



Departamento de Ciências Agrárias

**Estudo Levantamento das Anomalias da Coagulação em Leites
Individuais de Vacas Leiteiras da Ilha Terceira**

*Survey Study of Coagulation Abnormalities in Individual Milk of Dairy
Cows from Terceira Island*

Sónia Cristina Sousa Melo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professor Catedrático José Estevam da Silveira Matos

Angra do Heroísmo, 2016

Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias

**Estudo Levantamento das Anomalias da Coagulação em Leites
Individuais de Vacas Leiteiras da Ilha Terceira**

*Survey Study of Coagulation Abnormalities in Individual Milk of Dairy Cows from
Terceira Island*

Sónia Cristina Sousa Melo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professor Catedrático José Estevam da Silveira Matos

Angra do Heroísmo, 2016

AGRADECIMENTOS

A realização deste mestrado só foi possível graças ao contributo de várias pessoas e instituições, sem as quais tal não seria possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo recebido ao longo destes anos, principalmente, aos meus pais e irmãos, por nunca deixarem de acreditar em mim.

Ao meu orientador de dissertação, o Professor José Matos, pela sua disponibilidade, apoio e acompanhamento ao longo deste trabalho.

À Associação Agrícola, aos Serviços de Desenvolvimento Agrário da ilha Terceira e ao Laboratório Regional de Veterinária, por disponibilizarem as amostras utilizadas.

Aos meus professores do curso de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, pelos conhecimentos transmitidos e pela sua dedicação na tarefa de formar mestres.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram, de algum modo, para a concretização deste trabalho.

A todos, o meu mais sincero obrigada.

RESUMO

Recentemente, tem vindo a ser descrito, em vários estudos, uma deterioração geral das propriedades de coagulação do leite em leites individuais e a ocorrência de leite que coagula mal, ou não coagula, definido como o leite que não forma uma coalhada firme 30 minutos após a adição de coalho. Esta variação é, em grande parte, influenciada pela composição da proteína que, por sua vez, é afetada por fatores genéticos subjacentes, sendo este fenómeno mais comum na Raça Holstein-Frisean.

As capacidades coagulação do leite afetando as propriedades tecnológicas e a sua transformação em queijo são de grande interesse para a Indústria de Lacticínios dos Açores, uma vez que mais de metade do seu leite é transformada em queijo.

No presente trabalho realizou-se um estudo levantamento das propriedades de coagulação do leite, em leites individuais de vacas submetidas a contraste lacto-manteigueiro, de modo a verificar a ocorrência e importância relativa na Ilha Terceira do fenómeno do leite que coagula mal, ou não coagula.

Após a realização do levantamento do “estado da arte” sobre os mecanismos da coagulação do leite e dos diversos fatores suscetíveis de a influenciar e da testagem da metodologia referenciada na literatura, foram efetuados testes de coagulação padronizados a amostras de leites individuais de vacas submetidas a contraste lacto-manteigueiro na Ilha Terceira. Procurou-se realizar o teste a um conjunto significativo de amostras de leite individuais (1342) provenientes de vacas de diversas explorações leiteiras (36). De todas as 1342 amostras de leite individuais analisadas, 5 (0,4%) não coagularam 30 minutos após a adição de coalho e foram designadas como amostras de leite que não coagula; 8 (0,6%) formaram uma coalhada quebradiça e pouco consistente, sendo denominadas de amostras de leite que coagula mal. As restantes 1329 (99%) amostras coagularam bem.

Palavras-chave: Vaca leiteira; leite que não coagula; Holstein-Frisean.

ABSTRACT

Recently, it has been described in many studies a general deterioration of milk coagulation properties in individual milk samples, and the occurrence of poorly coagulating milk or noncoagulated milk, defined as milk that does not form a curd in 30 minutes after the rennet addition to the milk. This variation is largely influenced by the composition of the protein, which is in turn, affected by underlying genetic factors; this phenomenon is more common in the breed Holstein-Frisian.

The milk coagulation properties affecting technological properties and its transformation into cheese are of great interest for the Dairy Industry in the Azores, since more than half of his milk is used for cheese production.

In the present work we carried out a survey study to the milk coagulation properties in milk from individual cows submitted to milk recording in Terceira Island, in order to verify the occurrence and relative importance of the phenomenon of poorly coagulating milk, or noncoagulated milk.

After a review on the mechanism of milk coagulation and various factors that may influence it and testing the methodology referenced in the literature, standard coagulation tests to samples of milk from individual cows were from Terceira Island. Efforts were made to conduct the test in a representative sample of samples (1342) from different dairy farms (36). Of the 1342 individual milk samples analyzed 5 (0.4%) did not clotted 30 minutes after the addition of rennet and were designated as noncoagulated samples; 8 (0.6%) formed a slightly brittle curd, being named as poorly coagulating milk. The remaining 1329 (99%) samples coagulated normally.

Keywords: Dairy cow noncoagulated milk; Holstein-Friesian.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE QUADROS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
I. INTRODUÇÃO.....	1
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. Leite de Vaca.....	7
1.1. Composição físico-química.....	7
1.2. Composição proteica.....	10
1.2.1. Caseína.....	11
1.2.2. Fatores que afetam a estabilidade micelar das caseínas.....	19
1.2.3. Polimorfismo Genético das Proteínas do Leite	22
1.2.4. Importância das proteínas do leite para a Indústria Alimentar	23
1.3. Fatores que Afetam a Qualidade do Leite.....	26
2. Leite e produtos lácteos.....	28
2.1. Queijo.....	29
2.1.1. Principais Processos de Fabricação de Queijo	30
2.1.1.1. Receção e pré-tratamento do leite	31
2.1.1.2. Coagulação.....	32
2.1.1.3. Coagulação enzimática	34
2.1.1.3.1. Enzimas Coagulantes do Leite.....	39
a) Coagulantes de origem animal: Coalho comercial....	41
b) Coagulantes de origem vegetal	43
c) Coagulantes de origem microbiana	46
d) Coagulantes OMG (organismos geneticamente modificados): Quimosina produzida por fermentação. 47	
2.1.2.2. Coagulação ácida.....	47

2.1.2.3. Coagulação mista	49
2.1.1.3. Dessoramento, Salga e Maturação/Cura	50
2.1.2. Principais Fatores Que Afetam a Coagulação do Leite	51
2.1.2.1. Efeito dos Fatores Genéticos Sobre as PCL.....	59
2.1.2.2. Efeito da Raça Sobre as PCL.....	68
2.1.2.3 Efeito da Fase de Lactação da Vaca Sobre as PCL.....	73
2.1.2.4. Efeito da Contagem de Células Somáticas Sobre as PCL.....	75
2.1.2.5. Efeito da Dieta do Animal Sobre as PCL.....	79
2.1.2.6. Efeito do Cálcio e do Fosfato sobre as PCL	81
2.1.2.7. Efeito do Azoto Livre Sobre as PCL.....	85
2.1.3. Leite que Não Coagula	87
2.1.4. Tempo de Coagulação e Proporção de Amostras de Leite NC	88
2.1.5. Medição da Firmeza da Coalhada em Diferentes Momentos Após Adição do Coalho.....	90
2.1.6. Considerações Para Melhorar a Coagulação do Leite	93
II. MATERIAIS E MÉTODOS	103
1. Recolha e preparação das amostras	103
2. Métodos de análise.....	104
3. Análise de Resultados.....	105
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
1. Médias por amostra individual	107
2. Médias por exploração	109
IV. CONCLUSÕES	117
V. BIBLIOGRAFIA	119
VI. ANEXOS.....	125
ANEXO I – Resultados Contraste Lacto-Manteigueiro Ilha Terceira e teste de coagulação.....	125

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Entregas de leite às fábricas de lacticínios nos Açores em 2015.....	4
Quadro 2: Distribuição das principais proteínas do soro do leite bovino	10
Quadro 3: Composição de caseína no leite de vaca	14
Quadro 4: Principais tipos e fontes de enzimas coagulantes utilizadas na produção de queijo	40
Quadro 5: Tipos e fontes vegetais de enzimas coagulantes.....	43
Quadro 6: Efeito de vários fatores sobre o tempo de coagulação do leite (RTC) durante a 1ª e 2ª fases de coagulação	55
Quadro 7: Composição físico-química do leite de três raças bovinas leiteiras	71
Quadro 8: Composição média dos parâmetros físico-químicos das amostras utilizadas no ensaio	106
Quadro 9: Frequência das anomalias da coagulação das amostras de leite analisadas	107
Quadro 10: Médias da composição físico-química (matéria gorda e proteína), CCS e resultados do teste de coagulação das amostras de leite individuais por exploração.....	109
Quadro 11: Resultados exploração 1.....	125
Quadro 12: Resultados exploração 2.....	126
Quadro 13: Resultados exploração 3.....	127
Quadro 14: Resultados exploração 4.....	128
Quadro 15: Resultados exploração 5.....	128
Quadro 16: Resultados exploração 6.....	129
Quadro 17: Resultados exploração 7.....	130
Quadro 18: Resultados exploração 8.....	131
Quadro 19: Resultados exploração 9.....	132
Quadro 20: Resultados exploração 10.....	133
Quadro 21: Resultados exploração 11.....	134
Quadro 22: Resultados exploração 12.....	134
Quadro 23: Resultados exploração 13.....	135
Quadro 24: Resultados exploração 14.....	136
Quadro 25: Resultados exploração 15.....	137
Quadro 26: Resultados exploração 16.....	138
Quadro 27: Resultados exploração 17.....	139
Quadro 28: Resultados exploração 18.....	139
Quadro 29: Resultados exploração 19.....	140

Quadro 30: Resultados exploração 20.....	141
Quadro 31: Resultados exploração 21.....	142
Quadro 32: Resultados exploração 22.....	142
Quadro 33: Resultados exploração 23.....	143
Quadro 34: Resultados exploração 24.....	143
Quadro 35: Resultados exploração 25.....	144
Quadro 36: Resultados exploração 26.....	145
Quadro 37: Resultados exploração 27.....	146
Quadro 38: Resultados exploração 28.....	147
Quadro 39: Resultados exploração 29.....	148
Quadro 40: Resultados exploração 30.....	148
Quadro 41: Resultados exploração 31.....	149
Quadro 42: Resultados exploração 32.....	150
Quadro 43: Resultados exploração 33.....	151
Quadro 44: Resultados exploração 34.....	152
Quadro 45: Resultados exploração 35.....	152
Quadro 46: Resultados exploração 36.....	153

