição Animal da ESACB e os conselhos tão sábios que permitiram manter a calma em momentos decisivos. Ensinou-me como ninguém a trabalhar no laboratório, e fez-me sentir acolhida mesmo nos dias mais cansativos.

À Engenheira Dora Pereira, pela sugestão do tema do trabalho de estágio e a partilha de conhecimentos e experiência para o delineamento do mesmo.

À Professora Doutora Ofélia Anjos, pela ajuda e colaboração disponibilizada para a aquisição dos dados relativamente ao FTIR-ATR.

A todos os colaboradores da queijaria Lourenço e Filhos, que se disponibilizaram a esclarecer as minhas dúvidas e tiveram paciência para me ensinar a ser uma melhor profissional, e acima de tudo perceber que a errar também conseguimos aprender.

Queria também agradecer a todos os Professores, Engenheiros e Técnicos de Laboratório da ESACB que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que me acompanharam ao longo deste percurso académico, transmitindo conhecimentos valiosos.

E, como não poderia deixar de ser, queria agradecer à minha querida Famelga, que me acompanharam ao longo destes 3 anos, sem elas não estaria a concluir esta etapa tão bonita. Porque no meio do desespero, das noites passadas a estudar, nas pausas para o café, formou-se uma família que nos irá acompanhar para sempre.

Por fim, quero agradecer ao meu Guardião dos Segredos, que apesar de ter surgido só no final desta etapa académica, foi determinante com a sua paciência e palavras calmas, que não me deixaram desmotivar.

A todos, Muito Obrigada!

Resumo

A indústria queijeira produz elevadas quantidades de soro de leite, sendo este o principal subproduto obtido, tanto na produção de queijo de ovelha como de queijo de cabra. O subproduto apresenta um perfil nutricional muito completo e é utilizado na alimentação animal. Devido ao Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024 foi necessário desenvolver uma norma de trabalho de modo que o pH do soro de leite utilizado na alimentação animal fosse inferior a 6.

Este trabalho teve como principal objetivo realizar uma caracterização físico-química do soro de leite de ovelha e de cabra, assim como determinar a concentração de ácidos orgânicos necessária para atingir o pH final pretendido. Foram analisadas 12 amostras de soro de leite de ovelha e 6 amostras de soro de leite de cabra, recolhidas entre 11 de março e 27 de maio de 2025.

A caracterização físico-química consistiu na determinação do pH (6,4-6,6) e acidez (10-13 °D) de cada um dos soros de leite assim como a respetiva composição nutricional, nomeadamente a percentagem de proteína, lactose e gordura. O soro de leite de ovelha apresentou uma composição mais rica nos parâmetros nutricionais analisados, à exceção da gordura.

Os ensaios para determinar a concentração de ácido necessária para o pH do soro de leite ser inferior a 6 foram realizados com diferentes concentrações de ácido cítrico e láctico. Posteriormente relacionou-se o ácido orgânico com a temperatura, tempo de acidificação e perfil nutricional do soro de leite acidificado. O ácido cítrico (0,04%) revelou-se ser o mais eficiente para ambos os soros de leite, sendo que se obtiveram melhores resultados quando adicionado ao soro a 4 °C (pH<5,90 estável durante 24 h, com 95% de confiança). A acidificação afetou a composição nutricional, diminuindo o teor proteico, resultados reforçados pelo FTIR-ATR, em que o ácido cítrico interage nomeadamente com hidratos de carbono e sais minerais (1000-1200 cm^{-1}), tendo uma maior estabilidade na fração proteica, ao contrário do ácido láctico, em que as proteínas são mais afetadas (bandas amida I e II).

Concluiu-se que a acidificação com ácido cítrico (0,04%) a 4 °C permitiu obter melhores resultados em relação ao pH assim como perfil nutricional, mantendo-se estes valores estáveis ao longo das 24 horas em que foram recolhidas amostras. Desse modo a utilização do ácido cítrico permite a valorização do soro de leite, utilizando-o na alimentação animal, cumprindo o Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024.

Palavras chave

Ácidos Orgânicos, Alimentação Animal, Controlo de pH, Normas de Trabalho, Soro de Leite de Ovelha e Cabra

Abstract

The cheese industry produces massive quantities of whey, which is the main by-product obtained in both the production of sheep's cheese and goat's cheese. The by-product has a very complete nutritional profile, and it is used in animal feed. Due to "Esclarecimento Técnico Nº11/DGAV/2024", it was necessary to develop a standard operation procedure so that the pH of whey, used in animal feed, was less than 6.

The main objective of this work was to perform a physicochemical characterization of sheep and goat whey, as well as to determine the concentration of organic acids necessary to reach the final intended pH. Twelve samples of sheep's milk whey and six samples of goat's milk whey, collected between March 11 and May 27 of 2025, were analysed. The physicochemical characterization consisted of determining the pH (6.4-6.6) and acidity (10-13 °D) of each of the whey as well as the respective nutritional composition, namely the percentage of protein, lactose, and fat. Sheep's milk whey showed a richer composition in the nutritional parameters analysed, except for fat.

Assays to determine the acid concentration, required for whey pH to be less than 6, were performed with different concentrations of citric and lactic acid. Subsequently, organic acid was related to temperature, acidification time, and nutritional profile of acidified whey. Citric acid (0.04%) proved to be the most efficient for both whey, and better results were obtained when added to whey at 4 °C (pH<5.90 stable for 24 h, with 95% confidence). Acidification affected the nutritional composition, decreasing the protein content, results reinforced by the FTIR-ATR, in which citric acid interacts with carbohydrates and mineral salts (1000-1200 cm^{-1}), having greater stability in the protein fraction, unlike lactic acid, in which proteins are more affected (amide bands I and II).

It was concluded that acidification with citric acid (0.04%) at 4 °C allowed to obtain better results in relation to pH as well as nutritional profile, keeping these values stable over the 24 hours in which samples were collected. In this way, the use of citric acid allows the valorisation of whey, using it in animal feed, complying with "Esclarecimento Técnico Nº11/DGAV/2024".

Keywords

Animal Feeding, Organic Acids, pH Control, Sheep's and Goat's Whey, Standard Operating Procedure

Índice geral

1. Introdução 1
2. Local de Estágio 2
3. Produção de Queijo de Ovelha e de Queijo de Cabra 3
4. Soro de Leite 5
4.1. Composição do Soro de Leite de Ovelha e do Soro de Leite de Cabra 5
4.2. Soro de Leite e Alimentação Animal 6
4.3. Regulamentação do Soro de Leite para Alimentação Animal 7
4.3.1. Normas de Trabalho e Plano HACCP 8
5. Ácidos Orgânicos e Alimentação Animal 9
5.1. Ácido Cítrico 9
5.2. Ácido Láctico 9
6. Materiais e Métodos 10
6.1. Recolha das Amostras 10
6.2. Parâmetros Físico-Químicos 11
6.2.1. pH e Acidez Titulável 11
6.2.2. Composição Nutricional do Soro de Leite 12
6.3. Influência dos Ácidos Orgânicos no pH do Soro de Leite 13
6.4. Avaliação da Influência da Temperatura e do Tempo na Acidificação de Soro de Leite 13
6.5. Caracterização Química por FTIR - ATR da Influência de Ácidos Orgânicos no Soro de Leite 13
6.6. Análise Estatística de Dados 14
7. Resultados e Discussão 15
7.1. Parâmetros Físico-Químicos 15
7.1.1. pH e Acidez Titulável 15
7.1.2. Composição Nutricional do Soro de Leite 17
7.2. Influência dos Ácidos Orgânicos no pH do Soro de Leite 18
7.2.1. Ácido Cítrico 18
7.2.2. Ácido Láctico 19
7.3. Avaliação da Influência da Temperatura e do Tempo na Acidificação de Soro de Leite 20
7.4. Caracterização Química com FTIR - ATR da Influência de Ácidos Orgânicos no Soro de Leite 24

8. Norma de Trabalho 29
9. Conclusão 30
10. Referências 31
Anexo I – Norma de Trabalho 35
Anexo II – Folha de Registo 36
Anexo III – Fluxograma de Acidificação do Soro de Leite 37
Anexo IV – Tratamento Estatístico dos Resultados 38

Índice de figuras

Figura 1 — Marca Queijos Lourenço, produzida na Queijaria Lourenço & Filhos, Lda.2

Figura 2 — Queijos de Ovelha Curados, elaborados na Queijaria Lourenço & Filhos, e disponíveis ao consumidor nos seus 4 formatos: zero, pequeno, médio e grande. ...2

Figura 3 — Fluxograma de produção do queijo de ovelha curado. 4

Figura 4 —pH das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) e do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas, com uma temperatura de 14,6 ± 1,6 °C.... 15

Figura 5 — Acidez titulável, parâmetro físico-químico do soro de leite expressa em mL NaOH com 0,1 N /L de soro de leite, das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) assim como do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas. 16

Figura 6 — Acidez titulável, parâmetro físico-químico do soro de leite expressa em °Dornic, das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) assim como do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas.... 16

Figura 7 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido cítrico, em percentagem, com o pH do soro de leite de ovelha.... 18

Figura 8 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido cítrico, em percentagem, com o pH do soro de leite de cabra.... 19

Figura 9 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido láctico, em percentagem, com o pH do soro de leite de ovelha.... 19

Figura 10 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido láctico, em percentagem, com o pH do soro de leite de cabra.... 20

Figura 11 — Gráfico de teia com a evolução do pH do soro de leite de ovelha acidificado com ácido cítrico (AC) e ácido láctico (AL), a diferentes temperaturas (4 °C e 30 °C) ao longo do tempo (0 horas, 1 hora e 24 horas). 21

Figura 12 — Efeito da acidificação com ácido cítrico na composição nutricional do soro de leite de ovelha.... 22

Figura 13 — Efeito da acidificação com ácido láctico na composição nutricional do soro de leite de ovelha.... 23

Figura 14 — Espectros de FTIR-ATR do soro de leite de cabra nas diferentes condições experimentais.... 25

Figura 15—Espectros de FTIR-ATR do soro de leite de ovelha nas diferentes condições experimentais.... 26

Índice de tabelas

Tabela 1 – pH e composição nutricional do soro de leite de cabra e do soro de leite de ovelha, adaptado de Cambóias, 2020. 6

Tabela 2 – Composição físico-química do leite de cabra e do leite de ovelha por 100 g de leite, adaptado de Cambóias, 2020. 6

Tabela 3 – Amostras de soro de leite recolhidas, tipo de soro e data de recolha. 11

Tabela 4 – Composição nutricional do soro de leite de ovelha e cabra realizada através do equipamento MilkoScan. 17

Tabela 5 — Alterações nos principais nutrientes do soro de leite de cabra e de ovelha em função do tipo de acidificação. 28

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AC	Ácido Cítrico
AL	Ácido Láctico
CA	Soro de Leite de Cabra
CAAC	Soro de Leite de Cabra e Ácido Cítrico
CAAL	Soro de Leite de Cabra e Ácido Láctico
DGADR	Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DGAV	Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária
DOP	Denominação de Origem Protegida
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EU	União Europeia
FTIR	Fourier-Transform Infrared spectroscopy
FTIR-ATR	Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ISO	Organização Internacional de Normalização
LAB	Bactérias Ácido Lácticas
NP	Norma Portuguesa
OV	Soro de Leite de Ovelha
OVAC	Soro de Leite de Ovelha e Ácido Cítrico
OVAL	Soro de Leite de Ovelha e Ácido Láctico
PCC	Ponto Crítico de Controlo
pH	Potencial Hidrogeniónico
pK	Constante de Ionização
PRR	Programa de Pré-Requisitos

1. Introdução

O soro de leite é o líquido resultante da precipitação e remoção da coalhada durante a produção de queijo. Apresenta como cor característica o verde-amarelado turvo. O soro de leite é constituído principalmente por água e compostos orgânicos, sendo a lactose aquele que se apresenta em maior quantidade, seguida das proteínas (Ramos *et al*., 2016).

Para compreender melhor o volume de soro de leite que é obtido durante a produção de queijo, cerca de 80-90% do leite que é usado na produção acaba por se transformar em soro, e apenas 10% do leite faz parte da constituição do queijo. Este subproduto pode ser classificado em soro doce ou em soro ácido consoante o tipo de coagulação que é realizada no queijo. O soro de leite doce é obtido da produção de queijos curados (pH 5,8-6,6) e o soro de leite ácido é o subproduto da produção de queijos Cottage (pH 3,6-5,1) (Królczyk *et al*., 2016).

Segundo o relatório anual da Comissão Europeia, elaborado em 2023, em Portugal foram produzidas e utilizadas 87,4 mil toneladas de soro de leite na sua forma líquida, no ano de 2022. Considerando a produção total de soro de leite no país, segundo informação disponibilizada referente ao ano de 2017, foram produzidas cerca de 508 mil toneladas de soro de leite (European Commission, 2023).

Do mesmo modo que o leite, o soro de leite pode estar associado a diferentes animais, como vacas, ovelhas e cabras, e por esse motivo apresenta características diferentes consoante a espécie produtora. Ao longo deste trabalho irá ser abordado o soro de leite de pequenos ruminantes nomeadamente ovelhas e cabras. O soro de leite de ovelha apresenta-se como tendo valores elevados de proteína, gordura e lactose quando comparado ao soro de leite de cabra, sendo estes dois subprodutos diferentes na sua composição nutricional (Cambóias, 2020).

O soro de leite pode ter diversas utilizações assim como formas de ser reaproveitado, sendo a alimentação animal uma delas (Królczyk *et al*., 2016). Para o soro de leite poder ser administrado na dieta dos animais é necessário cumprir alguns requisitos, nomeadamente que o seu pH, passadas 16 horas após a formação do soro, seja inferior a 6 (DGAV, 2024).

Aditivos, como ácidos orgânicos, podem ser utilizados na alimentação animal, desde que cumpram requisitos específicos de concentrações fornecidas aos animais e métodos de produção do aditivo, segundo o Regulamento de Execução (EU) 2022/415. O ácido cítrico e o ácido láctico são dois exemplos desses aditivos (Comissão Europeia, 2022). De modo a ser possível diminuir o pH do soro de leite para valores aceitáveis irá ser necessário utilizar aditivos, sendo os ácidos cítrico e láctico opções viáveis, uma vez que podem ser utilizados na alimentação animal.

Este estágio teve como principal objetivo realizar a caracterização físico-química do soro de leite de ovelha e de cabra, assim como elaborar uma norma de trabalho para a

acidificação do soro de leite com ácidos orgânicos, de modo a cumprir o valor de pH inferior a 6,0 de acordo com o Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024.