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Destino do leite produzido na União Europeia em 2013	1
Gráfico 2: Fabrico dos principais produtos lácteos nos Açores em 2015	3
Gráfico 3: Efeito de vários fatores sobre o tempo de coagulação do leite (RTC)	55
Gráfico 4: Valores de matéria gorda das amostras individuais analisadas.....	108
Gráfico 5: Valores de proteína das amostras individuais analisadas.....	108
Gráfico 6: Valores de contagem de células somáticas das amostras individuais analisadas ...	108
Gráfico 7: Teores médios de matéria gorda e proteína por exploração	112
Gráfico 8: Valores médios de CCS em leites individuais por exploração.....	112
Gráfico 9: Valores médios de proteína e matéria gorda obtidos nas amostras de leite individuais com anomalias no teste de coagulação	113
Gráfico 10: Valores médios da CCS obtidos nas amostras de leite individuais com anomalias no teste de coagulação	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Constituintes presentes no leite de vaca	8
Figura 2: a) Estrutura da β -Lactoglobulina; b) Estrutura da α -Lactalbumina	11
Figura 3: Corte transversal de uma micela de CN, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de cálcio coloidal e os peptídeos de κ -CN, recobrando a superfície da micela (Walstra, 1999)	12
Figura 4: Representação esquemática da união de duas submicelas pelo fosfato de cálcio coloidal	14
Figura 5: Modelo esquemático da secção de uma micela de caseína (Holt, 1994).....	16
Figura 6: Modelo de dupla ligação da estrutura micelar com α -, β - e κ -caseína. O vínculo entre as regiões hidrofóbicas, mostrado com as barras retangulares, e pelas ligações das regiões hidrofílicas contendo “clusters” de fosfoserina e “clusters” de fosfato de cálcio coloidal. K representa a continuação do crescimento da estrutura limite das moléculas de κ -caseína (Horne, 1998)	17
Figura 7: Conformações de (A) α_{s1} -caseína com um “train-loop-train” e (B) β -caseína com uma estrutura “tail-train” absorvida nas interfaces hidrofóbicas (Horne, 1998).....	17
Figura 8: Estruturas poliméricas de (A) α_{s1} -caseína e (B) β -caseína, mostrando as ligações através da interação hidrofóbica (Horne, 1998).....	17
Figura 9: Fluxograma Genérico de Produção de Queijo	31
Figura 10: Ataque esquemático pela quimosina (representada por pequenos pontos negros) sobre as micelas de caseína.	35
Figura 11: Ataque da quimosina, 1ª fase da Coagulação do Leite.....	36
Figura 12: Modelo esquemático da coagulação do leite a nível molecular.....	38
Figura 13: Cardo (<i>Cynara cardunculus</i> L.)	45
Figura 14: Diagramas para uma coagulação normal do leite (A), coagulação pobre do leite (B) e leite que não coagula (C), produzidos por um formográfico. As PCL calculadas através do diagrama são: o tempo de coagulação (R) em minutos, o tempo de endurecimento da coalhada (K_{20}) em minutos, e a firmeza da coalhada (E_{30}) em milímetros (mm)	53
Figura 15: Efeitos genéticos diretos e indiretos sobre as PCL	64
Figura 16: Traços típicos da coagulação do leite, obtidos pelo formográfico, de vacas em diferentes estádios de lactação.	74
Figura 17: Classificação das curvas mais comuns do Lactodinamógrafo.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BS – Brown Swiss

Ca – Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CCS – Contagem de Células Somáticas

CL – Coagulação do Leite

CMP – Caseínomoacropeptídeo

CN – Caseína(s)

DOP – Denominação de Origem Protegida

HF – Holstein-Friesian

K – Potássio

Met – Metionina

Mg – Magnésio

Na – Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NC – Não Coagula

P – Fósforo

PCL – Propriedades de Coagulação do Leite

Phe – Fenilalanina

Y-CN – Y-Caseína

α-LA – α-Lactoalbumina

α_{s1}-CN – α_{s1}-Caseína

α_{s2}-CN – α_{s2}-Caseína

β-CN – β-Caseína

B-LG – β-Lactoglobulina

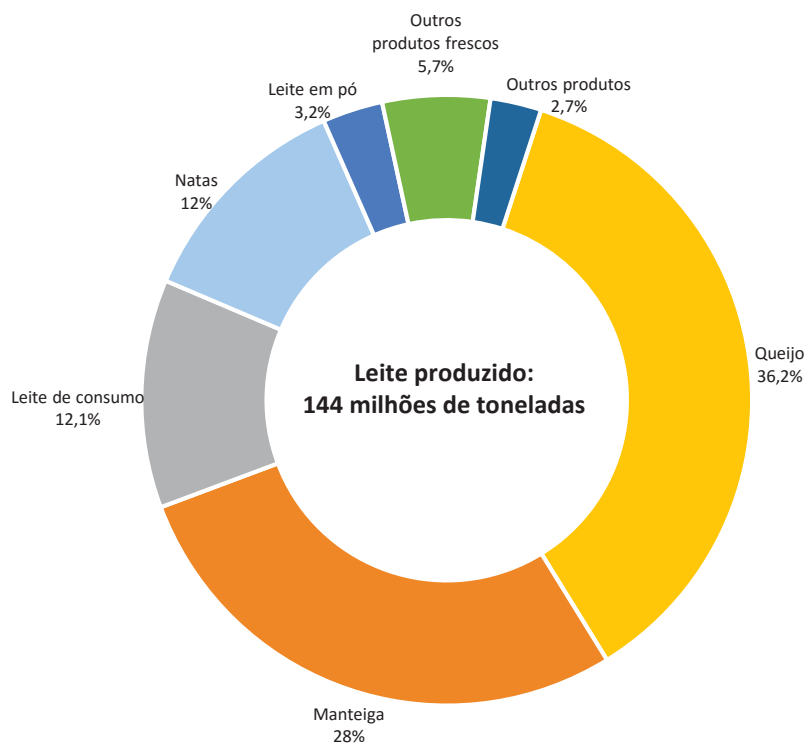
κ-CN – κ-Caseína

I. INTRODUÇÃO

A produção económica na indústria de laticínios está, em grande medida, dependente da transformação de leite em produtos lácteos, sendo que a proporção de leite produzido que é transformada em produtos lácteos tem aumentado a nível mundial nas últimas décadas (Cecchinato et al., 2011; Glantz et al., 2010).

Dados da FIL/IDF (2011) demonstram que a Europa e a América do Norte monopolizam mais de 70% da produção de queijo, que tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Verifica-se também que o maior produtor de leite a nível mundial é a Europa (Barros, 2012). Em 2013, 36,2% dos 144 milhões de toneladas de leite produzido nos 28 países da União Europeia foi transformado em queijo, a par dos 28% convertidos em manteiga e 12,1% em leite de consumo (ver gráfico 1).

Gráfico 1: Destino do leite produzido na União Europeia em 2013



Fonte: Adaptado de Eurostat, 2015

O aumento do consumo de queijo ocorre, em paralelo, com uma grande ênfase na melhoria da qualidade do leite e dos níveis de certos nutrientes (gordura, proteína, cálcio e sódio), propriedades físicas, características sensoriais e do processamento (Law e Tamime, 2011). Assim sendo, os constituintes do leite, como as proteínas e gordura, têm vindo a alcançar um maior valor económico (Hallén, 2008). A qualidade e a quantidade de queijo obtido e o rendimento da transformação são importantes para o resultado económico da indústria (Wedholm et al., 2006).

Na indústria queijeira têm sido utilizados os mais distintos métodos de processamento para um grande número de diferentes tipos de produtos. Algumas etapas são comuns em todos fluxogramas de produção de queijo, sendo a coagulação, uma etapa imprescindível (Castilho, 2008). A coagulação do leite (CL), durante a produção de queijo, é um passo importante na transformação do leite em queijo e envolve várias fases e diferentes transformações bioquímicas do leite (Velázquez-Varela et al., 2013).

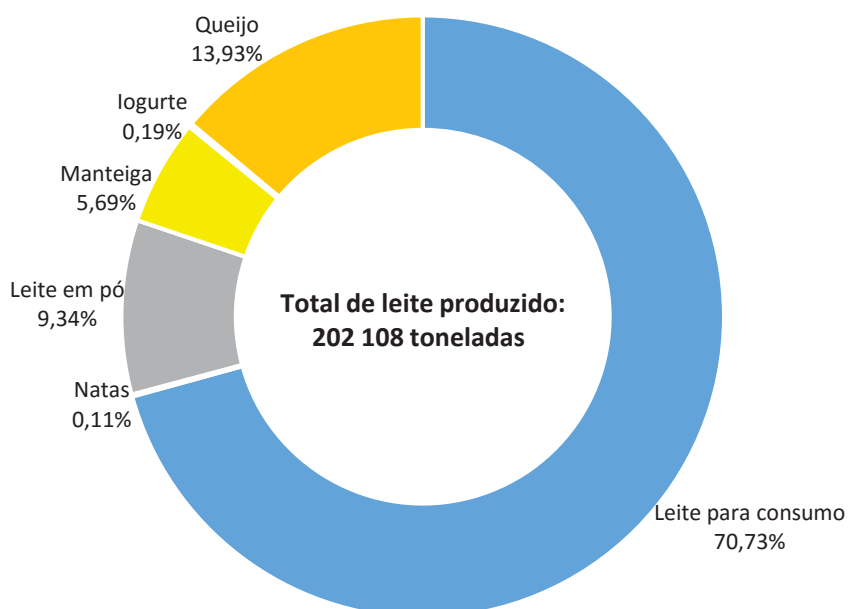
A capacidade de CL influencia o rendimento e a qualidade do queijo, sendo de grande interesse económico e tem recebido uma atenção crescente por parte da ciência e da indústria de laticínios, com vários estudos a confirmar a sua importância em termos de processamento, rendimento, qualidade e propriedades sensoriais do queijo (Harzia, 2013; Bittante et al., 2012).

Para a indústria de laticínios, é importante que o leite forme uma coalhada firme e uniforme no momento mais desejável para evitar perdas de qualidade, uma vez que a eficiência do processo é avaliada pela quantidade de sólidos do leite perdidos no soro. O tempo de coagulação pode ser otimizado pelo aumento do teor de enzimas adicionado ao leite. No entanto, resultados indesejáveis poderão ocorrer: diminuição do rendimento e o aumento da quantidade de péptidos amargos no produto final (Harzia, 2013). Espera-se também que o leite com um tempo de coagulação mais curto e uma coalhada mais firme venha a produzir queijo com melhor composição, em comparação com leite que possui propriedades desfavoráveis (Cecchinato, 2013).

A capacidade de CL, afetando as suas propriedades tecnológicas e a sua transformação em queijo, é de grande interesse para a indústria de lacticínios dos Açores, uma vez que mais de metade do seu leite é transformado em queijo.

De acordo com dados do SREA (Gráfico 2), os produtos lácteos mais significativos da indústria de lacticínios dos Açores em 2015 foram o queijo (28.152 toneladas) e o leite em pó (18.886 toneladas).

Gráfico 2: Fabrico dos principais produtos lácteos nos Açores em 2015



Fonte: Adaptado de SREA (2015)

Os produtores da Ilha de São Miguel entregam às fábricas de lacticínios cerca de 65% do leite transformado nos Açores. A Terceira, por sua vez, entrega 25%. Apenas 3 ilhas, São Miguel, Terceira e São Jorge representam 95% do leite entregue (Quadro 1). Em São Jorge a totalidade do leite é transformado em queijo.

Quadro 1: Entregas de leite às fábricas de lacticínios nos Açores em 2015

Ilha	X (1.000 litros)
São Miguel	395.897,5
Terceira	155.123,1
São Jorge	30.293,7
Faial	12.308,8
Graciosa	8.054,8
Pico	7.579,6
Flores	801,8
Corvo	37,4
Total	610.096,7

Fonte: Adaptado de SREA (2015)

Existem muitos estudos com o objetivo de obter uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à CL. A análise das PCL é feita através de uma variedade de metodologias e utilizando uma série de instrumentos diferentes, com o intuito de entender os mecanismos subjacentes. Tais estudos têm sido focados em medições óticas e mecânicas, entre outras (O'Callaghan et al., 2002). Os instrumentos utilizados atualmente para a medição das PCL encontram-se limitados à observação da coagulação até determinado tempo após adição de coalho (Cecchinato, 2013). Apesar de várias técnicas poderem ser usadas para o seu estudo, a medição das PCL constitui um processo trabalhoso e lento, devido aos elevados custos económicos, de tempo e de análises laboratoriais, limitando as possibilidades atuais para a sua reprodução em toda a indústria de lacticínios (Cecchinato et al., 2011; Ikonen, 2000). A abordagem mais comum, tanto ao nível da investigação como da indústria, é monitorizar a viscosidade de amostras de leite mantidas a uma temperatura fixa, após adição de coalho, procedendo-se à medição do tempo de coagulação, da firmeza da coalhada e do tempo de endurecimento da mesma (Bittante et al., 2012; Bittante, 2011).

Um dos problemas mais significativos na indústria de lacticínios, assim como na análise, tratamento estatístico e interpretação das PCL, é a existência de amostras de leite que não coagula (NC) dentro de 30 minutos após a adição de coalho (Cipolat-Gotet et al., 2012). O fenómeno relatado por diversos autores tem sido detetado em vários estudos de CL, sendo sugerido que se deve a parâmetros genéticos (Bittante et al., 2012; Wedholm et al., 2006); a fatores ambientais (Frederiksen et al., 2011a), incluindo o estágio de lactação; à raça e alimentação do animal, o que torna a medição das PCL de

especial relevância para a fabricação de queijo (Cecchinato et al., 2013; Jõudu, 2008). Até à data ainda não foram encontrados fatores genéticos ou outros, que permitam explicar e prever claramente as PCL (Harzia, 2013).

Vários estudos têm investigado as variações e os aspetos genéticos das PCL em várias populações de gado, usando diferentes condições de campo e modelos de análise (Cecchinato, 2013).

É importante determinar a ocorrência e as razões pelas quais ocorre leite de vacas individuais que coagula mal ou leite NC (Frederiksen et al., 2011b), ocorrência com efeito direto sobre o resultado económico da produção de queijo, principalmente, por causa dos seus efeitos sobre a produção e perda de rendimento (Cecchinato et al., 2011). As novas tecnologias e outras informações proporcionadas pela análise tradicional devem ser exploradas, devido à importância de documentar a frequência de amostras de leite NC, tanto para fins industriais como científicos (Bittante, 2011).

Uma vez que grande parte do leite produzido atualmente é utilizado para a produção de queijo, a seleção de animais reprodutores avaliados para a capacidade de CL revela-se uma escolha tentadora para produzir leite de alta qualidade (Glantz et al., 2009).

O efeito da raça sobre a composição e qualidade tecnológica do leite também pode ser considerado como um fator relativamente importante. O leite NC é um problema comum em várias raças bovinas (Cecchinato, 2013), sendo a qualidade tecnológica inferior do leite produzido por vacas da raça Holstein-Friesian (HF) mencionada por vários autores em comparação com outras raças. Apesar desta característica negativa, a raça HF é amplamente utilizada e preferida por muitos criadores de gado, sobretudo por causa do seu alto desempenho na produção quantitativa de leite (Chládek et al., 2011). Estes problemas são de crescente preocupação por causa da disseminação desta raça em todo o mundo, uma vez que os seus animais são conhecidos por produzir tanto leite que coagula mal como leite NC em maior quantidade quando em comparação com outras raças leiteiras (Bittante et al., 2013). No entanto, diferenças na qualidade tecnológica do leite podem ser encontradas até mesmo dentro de uma única raça (Chládek et al., 2011).

O presente trabalho teve como principal objetivo fazer um estudo levantamento das PCL, em leites individuais de vacas da raça HF, submetidas a contraste lacto-manteigueiro, de modo a verificar a ocorrência e importância relativa na Ilha Terceira do fenómeno dos leites que coagulam mal ou leites NC, uma vez que este fenómeno nunca foi antes avaliado nos leites dos Açores.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Leite de Vaca

De acordo com o Regulamento (CE) nº 853/2004, de 29 de Abril, alterado pelo Regulamento (CE) N.º 1662/2006, de 18 de Novembro que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, o leite cru encontra-se definido como: “leite produzido pela secreção da glândula mamária de animais de criação, não aquecido a uma temperatura superior a 40°C, nem submetido a um tratamento de efeito equivalente.”

1.1. Composição físico-química

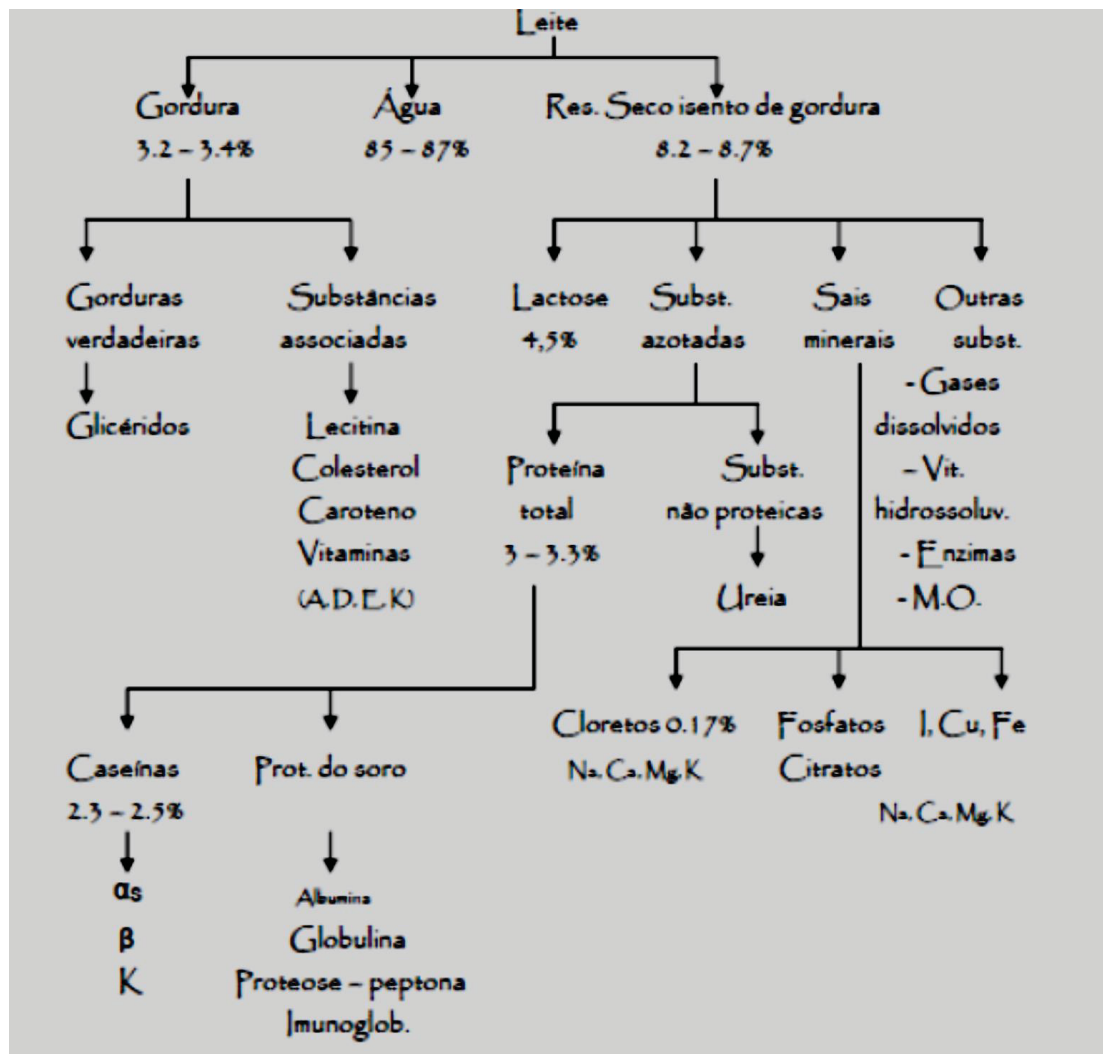
O leite, obtido em circunstâncias naturais, é um líquido de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado, em que a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis, sais minerais e lactose, ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, por micelas de caseína (CN) em suspensão e glóbulos de gordura em emulsão (Sgarbieri, 2005).

É um produto secretado pelas glândulas mamárias e é um alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir e assimilar outras substâncias necessárias à sua sobrevivência. É composto por 100.000 tipos de moléculas diferentes, o que lhe confere um alto grau de complexidade, pois cada uma delas apresenta uma função específica, propiciando nutrientes ou proteção imunológica para o neonato (Fontaneli, 2001). Além das funções biológicas, o leite oferece grandes possibilidades de processamento industrial para a obtenção de diversos produtos para a alimentação humana (Machado, 2010).

A composição aproximada do leite é em grande parte determinada por fatores genéticos mas pode variar em função da estação do ano e reflete diferenças entre raças, estágio de lactação, estado de saúde da vaca e sistema de alimentação (Frederiksen et al., 2011b).

O constituinte presente em maior percentagem no leite (Figura 1) é a água (cerca de 87%). A componente sólida é constituída por gordura (rica em ácidos gordos saturados e insaturados), proteínas (CN, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), vitaminas (A, B, D e E) e minerais (rico em cálcio e fósforo). É devido a esta composição diversificada que o leite é considerado um alimento completo e essencial à dieta humana (Pinto, 2011).

Figura 1: Constituintes presentes no leite de vaca



Fonte: Pinto (2011)

Os glícidos ou açúcares do leite são essencialmente constituídos por lactose, com um teor médio de 45 a 50 g/L, conferindo o sabor adocicado característico do leite. É

um glícido redutor, que se forma a partir da glucose e da galactose. Cerca de 11% da fração glicídica do açúcar encontra-se naturalmente ligado às proteínas (Pinto, 2011).

A gordura ou fração lipídica, constituída essencialmente por triacilgliceróis, encontra-se no leite sob a forma de uma emulsão de pequenos glóbulos, envolvidos por uma membrana de carácter lipoproteico, designada por membrana do glóbulo de gordura. A gordura é rica em energia, o que se deve à grande concentração energética dos lípidos; é constituída por cerca de 99,5% de compostos lipídicos e 0,5% de compostos lipossolúveis, no entanto, o valor nutricional da gordura não se limita ao seu conteúdo energético, sendo também indispensável em determinados processos metabólicos. Este componente é o que sofre maior variação em função da raça, alimentação, estação do ano e período de lactação (Pinto, 2011).

Os sais minerais são importantes na nutrição humana, especialmente o cálcio (Ca) e o fósforo (P), por estarem envolvidos na constituição dos tecidos e na viabilização da contração muscular. O Ca é também um mineral necessário para o desenvolvimento de ossos e dentes. Dos minerais presentes no leite, encontram-se teores consideráveis de cloro, P, potássio, sódio, Ca e magnésio, e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês. Os seus teores são variáveis e dependem muito do estado sanitário em que os animais se encontram e das condições de produção (Pinto, 2011).