2. Local de Estágio

O trabalho de estágio foi realizado na Queijaria Lourenço & Filhos, Lda. Esta empresa familiar foi fundada há cerca de 40 anos na localidade de Tostão, perto de Vila Velha de Ródão, onde se encontra atualmente a funcionar, na zona industrial. Nunca esquecendo a tradição, Lourenço & Filhos (Figura 1) modernizou-se ao longos dos anos, dispondo atualmente de modernas tecnologias de fabrico de queijo. A sua produção engloba principalmente o Queijo de Ovelha Curado (Figura 2), mas também se dedica à produção de Queijo de Cabra, DOP da Beira Baixa e o emblemático Queijo Queimoso, que remonta à fundação da Queijaria, que iniciou o seu trabalho com a recolha de queijos frescos e a sua transformação em Queijo Queimoso. Desse modo são produzidos os reconhecidos Queijos Lourenço, uma marca que se associa ao queijo na região da Beira Baixa.

Figura 1 — Marca Queijos Lourenço, produzida na Queijaria Lourenço & Filhos, Lda.



Figura 2 — Queijos de Ovelha Curados, elaborados na Queijaria Lourenço & Filhos, e disponíveis ao consumidor nos seus 4 formatos: zero, pequeno, médio e grande.

3. Produção de Queijo de Ovelha e de Queijo de Cabra

A produção do queijo de ovelha curado (Figura 3) inicia-se com a receção do leite de ovelha, que é armazenado em condições controladas, à temperatura de cerca de 6 °C, num tanque de refrigeração indicado à conservação do leite cru. O leite pode ser armazenado até cerca de 48 horas, sendo depois este utilizado no processo de produção do queijo. O leite cru é então encaminhado para a cuba, onde é elevada a temperatura do mesmo até cerca de 30 °C, sendo adicionado o sal, anti-butírico, e por fim o coalho, quando a temperatura se encontra próxima de 30 °C, permitindo assim a coagulação. Passados alguns minutos a coalhada encontrar-se-á nas condições pretendidas e procede-se assim ao corte da mesma, sendo que à medida que ocorre é possível observar-se o soro a surgir na superfície da coalhada (Rodrigues, 2023).

De seguida a coalhada e o soro são encaminhados para a enchedora, onde a coalhada é colocada do interior dos moldes, que irão dar forma ao queijo, enquanto o soro é armazenado num tanque no fundo da máquina onde é feito o enchimento, uma vez que ocorre o dessoramento durante este processo. O soro é recolhido na etapa de enchimento dos moldes de forma automática, sendo este encaminhado para um tanque de refrigeração, atingindo as condições ideais de temperatura que permitem o controlo das suas características físico-químicas assim como microbiológicas (Nunes, 2018).

Após o enchimento dos moldes, estes são colocados a prensar, retirando assim o soro excedente da massa e dando estrutura ao queijo. O tempo e a pressão de prensagem variam consoante o tipo de queijo, sendo que após esta etapa se procede à desenformagem, realizando-se de forma automática, encaminhando-se assim para a salmoura.

A salmoura consiste num tanque com agitação e expressores onde o queijo é mergulhado numa solução aquosa com elevada concentração de sal. O queijo retirado da salmoura é colocado na câmara onde é realizada a 1ª maturação, cerca de 15 dias. As condições desta câmara com temperatura e humidade controladas permitem que as bactérias naturalmente presentes no queijo iniciem a fermentação do mesmo (DGADR, 2025).

Posteriormente é feita a aplicação do “anti-bolor” que impede o desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície do queijo, ajudando na sua conservação. O queijo é assim encaminhado para a câmara onde se realiza a 2ª maturação (durante 2 a 3 semanas) e consoante o tempo de maturação do queijo, é colocado na 3ª câmara, onde ocorre a última fase da maturação do queijo, até estar pronto para a expedição (Nunes, 2018).

Durante todas as etapas de maturação do queijo, é realizada a sua manutenção e viragem, que consiste em verificar se a superfície do queijo se encontra homogénea, se existe crescimento de fungos e se é necessário colocar a cinta em torno queijo de modo

a manter a sua estrutura durante a maturação. Queijos com uma pasta mais mole, necessitam de ter a cinta em torno deles até à expedição.

Por fim, o queijo é embalado e rotulado de acordo com as preferências do consumidor, seguindo-se a expedição do mesmo.

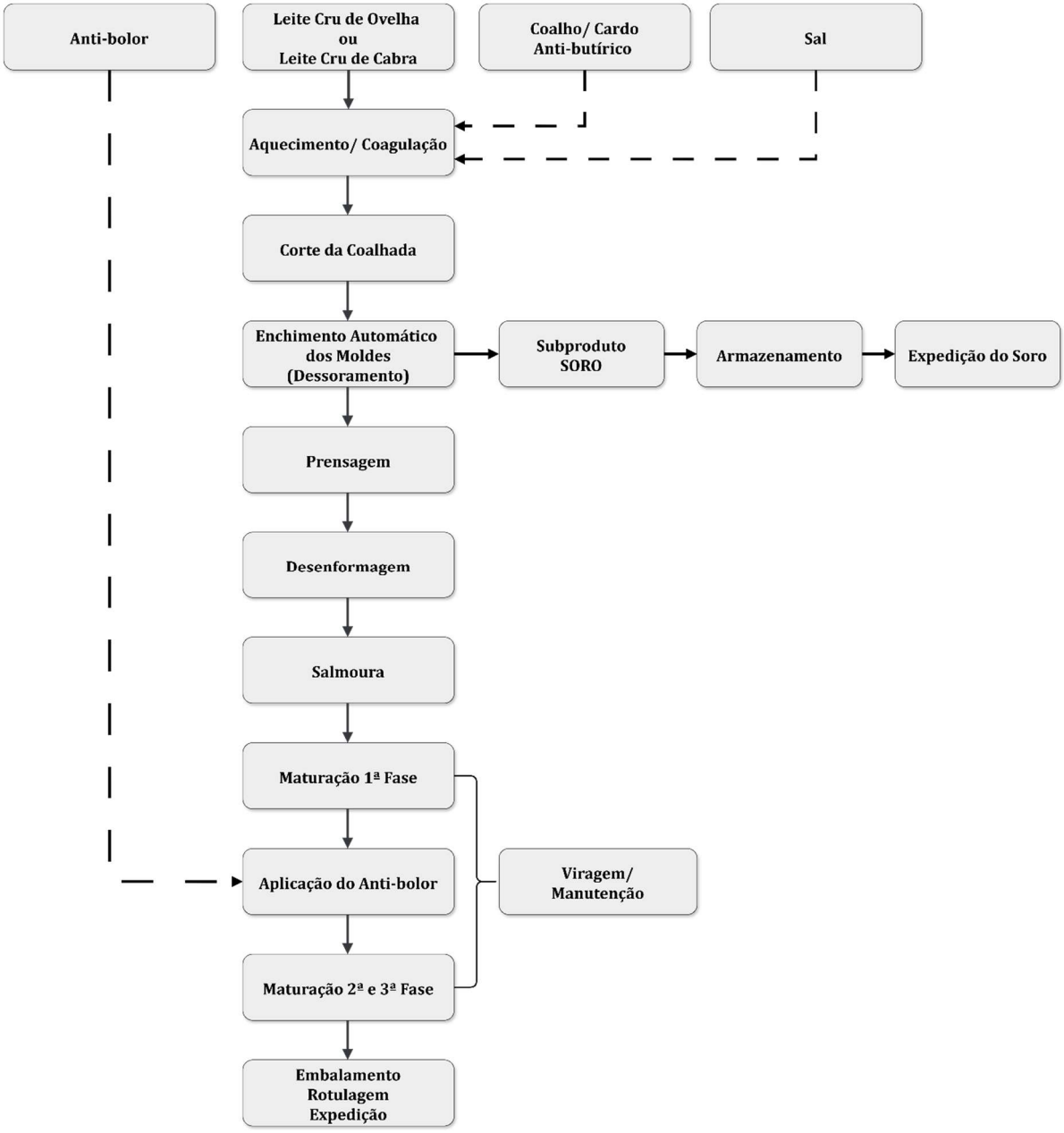


Figura 3 — Fluxograma de produção do queijo de ovelha curado. Este fluxograma apresenta a explicação da produção do queijo etapa a etapa assim como o encaminhamento do soro que é obtido como subproduto da produção.

4. Soro de Leite

O soro de leite é um subproduto líquido da indústria de produção de queijo, e resulta da separação da caseína do leite, ao fim de suceder a coagulação da mesma, processo conhecido como dessoramento da coalhada (Azedo, 2018). Do volume total de leite utilizado na produção de queijo, cerca de 80 a 90% é recolhido na forma de soro, e o mesmo contém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite nomeadamente a lactose, proteínas solúveis, matéria gorda, vitaminas e minerais (Gouveia, 2016).

A composição do soro está relacionada diretamente com o leite utilizado, nomeadamente com a espécie produtora do leite e a altura do ano, fatores que influenciam a composição do leite. Para além do mais, o tratamento a que o leite é sujeito durante o processo de produção do queijo como aquecimento, homogeneização e adição de alguns compostos necessários à elaboração do queijo, também podem influenciar a composição do soro. Por fim, todos os processos a que o soro pode ser sujeito após a sua separação da coalhada também podem influenciar as suas características (Cambóias, 2020).

4.1. Composição do Soro de Leite de Ovelha e do Soro de Leite de Cabra

As propriedades do soro dependem nomeadamente do leite utilizado na produção de queijo, como tal, o soro de ovelha e o soro de cabra apresentam algumas diferenças na sua constituição (Colmenares *et al*., 2023).

O soro de leite de ovelha é reconhecido por ter um teor proteico superior ao de cabra, o que vai de encontro ao facto de o leite de ovelha ter uma quantidade de proteína superior ao de cabra (Tabela 1). Do mesmo modo, o teor de gordura no soro de ovelha também é superior ao de cabra. É importante destacar que o teor de lactose do soro segue o mesmo padrão, relacionando-se com a quantidade de lactose do leite de ovelha ser superior (Tabela 2). Por outro lado, os valores de pH são inferiores no soro de leite de ovelha quando comparados com os valores do soro de leite de cabra, apesar de a diferença ser relativamente baixa entre ambos (Cambóias, 2020).

Tabela 1 – pH e composição nutricional do soro de leite de cabra e do soro de leite de ovelha, adaptado de Cambóias, 2020.

Parâmetros	Soro de Leite de Cabra	Soro de Leite de Ovelha
pH	5,4 – 6,2	5,3 – 5,9
Sólidos Totais (%)	6,8 – 7,8	9,5 – 10,5
Minerais (%)	0,7 – 0,8	1,2 – 1,8
Lactose (%)	3,8 – 4,2	4,3 – 6,1
Proteína (%)	0,8 – 1,0	1,6 – 1,8
Gordura (%)	0,5	1,7 – 2,5

Tabela 2 – Composição físico-química do leite de cabra e do leite de ovelha por 100 g de leite, adaptado de Cambóias, 2020.

Parâmetros	Leite de Cabra	Leite de Ovelha
Energia (cal)	67,0	107,7
Água (%)	87,5	80,4
Gordura (%)	3,8	7,6
Sólidos Não Gordos (%)	8,9	12,0
Lactose (%)	4,1	4,9
Proteína (%)	3,4	6,2
Cinza (%)	0,86	0,90

4.2. Soro de Leite e Alimentação Animal

O soro de leite é um dos principais subprodutos que resulta da produção de queijo, sendo um efluente altamente poluente. Por esse motivo, quando descartado no meio ambiente, sem tratamento prévio, tem diversos impactos ambientais severos. Assim sendo, diversos países membros da União Europeia adotaram legislação rigorosa de modo a controlar a eliminação correta deste subproduto da indústria agroalimentar (Guerreiro, 2018).

Os subprodutos da indústria agroalimentar têm sido cada vez mais utilizados na alimentação animal, tendo impactos positivos tanto para a saúde do animal assim como para a sustentabilidade ambiental. Desse modo, é reforçada a aplicação da economia circular na indústria agroalimentar (Sutera *et al*., 2023).

Ao longo de vários anos, o soro de leite foi utilizado na alimentação animal de suínos, ovinos e bovinos ou então aplicado como fertilizante no solo. Devido ao seu

elevado valor nutricional, ainda continua a ser considerado um bom suplemento que pode ser reinserido na cadeia leiteira para a alimentação animal (Ryan & Walsh, 2016).

O soro de leite é um subproduto que, como alimento para animais, fornece proteínas de elevada qualidade e lactose, juntamente com cálcio, fosforo, enxofre e vitaminas solúveis em água (Sutera *et al*., 2023). É importante ter em consideração que o excesso de determinados componentes do soro como a lactose e alguns minerais poderão causar efeitos prejudiciais aos animais. Como tal, é necessário estabelecer limites na quantidade de soro que pode ser disponibilizada para consumo a cada animal (Ryan & Walsh, 2016).

A utilização do soro de leite, a nível económico, tem diversos benefícios, nomeadamente a redução de custos associados ao tratamento do subproduto em estações de tratamento de águas residuais. Dessa forma, o soro como alimento para animais apresenta benefícios não só económicos como também ambientais (Palmieri *et al*., 2017).

Num estudo realizado por Palmieri *et al*. (2017) em que, numa dieta de vacas em lactação, se substituiu parcialmente a água potável dos animais por soro de leite, verificou-se que esta alimentação não teve alterações relativamente à produção de leite. Para além do mais, se o animal se encontrar num regime alimentar equilibrado, a ingestão do soro não iria afetar o peso, o desempenho reprodutivo, a saúde mamária e a atividade ruminal dos animais em lactação.

4.3. Regulamentação do Soro de Leite para Alimentação Animal

O soro de leite é um subproduto com elevado potencial para ser utilizado na alimentação animal. No seguimento disso, surgiram regulamentações por parte do Parlamento Europeu e da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

O Regulamento (CE) nº 1069/2009 define que produtos derivados de leite não destinados ao consumo humano, desde que sejam matérias de categoria 3, podem ser utilizados na alimentação animal, desde que cumpram determinadas características definidas nesse mesmo regulamento. As matérias de categoria 3 são subprodutos animais que apresentam um menor risco sanitário, o que significa que são considerados seguros para determinados usos, como por exemplo a alimentação de animais.

No âmbito da utilização de produtos derivados do leite para a utilização direta na alimentação de animais de criação, a DGAV emitiu o Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024. Neste esclarecimento técnico refere-se que “Soro de leite produzido a partir de produtos à base de leite não tratado termicamente, que foi recolhido pelo menos 16 horas após a coagulação do leite e cujo pH registado deve ser inferior a 6,0 antes de fornecer o soro de leite para alimentação animal.”.