Estão ainda presentes no leite, embora em quantidades muito pequenas, diversos biocatalizadores. No entanto, estes têm um papel fundamental devido à sua atividade biológica. São eles as vitaminas, as enzimas e as hormonas. Estas substâncias encontram-se na fase aquosa, em estado solúvel, ligadas às proteínas, ou ainda na fase lipídica, em especial ao nível da membrana do glóbulo de gordura (Pinto, 2011). O Ca, as proteínas e as vitaminas B₂ e B₁₂ contribuem, significativamente, para a elevada riqueza em nutrientes do leite, queijo e iogurtes. Assim, o leite bovino contém uma grande quantidade de componentes nutricionais importantes para o consumidor (Schopen et al., 2010).

1.2. Composição proteica

As proteínas do leite são compostos orgânicos de estrutura complexa e alta massa molecular, sintetizadas pelo encadeamento de aminoácidos, através de ligações peptídicas (Kunimura et al., 2011). São veículos naturais que fornecem micronutrientes essenciais, Ca, P e aminoácidos, assim como componentes do sistema imunitário (imunoglobulinas e lactoferrina) para o recém-nascido. Encontram-se distribuídas em duas grandes classes principais: 80% de CN e 20% de proteínas do soro (Brasil, 2013a). Por outro lado, podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com as suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro (Quadro 2); c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (Sgarbieri, 2005).

Quadro 2: Distribuição das principais proteínas do soro do leite bovino

Proteínas do soro	Quantidade em g/L
- Proteínas totais	5,6
β -lactoglobulina	3,2
α -lactalbumina	1,2
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4
Imunoglobulinas	0,7
Lactoferrina	0,1

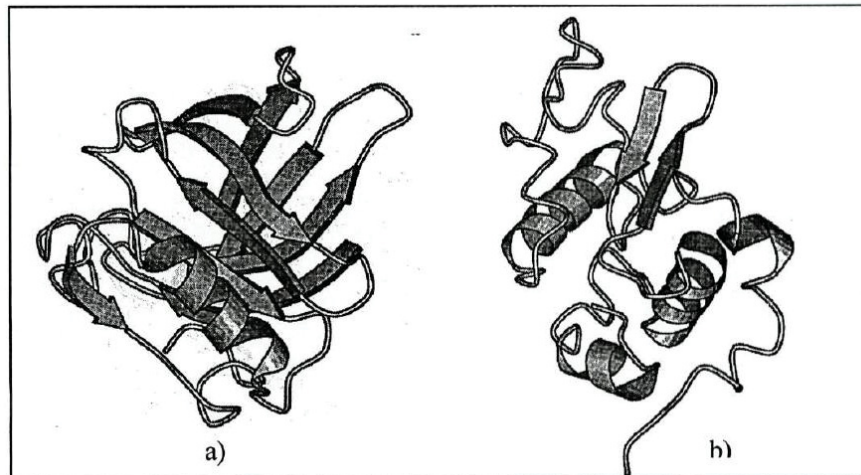
Fonte: Sgarbieri (2005)

As seis principais proteínas encontradas no leite de vaca são a α_{s1} -Caseína (α_{s1} -CN), α_{s2} -Caseína (α_{s2} -CN), β -Caseína (β -CN), κ -Caseína (κ -CN), α -Lactalbumina (α -LA) e β -Lactoglobulina (β -LG) (Barros, 2012). As suas diferentes combinações genéticas (ou seja, os halótipos) têm um efeito importante sobre a composição e PCL (Frederiksen et al., 2011b).

As três principais proteínas presentes no soro são a β -LG, a α -LA (ver figura 2) e a albumina do soro, representando, aproximadamente 50%, 20% e 10% do total de PS, respetivamente. A parte restante é composta por imunoglobulinas e quantidades vestigiais de diversas outras proteínas, incluindo enzimas (Hallén, 2008). Tanto a β -LG como a α -LA são nutricionalmente melhores que a CN, devido ao seu maior conteúdo de aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano (Castilho, 2008). As

restantes proteínas do soro apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo (Sgarbieri, 2005).

Figura 2: a) Estrutura da β -Lactoglobulina; b) Estrutura da α -Lactalbumina



Fonte: Veiros (2005)

Embora algumas pessoas sejam hipersensíveis à proteína do leite (alergia ao leite de vaca), este contém um elevado valor nutricional, devido aos seus aminoácidos, utilizados para um grande número de funções biológicas essenciais, ou seja, para o crescimento e manutenção do corpo, e para a construção e reparação dos músculos (Schopen et al., 2010).

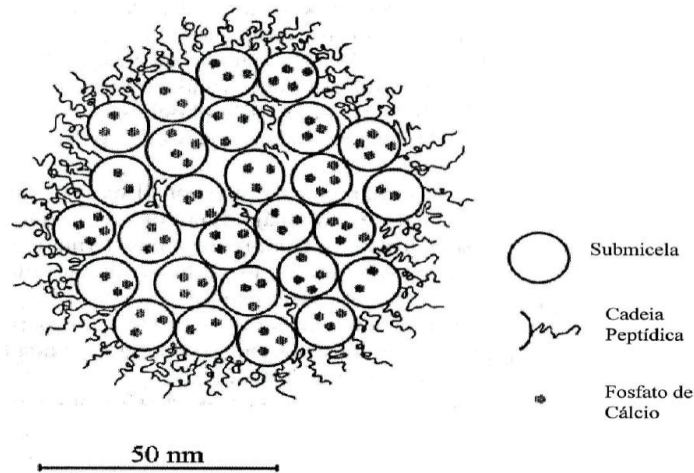
1.2.1. Caseína

A caseína (do latim "caseus", queijo) é uma proteína micelar do tipo fosfoproteína, devido à presença de P, encontrada no leite fresco (Castilho, 2008). As CN caracterizam-se por uma escassa solubilidade a pH 4,6. pH no qual precipitam, com exceção de alguns derivados proteolíticos (Veiros, 2005).

A CN é secretada pelas células alveolares na forma de micelas (Figura 3), que são agrupamentos de várias moléculas de CN ligadas a íões como o fosfato de cálcio (Jensen

et al., 2012) e cuja principal função é fluidificar as moléculas de CN e solubilizar o Ca e o P (Hallén, 2008).

Figura 3: Corte transversal de uma micela de CN, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de cálcio coloidal e os peptídeos de κ -CN, recobrando a superfície da micela (Walstra, 1999)



Fonte: Citado em Veiros (2005)

A CN encontra-se no leite como uma emulsão dessas partículas (micelas), de modo que a região hidrófoba (apolar) fica no interior e a região hidrófila (polar) na superfície exposta à água. Contém um número razoavelmente alto de peptídios de prolina, que não interagem e não apresenta nenhuma ponte dissulfeto. Por apresentar uma exposição das porções hidrofóbicas das submicelas, há uma associação dessas, assim a conformação micelar torna-se insolúvel em água. As CN das micelas juntam-se através de íons de Ca e interações hidrofóbicas (Castilho, 2008). Apresenta-se como uma proteína globular de conformação quaternária e anfipática e, por contar com poucas ou quase nenhuma estrutura secundária e terciária, apresenta uma maior resistência ao efeito do calor (Castilho, 2008). A estrutura aberta e flexível confere-lhe uma excelente propriedade surfactante na formação de emulsões e espuma, de géis e resistência térmica à desnaturação (Castilho, 2008). A estrutura das micelas de CN é essencial na transformação de leite em produtos gelatinosos, como queijo e iogurte, e a sua estabilidade durante o aquecimento, congelamento e secagem tornam-na valiosa em diferentes aplicações (Glantz et al., 2010).

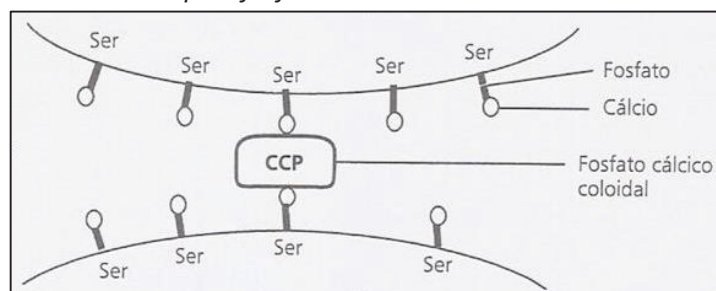
Além da função nutricional, a CN é o meio pelo qual grande quantidade de Ca pode passar pelo epitélio mamário sem provocar problemas de calcificação. Esta função impõe limites à sequência primária da proteína, influenciando a sua conformação em solução e a sua organização com o fosfato de cálcio (Oliveira e Timm, 2007).

As micelas de CN constituem agregados relativamente grandes, possuindo aproximadamente 7% de fosfato de cálcio e pequenas quantidades de citrato. A principal força de formação das micelas em solução aquosa é o efeito hidrofóbico, assim todos os fatores que promovem interações hidrofóbicas, como aumento da temperatura e adição de alguns sais, facilitam a organização das CN em micelas. A natureza e estrutura das micelas de CN têm sido extensivamente estudadas, mas a sua estrutura exata permanece em debate (Oliveira e Tim, 2007).

A presença dos grupos fosfoseril confere às CN grande afinidade relativamente ao Ca. Quando estes estão presentes em grande quantidade, como sucede nas CN α_s e β , encontram-se agrupados, possuindo a cadeia peptídica segmentos com características muito diferentes. Resultando numa distribuição heterogénea das cargas e dos referentes graus de hidrofobicidade existindo zonas da cadeia peptídica com carácter ácido e hidrófilo muito vincado. Estas aglomerações de cargas negativas conferem às CN uma das suas principais propriedades: o poder de fixação do Ca (Bandeira, 2010).

A micela é composta por subunidades, designadas de submicelas, associadas entre si através do fosfato de cálcio coloidal (Figura 4). A estrutura destas subunidades não é uniforme, apresentando uma zona interna hidrófoba, formada pelos componentes apolares das CN, e uma zona externa, formando um invólucro polar, constituído pelos resíduos fosfoseril das CN α_{s1} , α_{s2} e β e pela componente COOH terminal da κ -CN. As submicelas agregam-se entre si por meio do Ca e do fosfato mineral formando a micela. Esta agregação é favorecida pela presença de resíduos fosfoseril, situados no invólucro das submicelas, visto possuírem afinidade relativamente ao Ca e ao fosfato de cálcio (Bandeira, 2010).

Figura 4: Representação esquemática da união de duas submicelas pelo fosfato de cálcio coloidal



Fonte: Adaptado de Bandeira (2010)

A CN é formada por uma junção de submicelas, principalmente, por α_{s1} -CN, sem cisteína e mais suscetível ao efeito de proteases; α_{s2} -CN, uma submicela altamente hidrofílica, fosforilada e com grande sensibilidade ao Ca ionizável; β -CN, que apresenta uma maior quantidade de prolina e pode se tornar mais aberta a baixas temperaturas, ficando mais suscetível ao efeito de proteases; κ -CN, micela de pequeno tamanho, extremamente forte e de difícil solubilização. Sofre pouco efeito do Ca livre, é a principal submicela responsável pela característica de estabilidade proteica e Y-CN, que é o resultado da ação proteolítica sobre a β -CN. Cada uma tem uma proporção variada (Quadro 3), sendo que as submicelas se diferenciam a partir da sua composição de aminoácidos (Machado, 2010).

Quadro 3: Composição de caseína no leite de vaca

Frações das caseínas	% na quantidade total de caseína
α_{s1}	36
α_{s2}	9,5
β	33
K	9,4
Y	6,8

Fonte: Adaptado de Veiros (2005)

As estruturas terciárias das CN ainda não foram completamente determinadas. Em contrapartida, as proteínas do soro apresentam-se como moléculas individualizadas, solúveis, com estruturas terciárias já bastante conhecidas. Dentro de cada grupo de CN

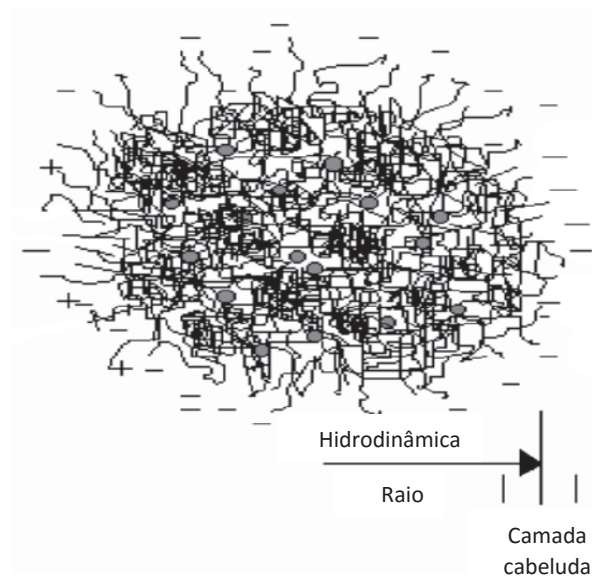
aparecem ainda variantes genéticas, que são mutações que ocorreram na estrutura primária, nas quais um, ou mais aminoácidos, foram substituídos por outros na sequência primária da cadeia polipeptídica (Sgarbieri, 2005).

Nas últimas três décadas, têm vindo a ser propostos numerosos modelos para a estrutura das micelas de CN. A maioria enquadra-se numa de três categorias gerais: (1) modelo núcleo-córtex, baseado originalmente em estudos da solubilidade da CN em soluções com Ca^{2+} , (2) modelo das submicelas, baseado na influência do tratamento com ureia e oxalato sobre a rutura das micelas, e (3) modelo de estrutura interna, baseado nas propriedades de cada componente isoladamente, causando ou direcionando a formação da estrutura interna das micelas de CN (Oliveira e Timm, 2007; Phadungath, 2005).

Nos últimos anos tem ganhado suporte a estrutura proposta por Walstra (1999) (Figura 3), com as seguintes características: a) a micela apresenta-se essencialmente esférica, contudo a sua superfície não se apresenta lisa; b) é formada por unidades menores denominadas de submicelas, contendo principalmente CN, mas apresenta uma composição mista; c) as submicelas variam em composição, existindo particularmente dois tipos principais, isto é, um tipo formado pelas CN α_s , β e κ e outro formado pelas CN α_s e κ ; d) as submicelas parecem permanecer ligadas por aglomerados (clusters) de fosfato de cálcio; e) dessa forma, as submicelas agregam-se até à formação completa da micela, em que a κ -CN se posiciona na sua superfície; f) a porção C-terminal da κ -CN (glicopeptídio) projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne, por repulsões estéricas e eletrostáticas, qualquer agregação posterior de submicelas. Nas micelas de CN, a Auto associação molecular depende muito da temperatura do meio, do pH e da concentração do ião Ca (Sgarbieri, 2005). O tamanho das micelas, o conteúdo e a distribuição dos iões das CN são importantes para as PCL, como o tempo de coagulação e firmeza da coalhada (Frederiksen et al., 2011b).

No “modelo cabeludo” da micela de CN proposto por Holt (1994) (Figura 5), uma teia emaranhada e uma estrutura aberta de cadeias polipeptídicas reticuladas pelo fosfato de cálcio coloidal, no núcleo, originam a uma região externa do segmento de menor densidade conhecida como “camada cabeluda”. Na figura 5 os círculos cinza representam os nanoclusters de fosfato de cálcio (Phadungath, 2005).

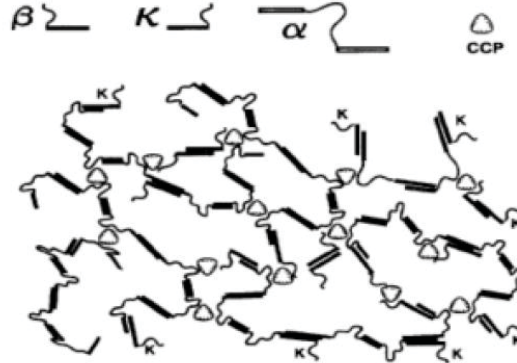
Figura 5: Modelo esquemático da secção de uma micela de caseína (Holt, 1994)



Fonte: Citado em Phadungath (2005)

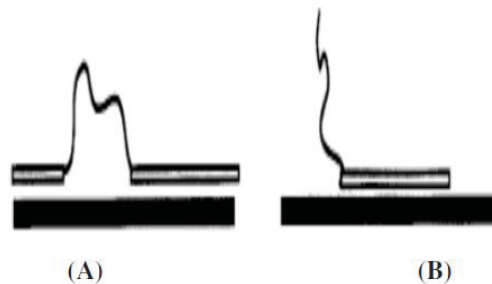
Do ponto de vista de Walstra (1999) (Figura 3), Holt (1994) (Figura 5) e Horne (1998) (Figuras 6, 7 e 8) nem a micela de CN, nem as submicelas devem ser entendidas como sendo esferas perfeitas, rígidas e idênticas. As verdadeiras micelas terão, provavelmente, uma estrutura intermédia entre os modelos de Palestra, Holst e Horne. Todos os modelos apresentados são úteis para explicar a formação, estrutura e propriedades das micelas de CN e, especialmente, a sua reação a mudanças nas condições de processamento do leite (Phadungath, 2005).

Figura 6: Modelo de dupla ligação da estrutura micelar com α -, β - e κ -caseína. O vínculo entre as regiões hidrofóbicas, mostrado com as barras retangulares, e as ligações das regiões hidrofílicas contendo “clusters” de fosfoserina e “clusters” de fosfato de cálcio coloidal. K representa a continuação do crescimento da estrutura limite das moléculas de κ -caseína (Horne, 1998)



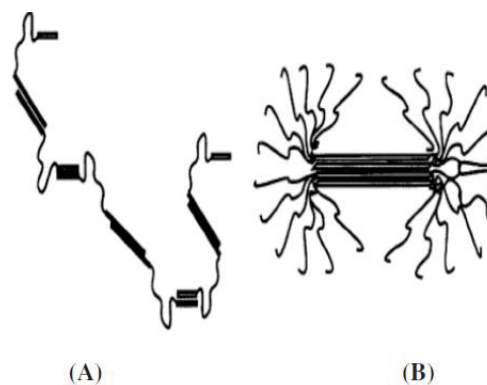
Fonte: Citado em Phadungath (2005)

Figura 7: Conformações de (A) α_{s1} -caseína com um “train-loop-train” e (B) β -caseína com uma estrutura “tail-train” absorvida nas interfaces hidrofóbicas (Horne, 1998)



Fonte: Citado em Phadungath (2005)

Figura 8: Estruturas poliméricas de (A) α_{s1} -caseína e (B) β -caseína, mostrando as ligações através da interação hidrofóbica (Horne, 1998)



Fonte: Citado em Phadundath (2005)

A κ -CN distingue-se das restantes pela presença de glúcidos. Esta CN possui uma cadeia peptídica, cuja estrutura primária apresenta duas regiões com características diferentes (Bandeira, 2010). Diferentemente das outras CN, a κ -CN é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina, sendo estável na presença de íões de Ca e assumindo um papel importante na estabilidade da micela. O fosfato de cálcio atua como um agente de fixação, mas se não houver κ -CN, que se localiza na superfície da micela, com a zona hidrofóbica da molécula ligada a esta, enquanto a porção hidrofílica forma uma capa de filamentos altamente hidratados que se projetam na fase aquosa, a agregação continuará até à formação de um gel ou de um precipitado. Os filamentos de κ -CN são os responsáveis pela estabilidade esteárica das micelas. Estudos recentes demonstraram que o peptídeo N-terminal da κ -CN apresenta uma estrutura helicoidal irregular, que pode contribuir para a estabilidade da CN (Oliveira e Timm, 2007).

A capacidade das micelas de CN permanecerem em solução no pH natural do leite (~6,7) depende da carga negativa e das características hidrofílicas da extremidade C-terminal da κ -CN na superfície micelar. As micelas de CN e os glóbulos de gordura conferem ao leite a maioria das suas características físicas. Assim como, o sabor e gosto dos produtos lácteos (Hallén, 2008).

A κ -CN é insensível ao Ca e estabiliza as outras CN fosforiladas perante este catião. Possui também a notável propriedade de ser proteolizada pelo coalho ao nível dos ácidos aminados 105(Phe) e 106(Met), o que provoca a CL. Sobre este ponto desempenha um papel fundamental ao nível da indústria queijeira (Luquet, 1985).

A CN forma uma rede de gel que retém a gordura e outros constituintes do queijo, de modo a formar a coalhada. Por conseguinte, pode argumentar-se que o teor de CN do leite determina o limite superior da produção de queijo. Além disso, a capacidade de CL é um fator importante, que determina a proporção de leite que é convertido em queijo (rendimento queijeiro). O teor de CN e as PCL são, portanto, fatores cruciais na produção de queijo. Cerca de 40% da variação das PCL e 35% da variação do teor de CN é de origem genética (Tyrisevä et al., 2004).

1.2.2. Fatores que afetam a estabilidade micelar das caseínas

As micelas de CN podem ser desestabilizadas por inúmeros fatores, alguns são industrialmente importantes como a hidrólise enzimática da κ -CN, temperatura, pH, excesso de Ca^{2+} e adição de etanol (Oliveira e Timm, 2007).

As condições que favorecem a agregação das micelas de CN são bem conhecidas, no entanto, os fatores que promovem a sua dissociação ainda não foram completamente compreendidos, sendo necessária a continuidade de pesquisas nesta área (Brasil, 2013a).

A estabilidade da micela de CN depende da presença da κ -CN na sua superfície, a qual se constitui na fração hidrofílica da CN, que reage com a água e impede a agregação das micelas. A estabilidade esteárica gerada pela relativamente esparsa camada externa em forma de escova é o fator estabilizante mais importante. A quantidade de fosfato de cálcio associado às micelas aumenta com o aumento da temperatura e ocorre dissociação da κ -CN, diminuindo a sua estabilidade (Oliveira e Timm, 2007). A CL leite por aquecimento prolongado a altas temperaturas é uma consequência da perda de estabilidade das micelas de CN, como resultado de numerosas mudanças físicas e químicas dos seus componentes (Brasil, 2013b).