Como tal, o soro de leite fornecido aos animais deve ter um pH inferior a 6,0. Assim sendo, é necessário proceder à acidificação do soro recorrendo a ácidos orgânicos seguros para a alimentação animal, como o ácido cítrico e o ácido láctico.

4.3.1. Normas de Trabalho e Plano HACCP

O sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) é uma das principais formas de controlar a segurança dos alimentos, tanto a nível da produção como do consumo dos alimentos. O HACCP tem por base 7 princípios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, incluindo a análise de perigos, determinação de pontos críticos de controlo (PCC), definição de limites críticos, monitorização, ações corretivas, verificação e registos documentados. Para além do mais, o sistema HACCP tem como objetivo identificar, avaliar e controlar os perigos que possam comprometer a segurança dos alimentos, tendo um ponto de vista preventivo em vez de corretivo (ISO 22000, 2018).

Para se compreender melhor como funciona o sistema HACCP é necessário abordar o que são os Pontos Críticos de Controlo (PPC). Os PCC são etapas detalhadas do processo de produção/ manipulação dos alimentos em que se podem aplicar medidas para prevenir, eliminar ou reduzir perigos específicos para níveis considerados aceitáveis. Por exemplo, o controlo de temperatura e tempo de pasteurização do leite cru para a produção de iogurtes é um PCC comum, pois impede o desenvolvimento de microrganismos patogénicos. A identificação de um PCC pode ser feita recorrendo a uma árvore de decisão, garantindo uma abordagem objetiva na prevenção dos riscos associados aos alimentos (Aslani *et al*., 2024).

De modo que a implementação do sistema HACCP seja considerada eficaz, tem de estar associada a programas de pré-requisitos (PPR). Os PPR permitem ter um ambiente higiénico adequado à manipulação segura de alimentos e bens alimentares, que podem ser destinados tanto à alimentação humana como animal. Os principais PRR são a limpeza e desinfeção, controlo de pragas, higiene pessoal, manutenção de equipamentos e formação dos trabalhadores. Para ser feita uma aplicação do HACCP de forma eficaz, estes requisitos devem ser cumpridos. A utilização de normas de trabalho facilita o trabalho dos operadores, orientando a execução das suas tarefas de forma segura e eficaz. Uma norma de trabalho bem delineada é um aliado fundamental no cumprimento tanto dos PPR como do sistema HACCP (Wallace *et al*., 2018).

5. Ácidos Orgânicos e Alimentação Animal

5.1. Ácido Cítrico

O ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) é um ácido orgânico com 3 constantes de dissociação a 25 °C de pK_1 = 3,14, pK_2 = 4,77 e pK_3 = 6,39. Pode ser reconhecido de diversas formas, nomeadamente a forma anidra, com uma coloração branca e a forma monoidratada que se apresenta como cristais incolores e transparentes (Ciriminna *et al*., 2017; Książek, 2024).

Este ácido orgânico tem uma elevada solubilidade em água (62,07% a 25 °C) (EFSA, 2015). Para além do mais, devido ao seu papel no ciclo de Krebs está presente em quase todos os organismos vivos. É um constituinte com concentrações elevadas nomeadamente em frutas cítricas (Książek, 2024).

A sua produção industrial é feita recorrendo principalmente ao fungo *Aspergillus niger*, que tem uma elevada capacidade produtiva. O ácido cítrico tem diversas utilizações sendo uma das mais relevantes a da indústria alimentar. Para além disso, o ácido cítrico tem sido cada vez mais estudado devido à sua versatilidade funcional (Ciriminna *et al*., 2017). De acordo com a União Europeia, o ácido cítrico é classificado como um aditivo alimentar (E330) (EFSA, 2015).

Quando este ácido é utilizado na alimentação animal, há um conjunto de especificações que devem ser cumpridas. Segundo o Regulamento de Execução (EU) 2022/415, o ácido cítrico utilizado na alimentação animal deve ter uma pureza igual ou superior a 99,5% (na matéria seca). Pode ser utilizada a forma anidra ou mono-hidratada, desde que o aditivo seja produzido por *Aspergillus niger* DSM 25794 ou *Aspergillus niger* CGMCC 4513/CGMCC 5751 ou *Aspergillus niger* CICC 40347/CGMCC 5343. Considerando todas as espécies animais, o limite para a utilização deste aditivo na alimentação animal é de 15 000 mg de aditivo por kg de alimento completo com um teor de humidade de 12%.

5.2. Ácido Láctico

O ácido láctico ($C_3H_6O_3$) é um ácido que apresenta atividade ótica, podendo ocorrer em duas formas enantioméricas: o L (+) -ácido láctico e o D (–) -ácido láctico (Martinez *et al*., 2013). As duas formas, de um ponto de vista físico-químico, apresentam propriedades semelhantes, como a solubilidade, densidade e o ponto de fusão, apresentando apenas diferenças quando reagem com outros compostos quiralmente ativos (Komesu *et al*., 2017).

O ácido láctico é utilizado na sua forma líquida, apresentando-se incolor ou ligeiramente amarelado e com uma textura viscosa, com uma elevada solubilidade em água. A nível industrial, é produzido recorrendo à fermentação das bactérias ácido

lácticas (LAB), sendo este o método mais utilizado para a obtenção do isómero L (+), que é a forma mais predominante na natureza (Ungvarsky, 2024).

Este ácido é muito utilizado a nível industrial, destacando-se a sua utilização como aditivo alimentar. Como tal, 70% da produção mundial do ácido láctico é destinado a esta indústria. É amplamente utilizado devido ao facto de ser um composto biodegradável e considerado seguro para o consumo humano (Komesu *et al*., 2017). De acordo com a União Europeia, o ácido láctico é classificado como um aditivo alimentar (E270) (FEEDAP, 2015).

À semelhança do que acontecia com o ácido cítrico, quando o ácido láctico é utilizado na alimentação animal há um conjunto de especificações que devem ser cumpridas. Segundo o Regulamento de Execução (EU) 2022/415, o ácido láctico utilizado na alimentação animal deve ter uma pureza igual ou superior a 72% (na forma líquida). A formulação correta do aditivo que pode ser utilizada deve ter uma percentagem inferior a 5% de ácido D-láctico e uma superior a 95% de ácido L-láctico. Para além do mais, deve ser produzido por fermentação por *Bacillus coagulans* (LMG S-26145 ou DSM 23965) ou *Bacillus smithii* (LMG S-27890) ou *Bacillus subtilis* (LMG S-27889). Considerando todas as espécies animais, o limite para a utilização deste aditivo na alimentação animal é de 20 000 mg de aditivo por kg de alimento completo com um teor de humidade de 12%. No caso de suínos e ruminantes com um rúmen funcional, este valor é de 50 000 mg.

6. Materiais e Métodos

6.1. Recolha das Amostras

As amostras de soro de leite foram recolhidas entre 11 de março e 27 de maio de 2025 (Tabela 3). Foram utilizados copos esterilizados de 100 mL para a recolha das diferentes amostras de soro de leite. Para aumentar a confiança das amostras recolhidas, tentou-se que a recolha fosse realizada sempre da mesma forma, que o soro fosse retirado sempre do mesmo local, mantendo a temperatura de recolha constante. Do mesmo modo, o transporte do soro de leite até ao laboratório de Nutrição Animal da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, foi realizado mantendo sempre as temperaturas de refrigeração adequadas, de modo a reduzir o efeito das variações de temperatura nos parâmetros analisados da amostra.

De modo a ser possível a utilização das amostras de soro de cabra, foi necessário congelar as mesmas, sendo somente descongeladas quando necessário. Isto deveu-se ao facto de a produção do queijo de cabra ocorrer nas sextas-feiras ao fim do dia, e o soro só poder ser analisado no laboratório segunda-feira. Uma vez que a produção só foi realizada de 15 em 15 dias, recolheu-se um menor número de amostras de soro de leite de cabra comparativamente ao número de amostras de soro de leite de ovelha.

Tabela 3 – Amostras de soro de leite recolhidas, tipo de soro e data de recolha.

Amostras	Tipo de Soro de Leite	Data da Recolha
OV1	Soro de Leite de Ovelha	11/03/2025
OV2		18/03/2025
OV3		25/03/2025
OV4		01/04/2025
OV5		08/04/2025
OV6		10/04/2025
OV7		14/04/2025
OV8		15/04/2025
OV9		28/04/2025
OV10		06/05/2025
OV11		12/05/2025
OV12		19/05/2025
CA1	Soro de Leite de Cabra	11/04/2025
CA2		11/04/2025
CA3		22/04/2025
CA4		22/04/2025
CA5		23/05/2025
CA6		23/05/2025

6.2. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos analisados foram o pH e acidez titulável, assim como a constituição do soro de leite em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos.

6.2.1. pH e Acidez Titulável

Para proceder à medição do pH assim como a acidez titulável para cada amostra recolhida foram realizadas 5 repetições.

A medição do pH foi realizada com o equipamento Table pH meter FiveEasy F20 standard, com uma sonda para amostras líquidas assim como uma sonda de temperatura. Devido ao facto de a temperatura influenciar as medições do pH, tentou-se que a temperatura das diversas amostras fosse semelhante, de modo a reduzir o erro quando se comparavam as amostras de diferentes dias (Barron *et al*., 2019).

A determinação da acidez titulável do soro de leite foi realizada de acordo com Norma Portuguesa "NP-470 (1983) - Leites. Determinação da acidez.". A acidez é expressa como os mililitros de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N necessário para neutralizar 1 litro da amostra. A titulação é realizada utilizando uma solução alcoólica de fenolftaleína a 0,2% (Tomovska *et al.*, 2016). Desse modo, para se obter a acidez titulável do soro de leite foram colocadas 6 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 0,2% em 10 mL de soro de leite. De seguida titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0,1 N até a viragem do indicador para a cor rosa-carmim característica que fosse persistente durante pelo menos 10 segundos.

A acidez titulável do soro de leite expressa-se em mL de solução de NaOH com 0,1 N por litro de leite. Assim sendo, a acidez titulável é obtida segundo a equação 1. Por outro lado, o resultado também pode ser expresso em °Dornic, utilizando a equação 2.

$$Acidez\ titulável\ = 10 \times V(NaOH) \quad (1)$$

$$Acidez\ titulável\ (°D) = 9 \times V(NaOH) \quad (2)$$

6.2.2. Composição Nutricional do Soro de Leite

A determinação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordos foi realizada utilizando o equipamento MilkoScan Mars® (FOSS, Dinamarca) programado para a medição do soro de leite.

O MilkoScan Mars é um equipamento que permite a análise de leite e produtos lácteos (natas e soro de leite), que tem por base no seu funcionamento a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Este equipamento foi desenvolvido para ser um sistema prático, acessível de ser utilizado na indústria, uma vez que permite uma quantificação rápida e simultânea de componentes essenciais do leite. As análises são realizadas no infravermelho médio, não sendo divulgado pelo fabricante os comprimentos de onda específicos que são utilizados (FOSS, 2025).

A metodologia usada no equipamento fundamenta-se na absorção seletiva de radiação infravermelha pelas ligações químicas especificas dos compostos orgânicos do leite. Os espetros que surgem dessa análise são analisados pelo software, permitindo a quantificação precisa de cada um dos constituintes. Para além do mais, o equipamento permite detetar adulterantes no leite como ureia, sacarose, formaldeído e nitrato de potássio (FOSS, 2015).

As amostras de soro de leite foram colocadas no banho-maria a cerca de 41 °C (Salomone-Caballero *et al*., 2024). Esta temperatura permite obter as condições físico-químicas ideias para a leitura da amostra, uma vez que, com o aumento da temperatura, a fluidez da amostra aumenta assim como a homogeneidade da gordura na amostra, neste caso, o soro de leite (Hlaváč *et al.,* 2014).

6.3. Influência dos Ácidos Orgânicos no pH do Soro de Leite

Para a avaliação da influência dos ácidos orgânicos, ácido cítrico (AC) e ácido láctico (AL), no pH do soro de leite de ovelha e cabra, foram realizados ensaios preliminares com concentrações que variaram entre 0-2%, no caso do AL e com concentrações que variaram entre 0-2%, 0-0,5% e por fim 0-0,1%, no caso do AC.

Foram realizadas as medições de pH e temperatura correspondente a cada amostra acidificada com uma determinada concentração de ácido. Estes testes permitiram afinar o intervalo de concentrações, permitindo assim obter o intervalo final utilizado no ensaio principal.

6.4. Avaliação da Influência da Temperatura e do Tempo na Acidificação de Soro de Leite

De modo a compreender-se melhor como iria ser a aplicação da acidificação a grande escala assim como se a temperatura influenciava a acidificação, foi simulado, com soro de leite de ovelha, a acidificação em 10 L de soro, utilizando a concentração que tinha sido definida nos ensaios como sendo a mais promissora para a acidificação atingir o pH pretendido. O soro foi acidificado com ácido cítrico a 30 °C (A) e a 4 °C (B), e foram recolhidas amostras no momento da acidificação (A1 e B1), ao fim de 1 hora da acidificação (A2 e B2) e ao fim de 24 horas (A3 e B3), tendo sido recolhidas também amostras de soro não acidificado que se encontravam nas mesmas condições de conservação, representados por X.

Do mesmo modo que foi realizado para o ácido cítrico, foi simulado, com soro de leite de ovelha e ácido láctico, a acidificação em 10 L de soro, utilizando a concentração que tinha sido definida nos ensaios como sendo a mais promissora para a acidificação atingir o pH pretendido. O soro foi acidificado a 30 °C (C) e a 4 °C (D), e foram recolhidas amostras no momento da acidificação (C1 e D1), ao fim de 1 hora da acidificação (C2 e D2) e ao fim de 24 horas (C3 e D3).

De cada amostra recolhida, foi determinado o pH e acidez titulável, em triplicado, assim como a composição do soro acidificado, recorrendo ao equipamento MilkoScan Mars® (FOSS, Dinamarca). Esta acidificação foi apenas realizada em soro de leite de ovelha, uma vez que a produção do queijo de cabra acontecia quando não era possível acompanhar a acidificação do soro durante 24 horas.

6.5. Caracterização Química por FTIR - ATR da Influência de Ácidos Orgânicos no Soro de Leite

A Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR-ATR) consiste na identificação de compostos com base na sua absorção de radiação infravermelha. Nesta técnica analítica, um feixe de radiação infravermelha incide sobre um cristal com um elevado índice de refração e sofre reflecções internas. A amostra é então colocada na superfície do cristal, onde a onda penetra superficialmente na amostra. Obtém-se o espetro infravermelho característico da amostra, uma vez que parte da energia é absorvida pelas ligações químicas presentes na amostra (Davies, 2025).

Para determinar os espetros dos soros de leite e ácidos orgânicos cítrico e láctico, foi utilizado um espetrómetro Bruker Alpha (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemanha) com um cristal de diamante. De cada amostra foram realizados 5 espetros, com 180 scans por espetro e uma resolução espetral de 8 cm^{-1} na gama de 375 a 4000 cm^{-1}. Para além do mais, foi realizado um background antes de ser efetuada a leitura das amostras, e os espetros foram recolhidos com uma temperatura ambiente padrão de 25 °C.

No total, foram analisadas 8 amostras, sendo elas o soro de leite de ovelha sem adição de ácido (OV), com a adição de ácido cítrico (OVAC) e com adição de ácido láctico (OVAL), repetindo-se o mesmo para as amostras de soro de leite de cabra (CA, CAAC, CAAL). Foram também realizados os espectros do ácido cítrico (AC) e láctico (AL) nas concentrações determinadas como as ideais para se obter um pH do soro de leite inferior a 6, sendo essa a mesma concentração de ácido que se encontrava nas amostras de soro de leite com ácido que foram utilizadas para a elaboração dos espetros.

6.6. Análise Estatística de Dados

O tratamento estatístico aplicado aos dados de acidificação em larga escala foi realizado por meio do software estatístico SPSS v.26.

Aplicou-se uma ANOVA de três fatores para avaliar os efeitos do tempo, do tipo de ácido e da temperatura sobre os valores de pH. Consideraram-se como fatores fixos o tempo (0, 1 e 24 horas), o ácido (cítrico e láctico) e a temperatura (4 °C e 30 °C), bem como suas interações.

Para a avaliação do impacto da acidificação no perfil de nutrientes do soro destinado à alimentação animal, utilizou-se uma ANOVA de uma via para comparar os teores de gordura, lactose, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos nos diferentes períodos (0, 1 e 24 horas).

A normalidade dos resíduos foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk ($W > 0,9$). Os resíduos foram inspecionados visualmente quanto à homogeneidade, de modo a assegurar o atendimento aos pressupostos da ANOVA. Consideraram-se significativos os resultados com $p < 0,05$.

7. Resultados e Discussão

7.1. Parâmetros Físico-Químicos

7.1.1. pH e Acidez Titulável

O pH do soro de leite de ovelha e do soro de leite de cabra apresentou valores muito semelhantes entre si, com um pH de cerca de 6,6 (Figura 4). Estes dados apresentam-se ligeiramente discrepantes da informação recolhida, uma vez que, como apresentado na Tabela 1, o valor máximo de pH encontrava-se associado ao soro de leite de cabra, com um pH de 6,2.

Mas como o soro de leite analisado é um soro doce, os valores determinados são suportados por isso, uma vez que o valor de pH do soro doce é de 5,8 a 6,6, o que vai de encontro ao obtido, com um pH a variar entre 6,4 e 6,6. As discrepâncias estarão associadas, nomeadamente ao processo produtivo do queijo, assim como ao leite utilizado, raça e altura do ano da ordenha (Kasapidou *et al*., 2023).

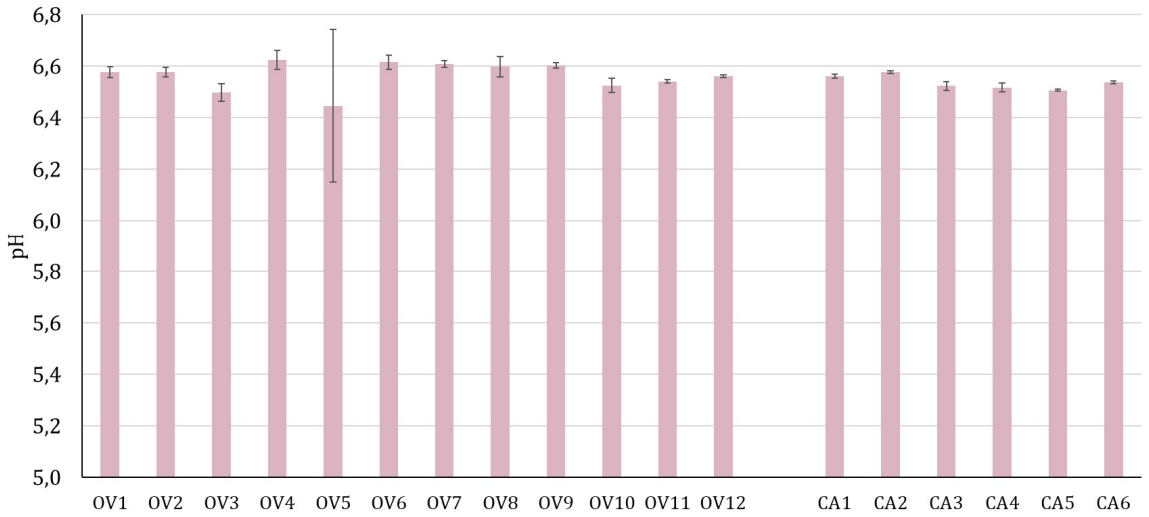


Figura 4 —pH das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) e do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas, com uma temperatura de 14,6 ± 1,6 °C.

O soro de leite analisado apresentou valores entre 10 e 13 °Dornic (Figura 5 e 6), sendo que o soro de leite de cabra apresentou valores ligeiramente inferiores, podendo isso ser devido às diferenças na composição de cada um dos soros de leite, assim como do próprio leite que originou o queijo. Como explicado anteriormente, a composição do leite, influencia a composição do soro, assim como os seus parâmetros físico-químicos, como a acidez titulável.

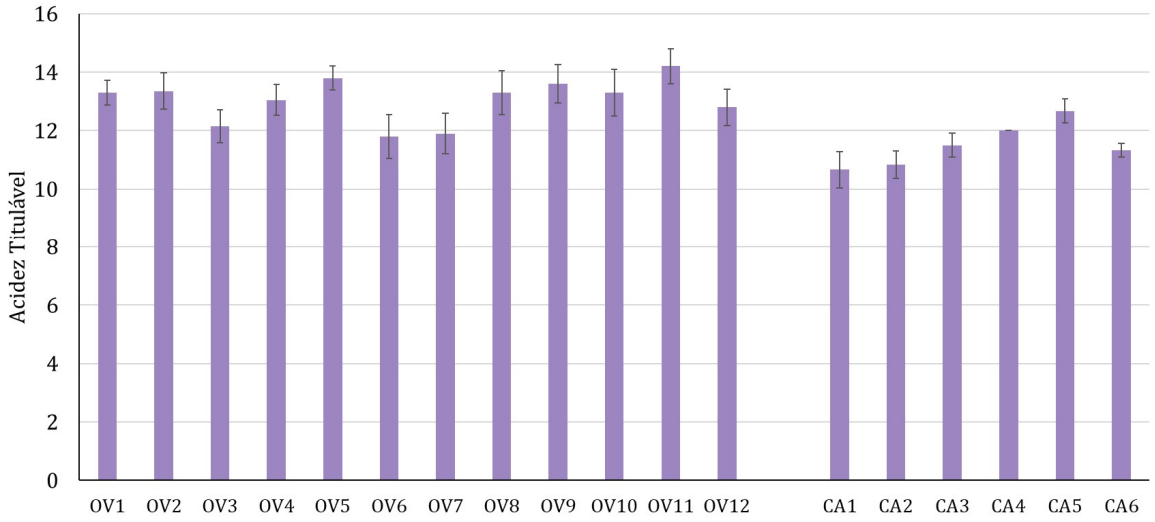


Figura 5 — Acidez titulável, parâmetro físico-químico do soro de leite expressa em mL NaOH com 0,1 N /L de soro de leite, das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) assim como do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas.

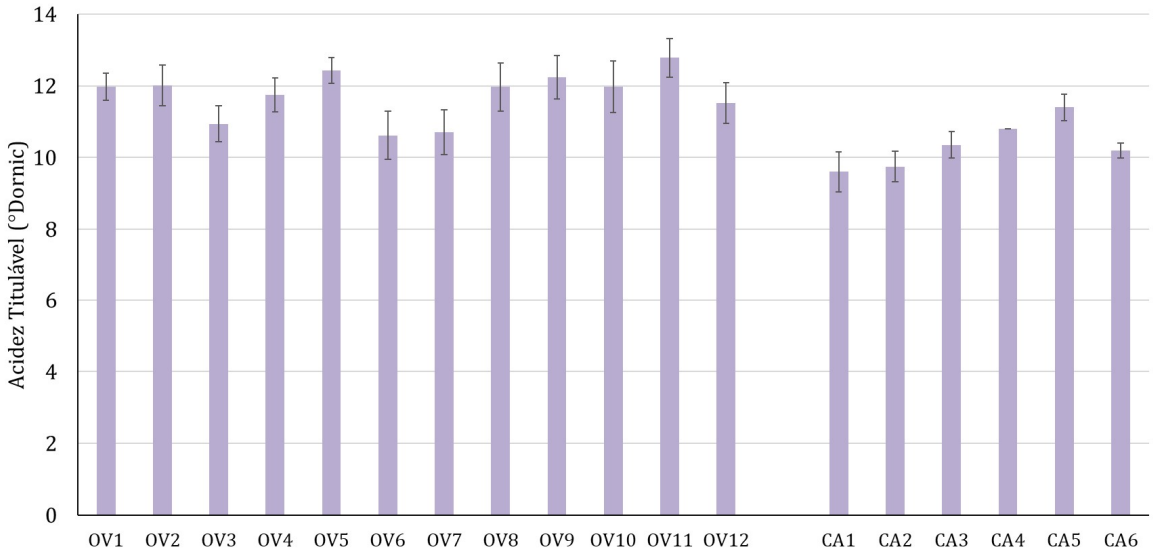


Figura 6 — Acidez titulável, parâmetro físico-químico do soro de leite expressa em °Dornic, das amostras de soro de leite de ovelha (OV1 a OV12) assim como do soro de leite de cabra (CA1 a CA6) analisadas.

Do mesmo modo a acidez do soro de leite obtida, expressa em °Dornic, esteve de acordo com o esperado. O soro de leite doce, como é o caso do soro de leite de ovelha e de cabra analisados, está caracterizado como tendo um valor entre 13 e 16 °Dornic (Smith *et al.,* 2016).

7.1.2. Composição Nutricional do Soro de Leite

A composição do soro de leite constituiu na análise dos parâmetros apresentados na Tabela 4, e foi analisado tanto o soro de leite de ovelha como o soro de leite de cabra. Ambos apresentaram valores muito semelhantes aos que caracterizavam cada um dos soros (Tabela 1).

Tabela 4 – Composição nutricional do soro de leite de ovelha e cabra realizada através do equipamento MilkoScan. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 18).

Componentes (%)	Soro de Leite de Ovelha	Soro de Leite de Ovelha com Ácido Cítrico (1) (2)	Soro de Leite de Ovelha com Ácido Láctico (1) (3)	Soro de Leite de Cabra (4)
Gordura	1,08 ± 0,12	0,87 ± 0,01	0,92 ± 0,02	1,10 ± 0,09
Lactose	4,76 ± 0,28	5,02 ± 0,06	5,04 ± 0,02	4,50 ± 0,13
Proteína	1,31 ± 0,08	1,26 ± 0,02	1,28 ± 0,01	1,00 ± 0,07
Sólidos Totais	8,63 ± 0,52	8,64 ± 0,08	8,66 ± 0,08	8,04 ± 0,27
Sólidos Não Gordos	7,55 ± 0,43	7,77± 0,07	7,74 ± 0,07	6,95 ± 0,20

(1) O soro de leite de ovelha com ácido cítrico e láctico utilizou-se n=3.
(2) Acidificado com ácido cítrico a 0,04%.
(3) Acidificado com ácido láctico a 0,075%.
(4) Para o soro de leite de cabra acidificado não se registou a composição nutricional.

Apenas a percentagem de gordura do soro de leite de cabra foi ligeiramente superior ao documentado (Cambóias, 2020), o que poderá estar relacionado com a época do ano em que foi recolhido o soro, uma vez que durante a primavera a produção é superior e a composição do leite apresenta um maior teor de gordura. Para além do mais, como foi analisado um menor número de amostras de soro de leite de cabra, estas poderão ser menos representativas das variações dos constituintes do soro de leite ao longo do período de recolha de amostras.

Quando se compara o soro de leite de ovelha com o de cabra, o primeiro apresenta uma maior percentagem de todos os componentes analisados, tirando a gordura, que se apresenta muito semelhante em ambos os soros de leite.

É importante destacar que o teor proteico do soro de ovelha se apresenta muito mais vantajoso, uma vez que este, quando se relaciona o soro com a alimentação animal, é o constituinte destacado como tendo uma elevada contribuição para o desenvolvimento do animal.

Cada constituinte do soro de leite, nomeadamente a proteína, lactose e gordura tem um conjunto de vantagens associadas à utilização do subproduto na alimentação animal. As proteínas presentes no soro de leite, fornecem os 9 aminoácidos essenciais

para a desenvolvimento dos animais. A lactose, naturalmente presente no soro de leite, está associada nomeadamente à obtenção de energia por parte do animal (Sangwan & Seth, 2021).

De um modo geral, a suplementação da dieta animal com soro de leite apresenta muitas vantagens, quer a nível da composição corporal como metabólico e de saúde do animal, tornando este subproduto um complemento importante na nutrição animal (Martelli *et al*., 2022).

7.2. Influência dos Ácidos Orgânicos no pH do Soro de Leite

7.2.1. Ácido Cítrico

Inicialmente foram realizados ensaios para determinar qual a concentração mais indicada de ácido (cítrico ou láctico) para se obter um pH do soro de leite inferior a 6. Desse modo, foram elaborados 4 gráficos que relacionaram a concentração de ácido (%) com o pH obtido no soro de leite.

Para a acidificação do soro de leite de ovelha com ácido cítrico, determinou-se que a concentração ideal para o pH do soro de leite ser inferior a 6, era de 0,04% de ácido cítrico (Figura 7).