Tem sido demonstrado que o leite com alta concentração de κ -CN contém micelas mais pequenas, quando comparado com o leite com baixa concentração de κ -CN (Hallén, 2008). As micelas de CN de maior tamanho são menos resistentes ao aquecimento do que micelas de menor diâmetro, devido ao menor conteúdo de κ -CN, o que as torna mais suscetíveis ao Ca^{2+} (Brasil, 2013b; Machado, 2010) que, em quantidades elevadas, diminui consideravelmente a capacidade da CN em manter a sua estrutura física, causando uma desestruturação micelar e consequente aumento da hidrofobicidade, o que determina maior agregação das micelas (Brasil, 2013b). Com a ação do calor, as modificações mais relevantes dão-se no deslocamento do Ca da forma solúvel para a forma coloidal, afetando o tamanho da micela e reduzindo a força de repulsão; na formação do complexo β -LG/ κ -CN; e na modificação da superfície micelar e redução do pH por formação de ácidos orgânicos a partir da decomposição da lactose (Machado, 2010).

O tamanho das micelas varia entre os regimes alimentares e vacas individuais, mas também entre temporada, com micelas de tamanho menor no Verão, em comparação com o observado no Inverno. No entanto, vários estudos indicam também grande influência da composição do leite no tamanho micelar, demonstrando-se que o conteúdo de CN e proteínas do soro afeta o tamanho das micelas, ao contrário do conteúdo em Ca e fosfato inorgânico. Além disso, o tamanho das micelas é influenciado por variações genéticas de proteínas, a maior parte de todas no teor de κ -CN. Micelas de menor tamanho revelaram formar géis mais fortes, quando o leite mal coagulado foi excluído da análise. O pH do leite, o seu teor em Magnésio (Mg) e Potássio (K) também tiveram efeitos sobre o tamanho das micelas de CN, o que pode implicar que a seleção para menores micelas de CN e menor pH do leite, aumentaria as propriedades de gelificação e assim, otimizaria o passo inicial para o processamento de queijo. No entanto, mais estudos são necessários para obter informações específicas sobre os genes que estão associados a essas características (Glantz et al., 2010).

Para pH abaixo de 6,2 a estabilidade térmica do leite é mínima, uma vez que a quantidade de Ca iónico aumenta, aumentando a hipótese de ocorrer precipitação. Esta acidificação reduz a carga e a hidratação das proteínas e as ligações que mantêm as micelas de CN juntas são mais fracas e escassas a pH 5,2 ou 5,3 (Brasil, 2013b). A pH inferior, com o aumento da atração electrostática entre as moléculas de CN, as micelas mantêm-se mais fortemente agregadas; a pH superior, uma quantidade crescente de fosfato de cálcio coloidal faz o mesmo (Oliveira e Timm, 2007).

Os leites mamíticos e do final da lactação têm três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da lactação. O fator responsável por este efeito é o aumento no pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e iões, uma vez que a mamite altera a permeabilidade vascular das células secretoras de leite, afetando o seu equilíbrio salino. Os lisossomas das células somáticas contêm enzimas proteolíticas, dentre as quais a catepsina D, que pode produzir para- κ -CN e caseínomacropeptídeo (CMP) a partir de hidrólise enzimática da CN, realizada por endopeptidases, que hidrolisam a ligação peptídica entre a fenilalanina e a metionina da cadeia peptídica da κ -CN (Brasil, 2013a).

A adição de etanol ao leite induz várias alterações nas micelas, entre elas, o colapso da região C-terminal proeminente da κ -CN, levando à redução da repulsão estérica intermicelar e do potencial hidrodinâmico das micelas; o pKa dos resíduos de glutamato e aspartato é aumentado, enquanto os resíduos alcalinos lisina, arginina e histidina não são afetados, o que leva à diminuição da carga negativa na superfície das micelas; a redução na solubilidade do Ca e do fosfato associados às micelas de CN. A redução na carga micelar e a precipitação do fosfato de cálcio colaboram para a redução da estabilidade micelar da κ -CN (Oliveira e Timm, 2007).

Foi demonstrado que um polimorfismo na expressão do gene da κ -CN afeta a estabilidade do leite ao etanol. O leite obtido de vacas que apresentam predominância na expressão do alelo B do gene da κ -CN em relação ao alelo A precipitou frente a concentrações de etanol significativamente maiores que as requeridas para precipitar o leite de vacas com expressão similar para os alelos A e B (Oliveira e Timm, 2007).

A prova do álcool pode ser usada como método rápido para determinar a estabilidade das proteínas do leite, verificando a estabilidade da CN, criando uma situação de stress à proteína, por meio de uma solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pelo processamento térmico. O leite instável ao álcool é rejeitado pela indústria de laticínios, pois sendo a CN instável, o aumento da temperatura durante o processamento térmico pode promover a CL quando indesejável (Brasil, 2013a).

A concentração de citrato afeta o conteúdo de Ca solúvel e a estabilidade do leite. O citrato sequestra o Ca^{2+} , reduzindo o Ca disponível para unir-se com a CN e estabiliza as micelas, evitando a sua agregação (Oliveira e Timm, 2007). O aumento de Ca^{2+} no leite diminui, consideravelmente, a capacidade da CN em manter a sua estrutura física, causando uma desestruturação micelar e consequente aumento da hidrofobicidade, o que determina uma maior agregação das micelas (Brasil, 2013a).

O armazenamento do leite em tanques refrigerados e a receção da matéria-prima a cada 48 horas aumentam as chances de multiplicação de bactérias psicotrópicas proteolíticas, que se desenvolvem a baixas temperaturas (0°C a 15°C), produzindo enzimas termoestáveis que podem atuar sobre a κ -CN, resultando na desestabilização

das micelas e na CL. A ação das proteases de psicotrópicos é distinta entre as frações proteicas do leite, sendo a κ -CN mais suscetível à ação destas enzimas, enquanto as proteínas do soro são resistentes ao seu ataque (Brasil, 2013b).

1.2.3. Polimorfismo Genético das Proteínas do Leite

Em adição às diferenças na expressão fenotípica das mutações genéticas, as propriedades físico-químicas do leite podem diferir entre polimorfismos genéticos. O polimorfismo genético pode ser definido como a existência, numa população de dois ou mais nucleótidos alternativos numa dada posição do genoma. Substituições únicas de um nucleótido em sequências regulares de um gene podem originar diferenças quantitativas no produto do gene e a mudanças nos aminoácidos (Hallén, 2008). Variâncias estruturais de uma proteína são causadas por mutações, conduzindo à substituição ou eliminação de um ou vários aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. Primeiro descoberto em 1955 para a β -LG, o polimorfismo tem sido desde então estabelecido em todas as principais proteínas do leite (Hallén, 2008). O polimorfismo genético das proteínas do leite tem sido associado com a composição, características de produção, e propriedades tecnológicas do leite (Wedholm et al., 2006).

A β -LG representa cerca de 12% da proteína total no leite bovino, e consiste numa sequência de 162 resíduos de aminoácidos. Contudo, desde a descoberta dos alelos A e B da β -LG, o polimorfismo genético desta proteína tem sido foco de investigações, pela sua relação com características tecnológicas e de composição do leite, já que diferenças entre esses genótipos podem alterar a estrutura primária das proteínas e resultar em alterações das suas propriedades físico-químicas (Botaro et al., 2007). A expressão dos genes polimórficos da β -LG está relacionada com alterações das características físico-químicas da micela de CN e, conseqüentemente, com as propriedades tecnológicas do leite, já que tal proteína está positivamente associada à estabilização da micela (Botaro et al., 2007). A concentração de β -LG é maior no leite com o genótipo AA do que com AB ou BB, o que resulta num número mais baixo de CN no leite com o genótipo AA (Wedholm et al., 2006).

As CN são codificadas por genes altamente polimórficos, que estão intimamente ligados e agrupados no cromossoma bovino 6 (Frederiksen et al., 2011b). Tem sido sugerido que as forças de repulsão entre as micelas de CN contendo variantes como o α -CN C, β -CN B, e κ -CN B, nas quais a substituição dos aminoácidos resulta numa rede com carga negativa mais baixa, têm diminuído comparativamente com micelas contendo variantes de proteína mais carregadas negativamente, facilitando assim a agregação. Além dos efeitos do polimorfismo na parte codificante do gene na estrutura da proteína resultante, acredita-se que o polimorfismo nas regiões não codificantes dos genes de proteínas do leite pode afetar a transcrição da proteína (Hallén, 2008).

Em geral, o alelo B da κ -CN tem sido associado a uma concentração mais elevada de κ -CN no leite, comparativamente, ao alelo A, e também a uma maior relação entre o total de proteína e CN. O alelo E tem sido associado a um conteúdo mais baixo de κ -CN, comparativamente, ao alelo B e, possivelmente, também ao A. Vacas com o alelo B da β -CN produzem leite com concentrações aumentadas de proteína total e β -CN. A influência das variantes das PL nas suas propriedades de coagulação deve-se, geralmente, à sua associação com uma composição proteica alterada. O alelo B da κ -CN tem sido associado com propriedades mais favoráveis de coagulação, ao passo que o alelo A tem sido associado a tempos de coagulação mais longos e coalhadas menos firmes, por outro lado, o alelo E tem sido associado a PCL mais pobres. Os efeitos das diferentes variantes da κ -CN sobre as PCL também ocorrem em relação ao rendimento de queijo (Hallén, 2008).

1.2.4. Importância das proteínas do leite para a Indústria Alimentar

As proteínas do leite constituem ingredientes altamente valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Do ponto de vista nutritivo e industrial, as CN e as proteínas do soro são as proteínas do leite com mais ampla aplicação e maior valor económico (Sgarbieri, 2005). Do ponto de vista funcional, diversas descobertas científicas têm demonstrado as múltiplas e importantes propriedades funcionais das proteínas do leite. As suas aplicabilidades são variadas e os efeitos fisiológicos altamente benéficos. Devido à sua importância comercial, as

proteínas do leite têm sido extensivamente estudadas e são, provavelmente, uma das melhores fontes de proteína alimentar (Brasil, 2013a).

As propriedades nutritivas e tecnológicas das proteínas do leite derivam da sua composição em aminoácidos, em particular os essenciais, que bastam à maioria das exigências fisiológicas do ser humano e das suas propriedades físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de grande interesse tecnológico como: solubilidade, adsorção e retenção de água e de gordura, capacidade para formar espuma e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade da espuma, gelificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (Silva et al., 2012; Sgarbieri, 2005). Em larga medida, a composição das proteínas do leite determina o seu valor nutritivo e propriedades tecnológicas (Frederiksen et al., 2011b).

A composição das proteínas do leite desempenha um papel importante na rentabilidade da indústria de laticínios. Proteínas específicas contribuem para a produção de produtos lácteos específicos. A proporção entre CN e proteínas do soro afeta as características biológicas e tecnológicas do leite, uma vez que as suas diferentes proteínas possuem comportamentos distintos frente aos diversos processos empregados na fabricação de produtos lácteos (Tavanti et al., 2009).