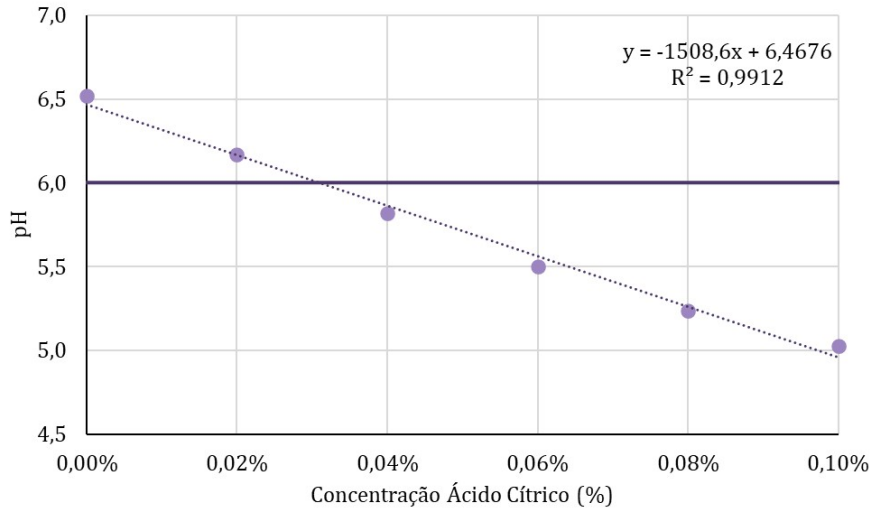


Figura 7 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido cítrico, em percentagem, com o pH do soro de leite de ovelha.

Como o coeficiente de determinação (R^2=0,9912), é muito próximo de 1, esta concentração de ácido tem a garantia de diminuir o pH para os valores pretendidos. Do mesmo modo, a acidificação do soro de leite de cabra com ácido cítrico, a concentração de ácido ideal foi de 0,04%, apresentando também um coeficiente de determinação entre a concentração do ácido e o pH do soro muito elevado (Figura 8).

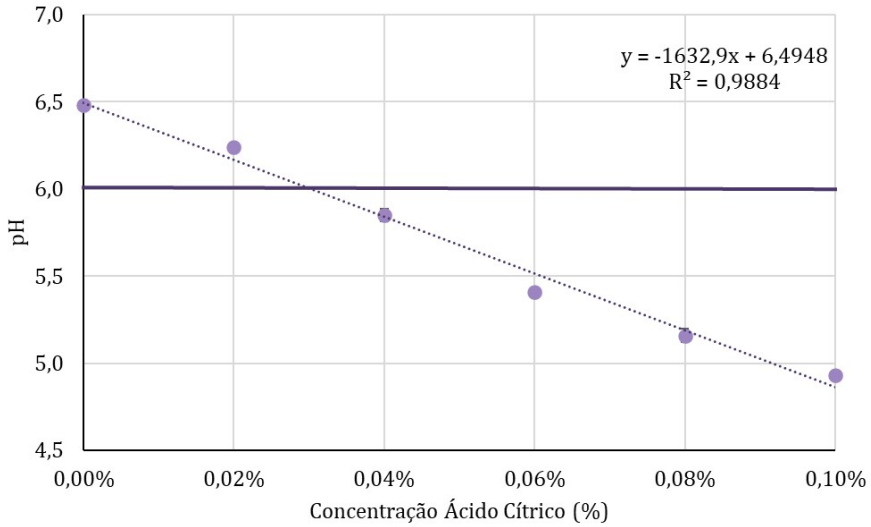


Figura 8 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido cítrico, em percentagem, com o pH do soro de leite de cabra.

7.2.2. Ácido Láctico

Por outro lado, para acidificação do soro de leite de ovelha com ácido láctico, determinou-se que a concentração ideal seria de 0,075%, com um coeficiente de determinação também muito elevada (Figura 9). Mas, contrariamente ao que aconteceu com a acidificação com ácido cítrico, a concentração de ácido para acidificar o soro de leite de ovelha e o soro de leite de cabra, para um pH inferior a 6, foi diferente.

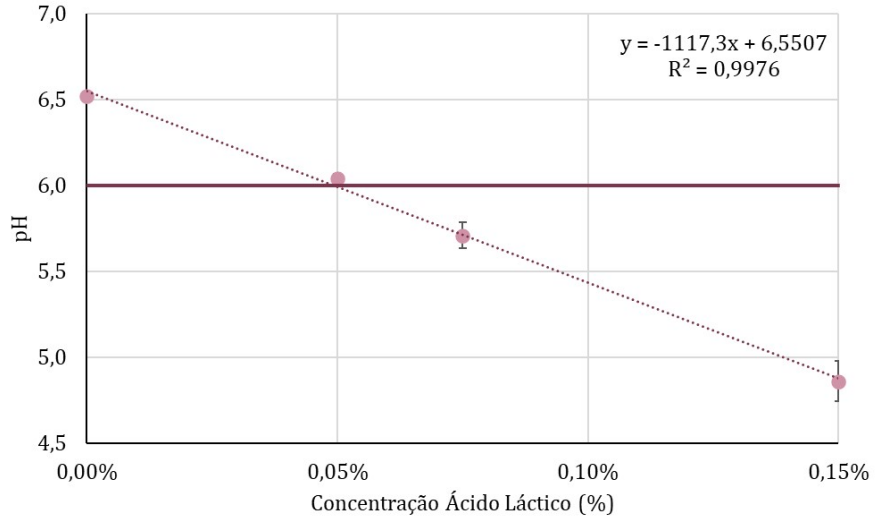


Figura 9 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido láctico, em percentagem, com o pH do soro de leite de ovelha.

Para o soro de leite de cabra, foi necessária uma concentração de 0,05% para diminuir o pH para 5,83, e o coeficiente de determinação foi inferior aos dos restantes conjuntos de dados (Figura 10).

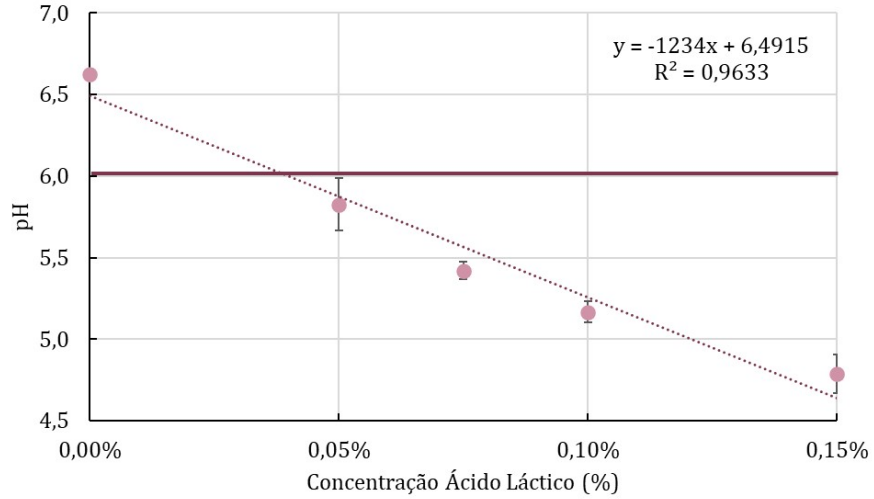


Figura 10 — Gráfico de dispersão que relaciona a concentração de ácido láctico, em percentagem, com o pH do soro de leite de cabra.

7.3. Avaliação da Influência da Temperatura e do Tempo na Acidificação de Soro de Leite

De modo a ser possível compreender melhor como funcionaria a acidificação em grande escala, foi feita a acidificação de soro de leite de ovelha, com ácido cítrico 0,04% e ácido láctico 0,075%. Foram realizadas medições de pH às 0 horas, 1 hora e 24 horas após a coagulação do leite. Para além do mais, foi realizado o tratamento estatístico de análise de variâncias ANOVA trifatorial, que permitiu obter os limites inferiores e limites superiores de cada conjunto de dados, com um intervalo de confiança de 95% (Tabela 1, Anexo IV).

Como se pode observar na Figura 11, a acidificação com ácido cítrico (AC) é aquela que permite obter valores de pH mais baixos, quando comparado com a acidificação com ácido láctico (AL).

A acidificação com ácido cítrico a 4 °C, permitiu obter valores de pH inferiores à acidificação com ácido cítrico a 30 °C, sendo também aquela que manteve os valores de pH mais estáveis ao longo do tempo. Apesar disso, a acidificação com ácido cítrico a 30° C também apresentou bons resultados, com um pH inferior a 5,95.

Por outro lado, a acidificação com ácido láctico a 30 °C apresentou valores de pH ligeiramente superiores à acidificação com ácido cítrico. A acidificação com ácido láctico a 4 °C revelou ser aquela com resultados menos vantajosos apresentados,

inicialmente com um pH superior a 6. Para além disso, existiram muitas alterações nos valores de pH ao longo das 24 horas em que foram realizadas as medições.

Desse modo, é possível concluir que o método ideal para a acidificação do soro de leite de ovelha, é a utilização do ácido cítrico com uma concentração de 0,04%, sendo a acidificação realizada a 4 °C, garantindo assim um pH inferior a 5,90, mesmo passadas 24 horas desde o momento da acidificação, com 95% de confiança.

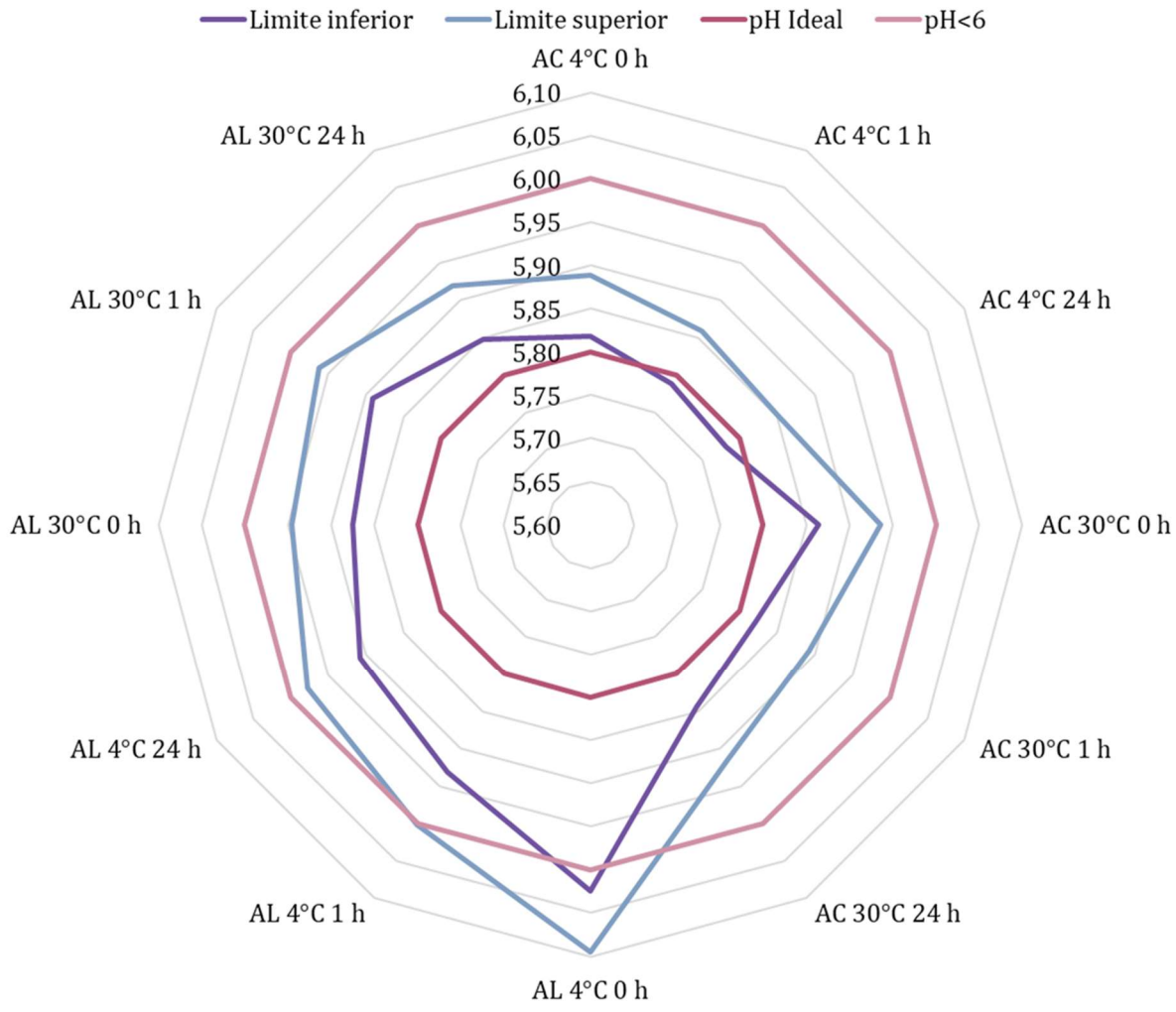


Figura 11 — Gráfico de teia com a evolução do pH do soro de leite de ovelha acidificado com ácido cítrico (AC) e ácido láctico (AL), a diferentes temperaturas (4 °C e 30 °C) ao longo do tempo (0 horas, 1 hora e 24 horas).

De modo a compreender como a acidificação com os diferentes ácidos e temperaturas afetam a composição nutricional do soro de leite, foi feita uma análise do mesmo. Os resultados foram agrupados: acidificação com ácido cítrico a 30 °C e 4 °C (Figura 12) e acidificação com ácido láctico a 30 °C e 4 °C (Figura 13). Com esses resultados verificou-se que existiram diferenças entre as amostras de soro de leite acidificadas e as amostras de soro de leite que não sofreram acidificação.

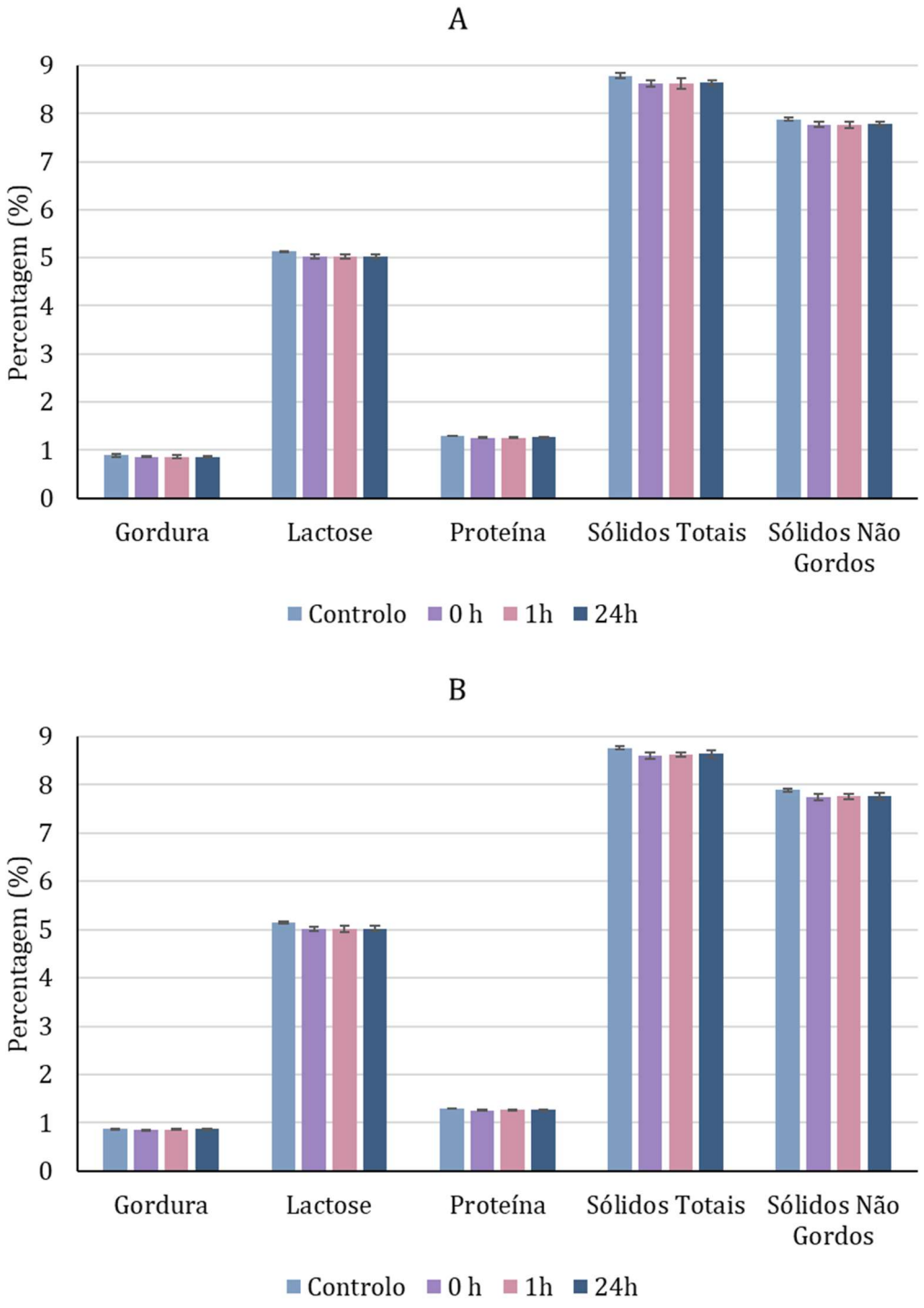


Figura 12 — Efeito da acidificação com ácido cítrico na composição nutricional do soro de leite de ovelha. (A) Acidificação de o soro de leite de ovelha a 30 ºC (B) Acidificação de o soro de leite de ovelha a 4 ºC. Referente ao tempo decorrido desde a acidificação (0, 1 e 24 horas), sendo o controlo o soro de leite de ovelha não acidificado.

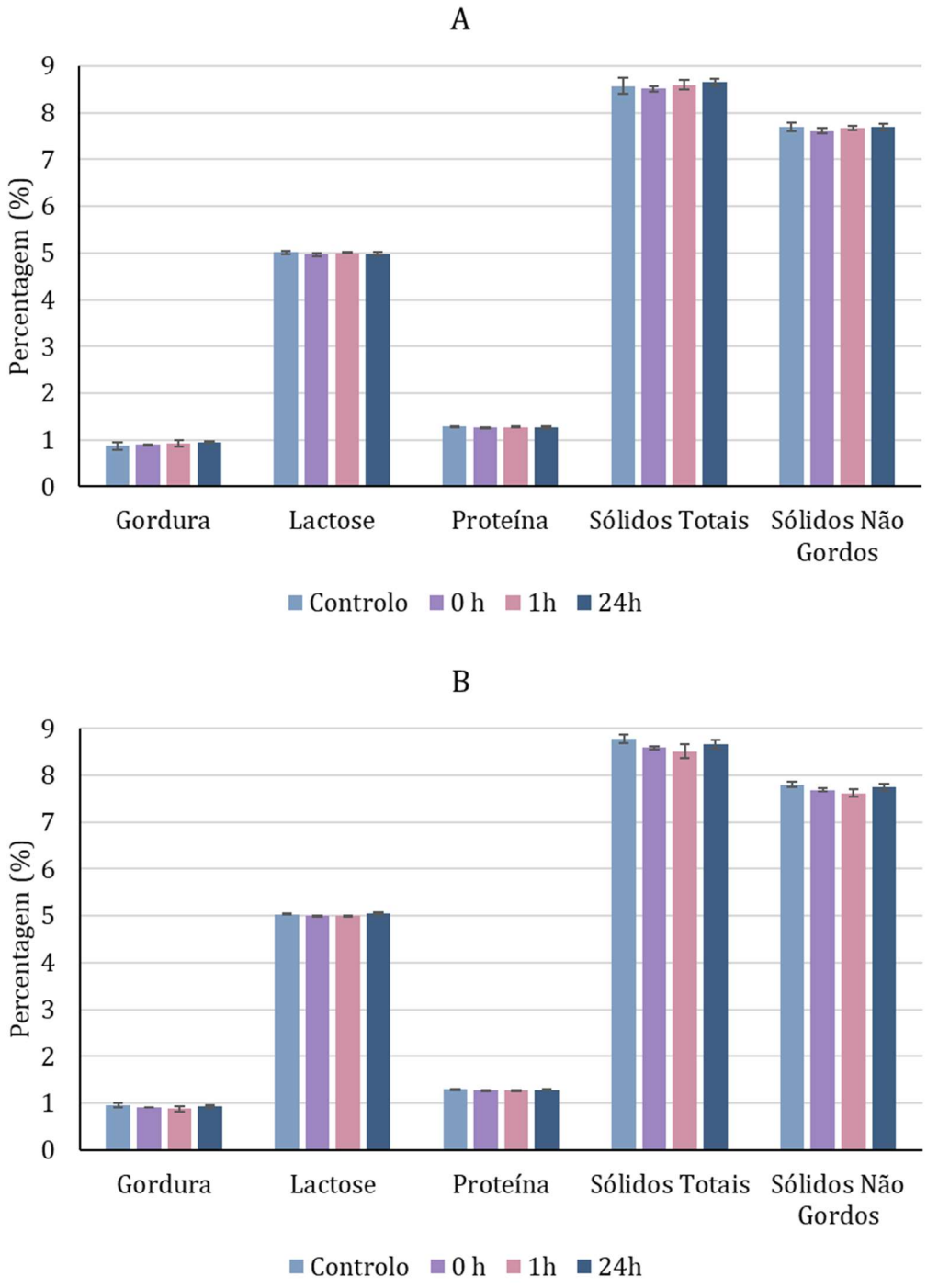


Figura 13 — Efeito da acidificação com ácido láctico na composição nutricional do soro de leite de ovelha. (A) Acidificação de o soro de leite de ovelha a 30 ºC; (B) Acidificação de o soro de leite de ovelha a 4 ºC. Referente ao tempo decorrido desde a acidificação (0, 1 e 24 horas), sendo o controlo o soro de leite de ovelha não acidificado.

O parâmetro em que se observa uma maior discrepância entre o soro de leite acidificado e não acidificado, é o teor proteico. O soro de leite acidificado, independentemente da combinação entre o ácido orgânico e a temperatura de acidificação, apresentou um teor de proteína menor, sendo isso evidente em todos os

métodos de acidificação, nomeadamente quando a mesma acontecia às 0 horas. A acidificação direta com um ácido orgânico está documentada como tendo impactos negativos na estrutura química das proteínas, alterando as suas estruturas assim como propriedades químicas (Yang *et al*., 2021). Os resultados obtidos, de discrepâncias nos valores proteicos de soro de leite acidificado, comprovam que mesmo com baixas concentrações de ácidos orgânicos há alterações no teor proteico, devido à acidificação.

Do mesmo modo que a proteína, o hidrato de carbono maioritário, a lactose, também apresentou valores menores no soro de leite acidificado. A acidificação com ácidos orgânicos impacta as ligações químicas da lactose (Wijayasinghe *et al*., 2019). Mesmo com as concentrações reduzidas de ácido cítrico e láctico, existiram alterações no teor de lactose do soro de leite acidificado. Apesar de tudo, com a adição de ácido láctico, existe uma menor discrepância nos valores de lactose.

Ao longo das 24 horas em que se realizaram medições destes parâmetros, verificou-se que no soro de leite acidificado com ácido cítrico os valores foram mais constantes ao longo do tempo. A acidificação com ácido láctico originou valores menos estáveis e com maiores diferenças entre a acidificação a 30 °C, a acidificação a 4 °C e o controlo.

A adição de ácido, independentemente do ácido orgânico utilizado e a temperatura em que é adicionado, revela alterações nos parâmetros nutricionais do soro de leite, impactando assim o valor nutricional deste subproduto.

A acidificação com ácido cítrico, com a concentração de 0,04%, permitiu obter valores mais consistentes tanto de pH como dos parâmetros nutricionais analisados. Em termos de pH a acidificação com o ácido cítrico, quando o soro de leite se encontrava a 4 °C, permitiu obter melhores resultados. Relacionando com o perfil nutricional, tanto a acidificação a 30 °C como a 4 °C, apresentaram alterações no perfil do soro de leite. Como tal, aquela combinação que permite obter melhores resultados com estas duas variáveis em consideração, é a acidificação do soro de leite a 4 °C com ácido cítrico.

7.4. Caracterização Química com FTIR - ATR da Influência de Ácidos Orgânicos no Soro de Leite

De forma a perceber potenciais alterações químicas no soro de leite de cabra e de ovelha, após a acidificação com os ácidos orgânicos em estudo, foi realizada a caraterização química com FTIR-ATR. Nas figuras 14 e 15 observam-se os espetros relativos ao soro de leite de cabra e de ovelha respetivamente.

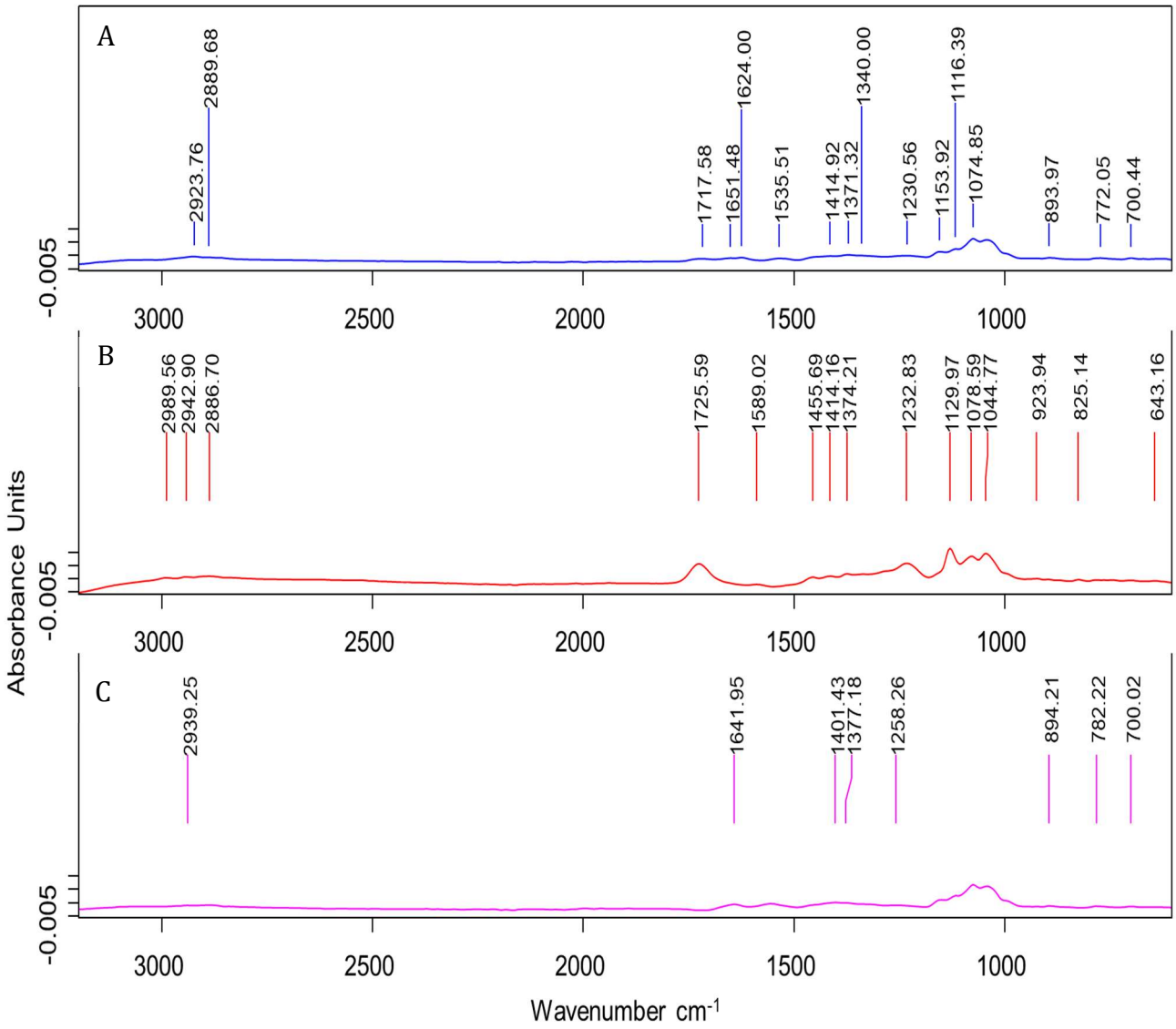


Figura 14 — Espectros de FTIR-ATR do soro de leite de cabra nas diferentes condições experimentais.
(A) Soro de leite acidificado com ácido cítrico a 0,04%;
(B) Soro de leite acidificado com ácido láctico a 0,075%;
(C) Soro de leite sem acidificação (controlo).
As principais bandas de absorção estão indicadas nos respetivos espectros, evidenciando as diferenças na composição química em função do tipo de acidificação.

A análise dos espectros de FTIR-ATR permitiu identificar diferenças significativas na composição química do soro de leite de cabra e de ovelha em função do tipo de acidificação.