O rendimento do queijo aumenta com a concentração de CN, e as suas propriedades tecnológicas, como o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada dependem, principalmente, da composição e distribuição de CN, por outro lado, a β -LG é importante para a estabilidade do leite ao calor (Frederiksen et al., 2011b; Jõudu et al., 2009).

A composição do leite é fundamental para o fabrico de queijo, não apenas no que se refere ao seu teor de gordura, sendo que quanto mais gordo for o leite, maior a probabilidade de se obter um melhor rendimento na fabricação, uma vez que os glóbulos de gordura são aprisionados pela coalhada no momento em que o leite coagula, mas, principalmente, devido ao seu teor proteico, visto que a coalhada é formada por uma rede ou entrelaçado proteico, constituído basicamente de CN e Ca. Se o teor de CN for baixo, mesmo que o teor de gordura seja alto, o rendimento será menor

que o esperado. Visto que haverá uma menor quantidade de CN a ser incorporada no queijo e uma maior perda de gordura no soro (Hallén, 2008).

Nas últimas décadas, o foco da produção de leite tem incidido, sobretudo, nos quilogramas de proteína produzidos, independentemente da composição e proporção dos seus diferentes tipos. Um efeito direto da diminuição de nível da CN é a necessidade de uma maior quantidade de leite para produzir a mesma quantidade de queijo (Hallén, 2008).

Apesar das proteínas do leite serem, entre as proteínas alimentícias, as mais estudadas, ainda existem aspetos fundamentais relativos às estruturas e às relações estruturas-funções, tanto das CN como das proteínas do soro que ainda não foram totalmente compreendidos. A falta de um conhecimento mais completo das diferentes estruturas, como estas se alteram em diferentes condições de acidez (pH), de concentrações salinas (força iónica) e de temperatura, torna difícil a interpretação de como as proteínas do leite interagem entre si e com outras espécies moleculares que compõem os alimentos. Dessa forma, torna-se difícil explicar as variações observadas nas suas propriedades físicas, tecnológicas, nutritivas e fisiológicas, em razão dos vários fatores presentes no processamento, armazenamento e distribuição dos produtos lácteos para consumo. Estas dificuldades explicam e justificam o continuado interesse no estudo das propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite (Sgarbieri, 2005).

A estabilidade das proteínas do leite é um fator importante para garantir adequadas condições de processamento, aumentar o tempo de prateleira dos produtos lácteos e proporcionar uma maior qualidade alimentar ao consumidor final, uma vez que a elevada estabilidade térmica das principais proteínas do leite, as CN, possibilita a produção de derivados lácteos submetidos a processamentos de alta temperatura. No entanto, alguns fatores causam a desestabilização da estrutura micelar, com consequente precipitação das CN do leite (Brasil, 2013a).

A facilidade das CN do leite em coagular para a produção de queijo, quando são empregues ácidos ou enzimas, constitui a principal característica necessária para esta tecnologia. A coagulabilidade do leite pode ser utilizada para avaliar a conformidade da

matéria-prima e para a produção de queijo de melhor qualidade, em menor tempo ou com maior rendimento. Esta é uma propriedade que vem sendo estudada e o seu emprego proposto como umas das avaliações do leite na receção, em paralelo ao teste do álcool e estabilidade térmica (Harzia et al., 2013).

1.3. Fatores que Afetam a Qualidade do Leite

A qualidade do leite é avaliada através de variadíssimas provas, umas mais expeditas e rudimentares, outras mais rigorosas. É evidente que a qualidade higiénica é, de todas, a mais exigível, mais cara, e mais importante, pois é ela que pode, por si só, reprovar o leite para qualquer fim (Gomes, 2012).

A qualidade físico-química visa, principalmente, o valor alimentar ou rendimento industrial, muito importante do ponto de vista dietético e económico. O exame da qualidade do leite tem como principais objetivos calcular os rendimentos industriais, a partir dos valores de extrato seco total ou isento de gordura; estabelecer os preços do leite de acordo com a sua riqueza em gordura, CN ou sólidos totais não gordos; classificar o leite segundo a sua qualidade higiénica, quer através de critérios de apreciação expedita, ou de outros de rigor laboratorial; detetar o uso ilegal de conservantes e substâncias adulterantes, ou detetar a prática de certas fraudes (adição de água, por exemplo); detetar a presença de antibióticos, provenientes da terapêutica veterinária, os quais prejudicam o fabrico de lacticínios fermentados, tais como iogurte e queijo e detetar a mistura de leites de várias espécies (vaca, ovelha e cabra) (Gomes, 2012).

A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição do leite, de suma importância na sua coagulação, interferindo no tipo de coágulo obtido, dificultando ou impedindo que o leite coagule. Este fator interfere na qualidade do produto final e no rendimento da produção, causando grandes prejuízos às indústrias (Castilho, 2008).

O leite é um alimento estável em condições normais de temperatura ou refrigeração (Brasil, 2013a). A sua durabilidade é limitada pela presença e multiplicação de microrganismos, que causam modificações físico-químicas. A qualidade do leite que

chega à indústria de processamento é determinada pela qualidade do leite que sai da ordenha. Mesmo após a pasteurização, as enzimas produzidas pelos microrganismos estarão presentes nos produtos lácteos e continuarão a exercer a sua ação de degradação dos componentes do leite. Portanto, todos os esforços devem ser feitos para assegurar que o leite produzido seja de alta qualidade (Venturini et al., 2007).

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a quantidade, composição e qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a genética, a raça, o período de lactação, o número de parições, a dieta e o estado de saúde do animal. Os fatores extrínsecos são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto após a sua produção, como o manuseamento e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de arrefecimento, o transporte e o armazenamento do leite antes do seu processamento, fraudes e adulterações (Brasil, 2013b; Tavanti et al., 2009).

A raça das vacas influencia o conteúdo quantitativo de CN, gordura, Ca e fosfato, o genótipo de CN e acidez, determinando assim a capacidade de coagulação e o comportamento tecnológico do leite como matéria-prima para a produção de queijo, a sua eficiência de transformação (variações de gordura e CN), bem como a qualidade do produto final (Hoxha and Mara, 2012).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite é um indicativo da prevalência de mamites e da qualidade da composição do leite. São consideradas células somáticas, todas as células do organismo, menos as germinativas, sendo formadas, principalmente, por células de defesa, principalmente neutrófilos, que migram do sangue para a glândula mamária, com o objetivo de combater qualquer tipo de agente agressor (Machado, 2010). Explorações com CCS baixas apresentam menores perdas na produção e produzem leite com melhor qualidade, tanto do ponto de vista nutricional, quanto do processamento. Adicionalmente, utilizam menos antibióticos para tratamento de mamites durante a lactação, apresentando menor risco de contaminação do leite com resíduos. O leite com alta CCS possui atividade enzimática elevada, devido aos teores de plasmina, o que contribui para o aumento da proteólise e lipólise, tanto antes da ordenha, como após a ordenha e durante o armazenamento (Brasil, 2013a).

Como resultado da resposta inflamatória durante a mamite são observadas intensas mudanças nas concentrações, tanto dos principais componentes (proteína, gordura e lactose), quanto dos componentes encontrados em menores níveis no leite (como minerais e enzimas) (Machado, 2010; Santos, 2003). Estas mudanças na composição do leite ocorrem devido à redução dos seus componentes que são sintetizados na glândula mamária, como a proteína, gordura e lactose. O efeito da mamite sobre a concentração total de proteína é variável. Entretanto, devido ao aumento do influxo de proteína de origem sanguínea (ex.: imunoglobulinas e soro albumina bovina) e à concomitante diminuição da síntese de proteínas nas células epiteliais, o efeito geral é de manutenção dos níveis de proteína total, relativamente constante, ou de mudanças muito pequenas. Devido à sua grande importância económica, o impacto do aumento da CCS no leite sobre a qualidade e rendimento do queijo tem sido extensivamente estudado (Santos, 2003).

A qualidade tecnológica do leite é influenciada também por parâmetros como acidez ativa e titulável (Chládek et al., 2011). O pH do leite recém-ordenhado de uma vaca sã pode variar entre 6,4 a 6,8, e ser um indicador da qualidade sanitária e da estabilidade térmica do leite. Nos casos graves de mamite, o pH pode chegar a 7,5 e na presença de colostro, pode cair para 6,0 (Venturini et al., 2007).

2. Leite e produtos lácteos

O leite bovino é a base de uma grande variedade de produtos de consumo, como leite líquido, leite fermentado (por exemplo, iogurte), queijo (muitas variedades), manteiga, natas e leite condensado. O consumo de produtos lácteos constitui uma importante fonte de nutrientes, especialmente, Ca, vitamina B2 e B12, proteína, zinco, em menor quantidade de Mg, P, vitamina A, B1, B6, B11 e D, e selénio. Os produtos lácteos fornecem cerca de 15% do consumo diário de energia. A sua elevada densidade em nutrientes fornece um aporte calórico relativamente baixo, preferível na prevenção da obesidade (Schopen et al., 2010).

2.1. Queijo

Entende-se por queijo o produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoração do leite, total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído, assim como da nata, do leitelho e a mistura de alguns ou de todos estes produtos (incluindo lactosoro), com ou sem a adição de géneros alimentícios. É classificado de acordo com: i) o leite utilizado (de vaca, ovelha ou cabra), ii) a cura, iii) a textura ou consistência e iv) o teor de matéria gorda no resíduo seco (NP 1589, 1983).

Hoje em dia, o queijo ocupa um lugar de destaque na alimentação humana devido ao seu elevado valor nutritivo. Tem um sabor agradável, boa digestibilidade e é um produto de conservação simples, sendo considerado um alimento completo e de composição variável, pois está dependente da matéria-prima utilizada (Fonseca, 2011).

O fabrico de queijo engloba um processo complexo, que envolve várias etapas e modificações bioquímicas. Na produção de queijo podem considerar-se, de um modo geral, quatro fases: a coagulação, o dessoramento, a salga e, por fim, a cura. Estes podem variar em termos tecnológicos, permitindo obter uma enorme variedade de queijos (Moreia, 2011). Intervindo nas etapas enunciadas, o queijeiro pode controlar a composição do queijo, influenciando diretamente a maturação e qualidade final do produto (Paula et al., 2010). Outras etapas, como a pasteurização, são introduzidas no processo de fabrico com o objetivo de diminuir a variação na produção do queijo e nas suas características finais (Bandeira, 2010).

A produção de queijo é um processo de concentração do leite no qual, parte dos componentes sólidos, principalmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada, enquanto as proteínas do soro, lactose e sólidos solúveis, são removidas. O soro de leite é a porção aquosa que se separa da massa durante a fabricação convencional de queijo e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. Aproximadamente 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo resulta em soro, que contém grande parte dos sólidos representados por proteínas, sais minerais, vitaminas e, principalmente, lactose (Paula et al., 2009).

O rendimento da fabricação de queijo e a sua composição são determinados pelas propriedades do leite empregue, especialmente, pela composição e pelas etapas

do processo de fabricação. A importância da composição do leite está ligada à coagulação, firmeza da coalhada, sinérese e textura do queijo (Paula et al., 2009). A coalhada moldada pode ser consumida fresca (logo após a sua produção) ou maturada, por períodos que podem variar de duas semanas a dois anos (Law and Tamime, 2011).