No caso do soro de leite de cabra (Figura 14), a acidificação com ácido cítrico (0,04%) resultou em alterações mais evidentes na região de 1000–1200 cm^{-1}, atribuída principalmente a vibrações de deformação das ligações C–O de hidratos de carbono (lactose) e grupos fosfato. Essas modificações sugerem uma interação mais forte do ácido cítrico com os constituintes minerais e açúcares do soro de leite. Por

outro lado, o ácido láctico (0,075%) promoveu alterações mais pronunciadas nas regiões de amida I (≈1650 cm^{-1}) e amida II (≈1540 cm^{-1}), que estão diretamente relacionadas à estrutura secundária das proteínas. Isto indica que a acidificação láctica afeta sobretudo as interações proteicas, possivelmente favorecendo a desnaturação parcial ou modificações conformacionais.

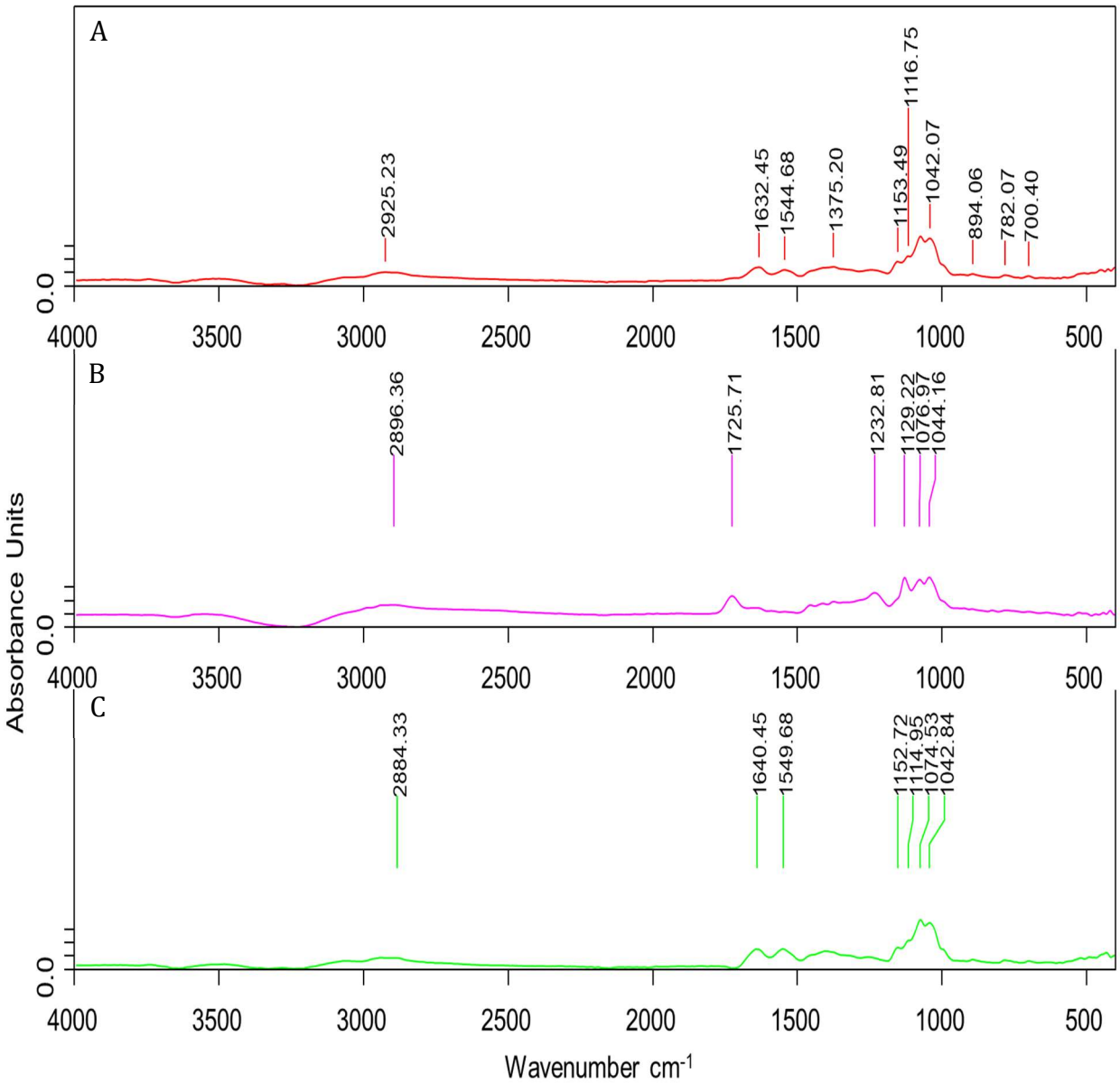


Figura 15 — Espectros de FTIR-ATR do soro de leite de ovelha nas diferentes condições experimentais.
(A) Soro de leite acidificado com ácido cítrico a 0,04%;
(B) Soro de leite acidificado com ácido láctico a 0,075%;
(C) Soro de leite sem acidificação (controlo).
As principais bandas de absorção estão indicadas nos respetivos espectros, evidenciando as diferenças na composição química em função do tipo de acidificação.

No soro de leite de ovelha, observaram-se tendências semelhantes, mas com intensidade diferente (Figura 15). O ácido cítrico também promoveu mudanças marcantes na região dos hidratos de carbono/fosfatos, enquanto o ácido láctico apresentou impacto predominante sobre as bandas proteicas. No entanto, a amplitude das variações foi mais acentuada no soro de leite de ovelha do que no de cabra, sugerindo diferenças intrínsecas na composição inicial do soro de leite de ambas as espécies. Esta resposta diferencial pode estar associada ao maior teor de proteína e de minerais do leite de ovelha, o que o torna mais suscetível a alterações estruturais em condições de acidificação.

Em ambas as espécies, o soro de leite controlo (sem acidificação) apresentou espectros mais estáveis, refletindo a composição nativa do soro de leite. As comparações evidenciam que o processo de acidificação não reduz apenas o pH, mas também desencadeia mudanças específicas na estrutura química, que variam de acordo com o tipo de ácido utilizado e com a matriz láctea em análise. De forma geral, os resultados demonstram que a natureza do ácido influencia de forma distinta a composição química do soro de leite; que o ácido cítrico tende a interagir mais com a lactose e sais minerais e que o ácido láctico afeta preferencialmente as proteínas.

A espécie animal (cabra vs. ovelha) condiciona a magnitude dessas alterações, com o soro de leite de ovelha apresentando mudanças mais expressivas devido à sua composição inicial mais rica em sólidos (Tabela 4).

Essas diferenças têm implicações tecnológicas relevantes, sobretudo na utilização do soro de leite como ingrediente funcional ou como subproduto em processos industriais, onde a escolha do agente acidificante pode direcionar características físico-químicas distintas no produto final.

A análise dos espectros de FTIR demonstra que a acidificação do soro de leite de cabra, sobretudo com ácido cítrico, provocou redução nas bandas amida I, II e III, indicando desnaturação e precipitação proteica. Pequenas alterações nas bandas de C–H sugerem mudanças discretas na fração lipídica, enquanto as bandas da lactose permaneceram praticamente inalteradas. Estes resultados estão em concordância com os resultados apresentados na Tabela 5, que relaciona as principais regiões espectrais com os constituintes nutricionais do soro de leite, evidenciando que o principal efeito da acidificação foi sobre a fração proteica, com impacto mínimo sobre gordura e lactose.

Tabela 5 — Alterações nos principais nutrientes do soro de leite de cabra e de ovelha em função do tipo de acidificação.

Tipo de Soro	Condição (ácido)	Alterações na Proteínas	Alterações na Lactose	Alterações na Gordura
Cabra	Controlo (sem ácido)	Estrutura proteica estável (bandas amida I e II bem definidas)	Perfil estável	Perfil estável
	Ácido cítrico (0,04%)	Alterações discretas nas proteínas; possível desnaturação parcial	Alterações evidentes nas bandas de 1000–1200 cm^{-1} (hidratos de carbono /fosfatos)	Alterações pouco significativas
	Ácido láctico (0,075%)	Alterações marcantes em amida I e II (desnaturação e modificação conformacional)	Menor impacto que o cítrico	Alterações pouco significativas
Ovelha	Controlo (sem ácido)	Estrutura proteica estável, mas mais intensa devido ao maior teor proteico	Perfil estável	Perfil estável
	Ácido cítrico (0,04%)	Alterações moderadas nas proteínas	Alterações acentuadas na região 1000–1200 cm^{-1} (maior que no soro de leite de cabra)	Alterações pouco significativas
	Ácido láctico (0,075%)	Alterações marcantes em amida I e II (forte desnaturação proteica, mais evidente que no soro de cabra)	Alterações moderadas	Alterações pouco significativas

A análise dos espectros de FTIR-ATR apresentados para o soro de leite de cabra e de ovelha (Figuras 14 e 15) demonstrou que o tipo de acidificação promove alterações distintas nos constituintes do soro de leite, com destaque para as regiões correspondentes às proteínas (amida I e II) e à lactose (1000–1200 cm^{-1}). Enquanto o ácido láctico evidenciou maior impacto sobre as proteínas, o ácido cítrico destacou-se pela sua capacidade de interagir com a fração dos hidratos de carbono e sais minerais, sem comprometer significativamente a estabilidade proteica.

Este efeito do ácido cítrico é particularmente relevante do ponto de vista da alimentação animal, pois a sua utilização favorece a preservação da fração proteica – essencial para o valor nutricional – ao mesmo tempo que melhora a disponibilidade de minerais e hidratos de carbono, importantes para a digestibilidade e o metabolismo energético. Além disso, o ácido cítrico é amplamente reconhecido como aditivo seguro e funcional na dieta de pequenos ruminantes e suínos, onde atua como acidificante

natural capaz de modular o pH intestinal, melhorar a absorção de nutrientes e contribuir para o equilíbrio da microbiota.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a acidificação com ácido cítrico representa uma estratégia tecnológica vantajosa para valorizar o soro de leite como ingrediente na formulação de rações, maximizando a sua utilização em cadeias produtivas de pequenos ruminantes e suínos, respeitando o Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024.

8. Norma de Trabalho

De modo a ser possível realizar a acidificação do soro de leite, como foi referido anteriormente, é necessário a elaboração de uma norma de trabalho. O objetivo da utilização destas normas é facilitar o trabalho dos operadores, orientando de forma clara como devem proceder para a acidificação do soro, executando esta tarefa de forma segura.

A norma de trabalho elaborada (Anexo I) descreve o objetivo e o âmbito da elaboração da mesma, relacionando-se com a necessidade de ter um pH do soro de leite inferior a 6, conforme descrito no Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024. Do mesmo modo, explica-se de forma sucinta como deverá o operador proceder para a acidificação do soro, referindo também as características que o ácido cítrico tem de cumprir para estar de acordo com o Regulamento de Execução (EU) 2022/415. Por fim, é feita uma pequena descrição da metodologia e o equipamento necessário para o cumprimento da mesma.

O plano HACCP contempla a necessidade de realizar registos. Como tal, associada a norma de trabalho, é disponibilizada uma folha de registos (Anexo II) de modo a facilitar o controlo do processo de acidificação de cada vez que é realizado. Para facilitar o trabalho dos operadores que necessitarem de colocar a norma em prática, elaborou-se um fluxograma (Anexo III) que explica como o operador deverá proceder e como poderá calcular a quantidade de ácido cítrico a ser usado na acidificação.

Com o conjunto destes documentos é possível colocar em prática os conhecimentos desenvolvidos ao longo deste trabalho, permitindo assim assegurar a imposição feita pelo Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024. Com a adição da solução de ácido cítrico a 10% ao soro de leite que se pretende acidificar (para garantir a concentração final de ácido cítrico de 0,04%), cumprindo o descrito, é assegurado que o soro de leite tenha um pH inferior a 6, e desse modo poderá ser administrado na alimentação animal.

9. Conclusão

A caracterização físico-química do soro de leite de cabra e de ovelha revelou valores de pH (6,4–6,6) e acidez (10–13 °D) compatíveis com o soro doce, sendo o soro de leite de ovelha mais rico em sólidos que o de cabra, à exceção da gordura.

Na acidificação, o ácido cítrico (0,04%) mostrou-se mais eficiente que o ácido láctico, permitindo reduzir o pH para valores inferiores a 6 em ambas as espécies, com maior estabilidade quando aplicado a 4 °C. Este tratamento destacou-se como a melhor combinação, garantindo um pH estável (<5,90 durante 24 h, com 95% de confiança) e menor variabilidade ao longo do tempo.

A composição nutricional foi afetada pela acidificação, verificando-se redução no teor de proteína e lactose em comparação com o controlo, sendo os efeitos mais consistentes com o ácido cítrico.

Os resultados de FTIR-ATR reforçam estas observações, evidenciando que o ácido cítrico interage preferencialmente com hidratos de carbono e sais minerais (1000–1200 cm^{-1}), preservando em maior grau a fração proteica. Já o ácido láctico afeta principalmente as proteínas (bandas amida I e II), promovendo alterações estruturais mais marcadas.

Em síntese, a acidificação com ácido cítrico (0,04% a 4 °C) representa a estratégia mais promissora, assegurando maior estabilidade físico-química, melhor preservação nutricional e alterações mais controladas na composição química, o que reforça o seu potencial de aplicação, inclusive na valorização do soro de leite como ingrediente para a alimentação animal, sobretudo de pequenos ruminantes e suínos.

10. Referências

Aponte Colmenares, A. P., Prieto Suárez, G. A., Castellanos Báez, Y. T., Muvdi Nova, C. de J., & Yurievich Sakharov, I. (2023). Review. Aplicaciones del lactosuero y sus derivados proteínicos. *Ciencia En Desarrollo*, *14*(2), 139–155. https://doi.org/10.19053/01217488.v14.n2.2023.15002

Aslani, R., Mazaheri, Y., Jafari, M., Sadighara, P., Molaee-Aghaee, E., Ozcakmak, S., & Reshadat, Z. (2024). Implementation of hazard analysis and critical control point (HACCP) in yogurt production. In *Journal of Dairy Research* (Vol. 91, Issue 1, pp. 125–135). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/S0022029924000232

Barron, J. J., Ashton, C., & Geary, L. (2019). *The Effects of Temperature on PH Measurement A REAGECON TECHNICAL PAPER*. www.reagecon.com acedido em: 23/06/2025.

Cambóias, E. de J. R. (2020). *Valorização de Soro de Cabra e Sorelho de Ovelha Avaliação Técnica/Económica de uma Instalação de Membranas*. [Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Politécnico de Beja].

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 70–83). https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007

Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. In *Chemistry Central Journal* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y

Comissão Europeia. (2022). *Regulamento de Execução (UE) 2022/415 da comissão de 11 de março de 2022*. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2022/415/oj/por

Cristina da Silva Guerreiro, R. (2018). *Tratamento de águas residuais provenientes de queijarias por processos físico-químicos combinados.* [Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Instituto Superior Técnico].

Davies, A. (2025). *Everything You Need to Know About ATR-FTIR Spectroscopy*. Specac. https://specac.com/everything-you-need-to-know-about-atr-ftir-spectroscopy/ acedido em: 16/07/2025.

DGADR. (2025). *Queijo da Beira Baixa DOP-Caderno de Especificações*. https://www.qualificaportugal.pt/wpcontent/uploads/2024/05/CE_Queijo_BB.pdf acedido em: 26/07/2025.

DGAV. (2024). *Fornecimento e utilização de Subprodutos de Leite*. www.dgav.pt

EFSA. (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of citric acid when used as a technological additive (acidity regulator) for all animal species. *EFSA Journal*, *13*(2). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4010

European Commission (2023). *Milk Market Observatory - Milk collection and dairy products obtained-Production and utilization of milk on the farm Annual Production Series of Dairy products*. https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2023-10/eu-dairy-historical-production-stocks-series_en.pdf acedido em: 28/07/2025

FEEDAP. (2015). Safety and efficacy of lactic acid and calcium lactate when used as technological additives for all animal species. *EFSA Journal*, *13*(12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4198

FOSS. (2015). *MilkoScan TM Mars 0 primeiro MilkoScan para todos*. https://www.fossanalytics.com/es-es acedido em 26/07/2025

FOSS. (2025). *MilkoScan™ Mars*. https://www.Fossanalytics.Com/Products/Milkoscan-Mars acedido em: 26/07/2025

Gouveia, L. R. F. (2016). *Produtos lácteos fermentados à base de soro de leite de ovino*. [Relatório de Estágio Profissionalizante, Engenharia Alimentar, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária].

Hlaváč, P., & Božiková, M. (2014). Effect of Temperature on Dynamic Viscosity and Activation Energy of Milk and Acidophilus Milk. *Advanced Materials Research*, *1059*, 53–59. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1059.53

José Azedo, D. (2018). *Integração de processos de separação por membranas na valorização do soro de cabra. Aplicação de métodos de ultrafiltração e nanofiltração em modo de recirculação total, concentração e diafiltração*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Politécnico de Beja.

Julijana Tomovska, Nikola Gjorgievski, & Borche Makarijoski. (2016). Examination of pH, Titratable Acidity and Antioxidant Activity in Fermented Milk. *Journal of Materials Science and Engineering A*, *6*(6). https://doi.org/10.17265/2161-6213/2016.11-12.006

Kasapidou, E., Stergioudi, R. A., Papadopoulos, V., Mitlianga, P., Papatzimos, G., Karatzia, M. A., Amanatidis, M., Tortoka, V., Tsiftsi, E., Aggou, A., & Basdagianni, Z. (2023). Effect of Farming System and Season on Proximate Composition, Fatty Acid Profile, Antioxidant Activity, and Physicochemical Properties of Retail Cow Milk. *Animals*, *13*(23). https://doi.org/10.3390/ani13233637

Komesu, A., Allan Rocha de Oliveira, J., Helena da Silva Martins, L., Regina Wolf Maciel, M., & Maciel Filho, R. (2017). Lactic acid manufacture. In *BioResources* (Vol. 12, Issue 2). http://dx.doi.org/10.15376/biores.12.2.4364-4383

Królczyk, J. B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., & Sołowiej, B. (2016). Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *66*(3), 157–165. https://doi.org/10.1515/pjfns-2015-0052

Książek, E. (2024). Citric Acid: Properties, Microbial Production, and Applications in Industries. *Molecules* (Vol. 29, Issue 1). https://doi.org/10.3390/molecules29010022

Martelli, G., Giannenas, I., Fiore, E., & Arfuso, F. (2022). Different genotype and a liquid whey-supplemented diet influence the resilience of pigs through immune-modulation and anti-inflammatory response. *Frontiers in Veterinary Science*. Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1046101

NP EN ISO 22000. (2018). *Sistemas de gestão da segurança alimentar: Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar*.

Nunes, Ó. (2018). *Análise do Ciclo de Vida de Produtos Lácteos – Caso de Estudo do Queijo da Beira Baixa.* Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia e Gestão Industrial, Universidade da Beira Interior.

Palmieri, N., Forleo, M. B., & Salimei, E. (2017). Environmental impacts of a dairy cheese chain including whey feeding: An Italian case study. *Journal of Cleaner Production*, *140*, 881–889. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.185

Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2016). Whey and Whey Powders: Production and Uses. *Encyclopedia of Food and Health*, 498–505. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9

Rodrigues, A. (2023). *Qualidade do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP e efeito da época do ano na qualidade microbiológica*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária.

Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 479–498). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1

Salomone-Caballero, M., Fresno, M., Álvarez, S., & Torres, A. (2024). Effects of Parity and Somatic Cell Count Threshold on Udder Morphology, Milkability Traits, and Milk Quality in Canarian Goats. *Animals*, *14*(9). https://doi.org/10.3390/ani14091262

Sangwan, S., & Seth, R. (2021). Whey Protein Supplement: An Exclusive Food or Need of Hour: Review. *Annual Research & Review in Biology.* http://dx.doi.org/10.9734/arrb/2021/v36i430367

Smith, S., Smith, T. J., & Drake, M. A. (2016). Short communication: Flavor and flavor stability of cheese, rennet, and acid wheys. *Journal of Dairy Science*, *99*(5), 3434–3444. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10482

Sutera, A. M., Arfuso, F., Tardiolo, G., Riggio, V., Fazio, F., Aiese Cigliano, R., Paytuví, A., Piccione, G., & Zumbo, A. (2023). Effect of a Co-Feed Liquid Whey-Integrated Diet on Crossbred Pigs' Fecal Microbiota. *Animals*, *13*(11). https://doi.org/10.3390/ani13111750

Ungvarsky, J. (2024). Lactic acid. *Salem Press Encyclopedia of Science. 3p*. http://www.webmd.com/drugs/2/drug-

Wallace, C. A., Sperber, W. H., & Mortimore, S. E. (2018). Food safety for the 21st century: Managing HACCP and food safety throughout the global supply chain. In *Food Safety for the 21st Century: Managing HACCP and Food Safety Throughout the Global Supply Chain*. wiley. https://doi.org/10.1002/9781119053569

Wijayasinghe, R., Bogahawaththa, D., Huppertz, T., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2019). Influence of lactic, citric and phosphoric acids on the properties of concentrated lactose solutions. *Food Chemistry*, *293*, 247–253. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.04.065

Yang, X., Ren, Y., Liu, H., Huo, C., & Li, L. (2021). Differences in the physicochemical, digestion and microstructural characteristics of soy protein gel acidified with lactic acid bacteria, glucono-δ-lactone and organic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *185*, 462–470. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.06.071

Anexo I - Norma de Trabalho

	Manual de Segurança Alimentar	Versão:
	Instrução de trabalho de controlo do pH do soro de leite de ovelha e/ou cabra com ácido cítrico para alimentação animal	Código:
		Página: 1 de 1
Elaborado/ Data:	Verificado/ Data:	Aprovado/ Data:

Instrução de Trabalho		
Controlo do pH do soro de leite de ovelha e/ou cabra– Modo de Proceder		**Registos e Docs associados**
Objectivo	Controlar o pH Do soro de leite de ovelha e/ou cabra encaminhado para alimentação animal, para um valor de pH inferior a 6, através da adição de ácido cítrico	
Âmbito	Cumprimento de requisito descrito no Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024 emitido pela DGAV.	Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024 emitido pela DGAV.
Responsabilidades	O operador responsável terá de preparar a solução de ácido cítrico assim como adicioná-la nas condições definidas ao soro de leite de ovelha e/ou cabra.	
Procedimento		
Regras gerais	Preparar uma solução a 10% de ácido cítrico (100 g de ácido cítrico em 1 L de água potável), seguindo-se o cálculo do volume necessário para se obter uma concentração de 0,04% no volume total de soro (por exemplo, em 100 L de soro de leite são necessários 400 mL, e em 2000 L de soro de leite são necessários 8 L de ácido cítrico). Adicionar a solução de ácido cítrico preparada e o volume determinado ao soro de leite, obtendo-se assim um pH inferior a 6. A adição da solução de acido cítrico têm de ser realizada antes da bombagem do soro para o tanque de refrigeração.	Anexo II
	O ácido cítrico que pode ser usado para a acidificação do soro de leite de ovelha e/ou cabra tem que cumprir um conjunto de requisitos impostos pelo Regulamento de Execução (EU) 2022/415 em que se refere que: " (…) o ácido cítrico utilizado na alimentação animal deve ter uma pureza igual ou superior a 99,5% (na matéria seca); Pode ser utilizada a forma anidra ou mono-hidratada, desde que o aditivo seja produzido por *Aspergillus niger* DSM 25794 ou *Aspergillus niger* CGMCC 4513/CGMCC 5751 ou *Aspergillus niger* CICC 40347/CGMCC 5343".	

METODOLOGIA	
Descrição	Acidificação com ácido cítrico, de modo que a concentração final no soro de leite seja de 0,04% de ácido para garantir um pH inferior a 6 e cumprir o requisito imposto pelo Esclarecimento Técnico nº11/DGAV/2024 emitido pela DGAV.
Equipamentos	Ácido cítrico que cumpra as condições descritas pelo Regulamento de Execução (EU) 2022/415; Água potável; Balança; Proveta graduada ou recipiente que permita fazer as medições necessárias.

Anexo II - Folha de Registo

Manual de Segurança Alimentar

Registo de controlo do pH do soro de leite de ovelha e/ou cabra com ácido cítrico para alimentação animal

Versão:
Código:
Página: 1 de 1

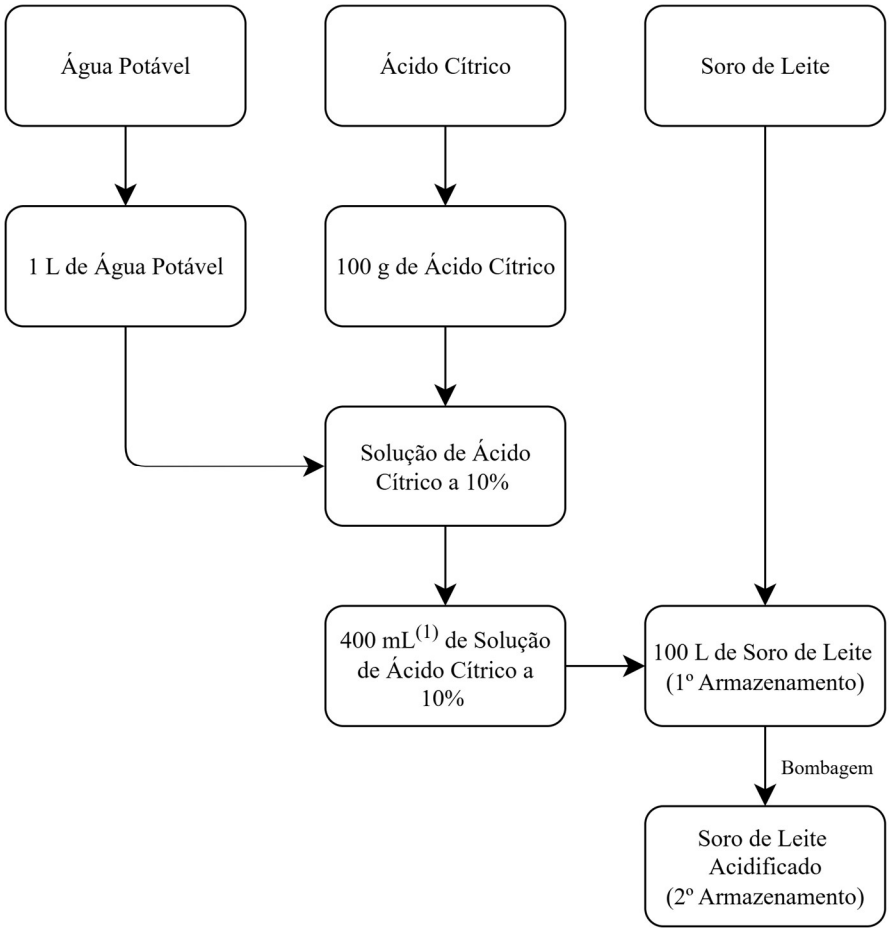
Elaborado/ Data:
Verificado/ Data:
Aprovado/ Data:

Folha de Registo

Controlo do pH do soro de leite de ovelha e/ou cabra

Data	Tipo de soro de leite (Ovelha ou Cabra)	Quantidade de ácido cítrico pesada (g)	Volume final da solução-mãe (L)	Lote e Marca do ácido cítrico	Assinatura do operador responsável

Anexo III – Fluxograma de Acidificação do Soro de Leite



(1) O volume da solução de ácido cítrico está dependente do volume de soro de leite que se pretende acidificar:
Para 100 L de soro, 400 mL de solução de ácido;
Para 1000 L de soro, 4 L de solução de ácido;
Para 2000L de soro, 8 L de solução de ácido.
Seguindo-se o mesmo método independentemente do volume de soro de leite:

$$Volume\ da\ solução\ de\ ácido\ (L) = \frac{0{,}04 \times Volume\ de\ soro\ de\ leite\ (L)}{10},$$

Simplificando,

$$Volume\ da\ solução\ de\ ácido\ (L) = 0{,}004 \times Volume\ de\ soro\ de\ leite\ (L)$$

Anexo IV – Tratamento Estatístico dos Resultados

Tabela 1 – Tratamento estatístico dos resultados da variável dependente pH, relacionando o ácido, a temperatura e o tempo.

Ácido	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Média	Erro	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Ácido Cítrico	4	0	5,853	0,017	5,818	5,889
		1	5,823	0,017	5,788	5,859
		24	5,817	0,017	5,781	5,852
	30	0	5,900	0,017	5,865	5,935
		1	5,857	0,017	5,821	5,892
		24	5,880	0,017	5,845	5,915
Ácido Láctico	4	0	6,060	0,017	6,025	6,095
		1	5,967	0,017	5,931	6,002
		24	5,943	0,017	5,908	5,979
	30	0	5,910	0,017	5,875	5,945
		1	5,927	0,017	5,891	5,962
		24	5,883	0,017	5,848	5,919