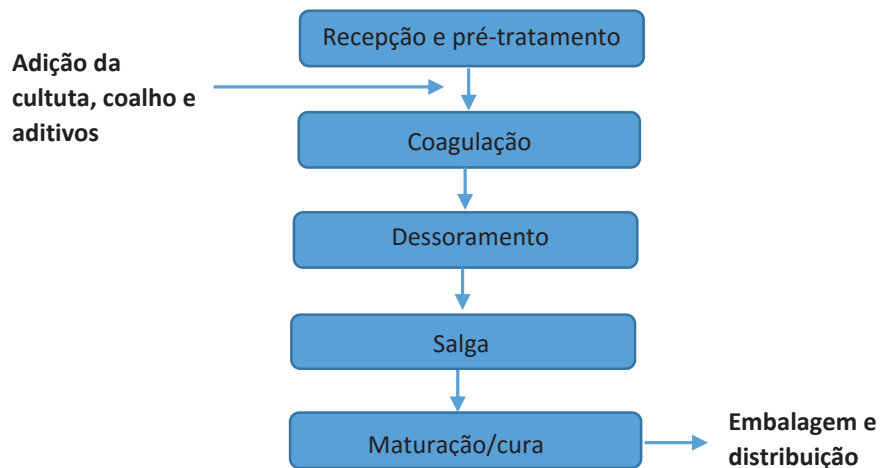
Atualmente são fabricadas mais de mil variedades de queijos no mundo, que diferem entre si quanto à origem do leite, ao processo tecnológico, ao teor de humidade e ao período de maturação, entre outros fatores (Castilho, 2008). Todas as variedades de queijo podem ser classificadas em três superfamílias, com base no método de CL: coagulação enzimática, que representa aproximadamente 75% do total dos queijos produzidos; coagulação ácida ou láctica do leite; e a coagulação mista pela combinação de aquecimento com a adição de um ácido ou um sal (Paula et al., 2009).

A quantidade de queijo produzida a partir de uma quantidade conhecida de leite é de grande importância para a indústria queijeira. Os principais fatores que influenciam o rendimento do queijo são a composição do leite, principalmente, a quantidade de gordura e CN, a percentagem de transição dos constituintes do leite para o queijo e a quantidade de humidade retida no queijo, além da incorporação de sais insolúveis e da concentração de cloreto de sódio (NaCl) adicionado à massa. Além destes fatores, os tratamentos térmicos e mecânicos aplicados ao leite e ao coágulo, também influenciam, de modo sensível, o rendimento (Ramos, 2013).

2.1.1. Principais Processos de Fabricação de Queijo

O fabrico de queijo envolve diversas fases ligadas entre si, o que significa que é necessário controlar minuciosamente cada etapa. Nem todos os fabricos são iguais e, para a obtenção de diferentes tipos de queijo existem diferenças nas fases do processo. Todos os fabricos possuem, no entanto, um conjunto de etapas que são comuns e basilares para a produção de queijo (Figura 9).

Figura 9: Fluxograma Genérico de Produção de Queijo



Fonte: Adaptado de Fonseca (2011)

2.1.1.1. *Recepção e pré-tratamento do leite*

O processo de fabrico de queijo inicia-se pela seleção de leite de boa qualidade, tanto a nível microbiológico como físico-químico. É importante ter em conta que a contaminação inicial condiciona todo o processo tecnológico de fabrico, tendo uma influência significativa nas características do produto final obtido, nomeadamente, a nível do sabor, aroma e textura da pasta (Bandeira, 2010).

O intervalo de tempo entre a ordenha e o fabrico de queijo deve ser o mais curto possível. Sempre que não seja possível laborar imediatamente o queijo, deve conservar-se o leite refrigerado (Bandeira, 2010; Nassu et al., 2006).

A filtração do leite constitui uma medida extremamente importante para a qualidade e segurança do queijo; não só remove a sujidade e as impurezas, mas sobretudo reduz a quantidade de microrganismos presentes no leite (Nassu et al., 2006).

A preparação da matéria-prima tem como objetivo obter lotes de leite homogéneos, permitindo diminuir as variações nas características do produto final. Nesta etapa do processo de fabrico, podem incluir-se diversas operações, entre as quais a pasteurização e a adição de cloreto de cálcio (Bandeira, 2010).

A adição de cloreto de cálcio ao leite, conduz ao aumento do teor em Ca e de fosfato de cálcio coloidal, a uma diminuição do pH e, conseqüentemente, a uma diminuição da estabilidade das micelas, o que favorece a atuação das enzimas do agente coagulante. Por outro lado, ocorre uma diminuição do tempo de coagulação, um aumento da firmeza do gel formado e da velocidade de agregação micelar (Bandeira, 2010).

A pasteurização do leite (72°C durante 15 segundos) é o tratamento térmico a que o leite é submetido para eliminação dos microrganismos patogénicos não esporulados, bem como os microrganismos prejudiciais ao processo de cura do queijo, proporcionando ainda alguma inativação enzimática, resultando numa maior uniformidade da matéria-prima (Bandeira, 2010).

2.1.1.2. Coagulação

Após a etapa de preparação do leite segue-se a coagulação, durante a qual ocorrem modificações físico-químicas das micelas de CN sob a ação de enzimas proteolíticas e/ou do ácido láctico, conduzindo à formação de uma rede proteica denominada coágulo (Bandeira, 2010).

A CL é um passo estritamente necessário para fazer qualquer tipo de queijo. Esta consiste em separar o leite em coalhada sólida e soro líquido, geralmente, realizada pela acidificação do leite e adição da quimosina (enzima do coalho). Alguns queijos frescos são coagulados apenas pela acidificação, mas a maioria também utiliza o coalho, o que dá uma consistência mais firme e gelatinosa ao queijo, se comparado com a frágil textura da coalhada produzida apenas pela coagulação ácida (Castilho, 2008).

O processo geral de CL consiste na formação de uma rede de proteínas agregadas, principalmente, as CN. Nesta rede encontram-se aprisionados água, gordura e outros constituintes do leite. O processo bioquímico difere entre o queijo e os produtos lácteos fermentados, onde a produção de queijo envolve a separação da CN do soro de leite, enquanto que, nos produtos lácteos fermentados, todo o leite coagulado é incluído no produto final (Moreia, 2011; Hallén, 2008).

O fabrico de queijo inicia-se pelo processo de desestabilização das micelas de CN, em especial da κ -CN, que desencadeia todo o processo de coagulação (Moreira, 2011).

Existem duas vias para induzir a agregação micelar, por ação enzimática ou por acidificação e ainda pela conjugação de ambas. O resultado destas reações é, em grande medida, determinado pela quantidade e proporção dos vários componentes do leite, com o contributo significativo da sua composição em proteínas (Hallén, 2008).

Para obtenção da coalhada é necessário adicionar ao leite uma cultura de arranque de bactérias lácticas, coalho (enzimas proteolíticas) e outros aditivos. A seleção do tipo de culturas a usar é feita em função do tipo de queijo pretendido. Este processo está dependente da temperatura, do pH e do teor de Ca do leite (Moreira, 2011).

O coalho é um dos ingredientes mais importantes no fabrico de queijo, sem o qual a maioria dos queijos não poderia ser fabricada. Exerce também uma atividade importante durante a cura, ao promover a degradação de algumas proteínas e, assim contribuir para a definição da textura e do sabor do queijo. Um dos cuidados fundamentais é o conhecimento da “força coagulante” do coalho. O poder coagulante deve ser previamente testado, assim como os riscos de transmissão de sabores amargos ao queijo. Após a adição do coalho, inicia-se imediatamente a CL (Nassu et al., 2006).

A CN do leite é semelhante, tanto na coagulação ácida como enzimática. Entretanto, o coágulo resultante apresenta características físico-químicas e tecnológicas diferentes. A primeira diferença reside na consistência do coágulo, sendo este aspeto de grande importância tecnológica. O coágulo ácido é inicialmente bastante frágil, dispersando-se facilmente em partículas finamente subdivididas. Todavia, se for fracionado cuidadosamente, o que provoca a dessora, resulta em um precipitado ressecado e firme, porém quebradiço. Já o coágulo enzimático é mais firme e elástico, semelhante a um gel de gelatina, o qual vai se tornando cada vez mais resistente e, ao ser fracionado, contrai-se por sinérese, dando origem a um precipitado consistente e elástico, isto é, não quebradiço (Castilho, 2008).

2.1.1.3. Coagulação enzimática

Na coagulação enzimática faz-se uso de enzimas coagulantes que, dependendo da sua origem, apresentam condições enzimáticas diferenciadas, tanto em quantidade (proporção das enzimas), quanto em qualidade (tipo de enzima). As enzimas utilizadas podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou de microrganismos, e podem ser usadas isoladamente ou misturadas entre si. Esta mistura de enzimas pode proporcionar, entre outros efeitos, um ajuste da taxa de proteólise durante a maturação do queijo, a um nível desejado (Castilho, 2008).

O leite que prontamente responde à presença de uma enzima de coagulação e produz uma coalhada firme resulta num maior rendimento queijeiro e tem efeitos positivos sobre todo o processo de fabricação (Sturaro et al., 2012).

O coalho ou coagulante é adicionado ao leite, normalmente, a 32-35°C em quantidade suficiente para haver a coagulação em 30 a 40 minutos. A dose de coalho ou coagulante varia de acordo com o fabricante, podendo ser usado na forma líquida ou em pó, desde que diluído em água não-clorada e adicionado lentamente ao leite sob agitação (Nassu et al., 2006).

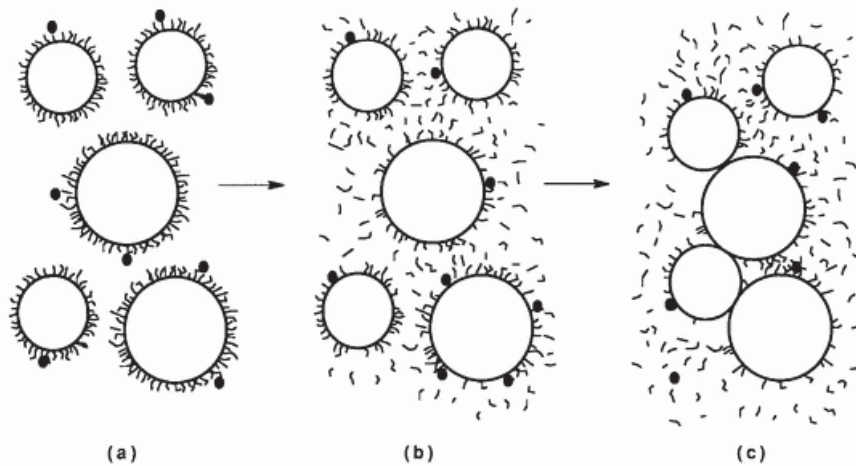
A hidrólise enzimática que ocorre na produção de queijo e/ou o tratamento térmico do leite a elevadas temperaturas resultam na remoção ou dissociação da κ -CN da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta na agregação das micelas induzida pelo Ca das micelas alteradas e na formação do coágulo (Sgarbieri, 2005). Para que isso ocorra é necessária a diminuição do pH a 4,6 (ponto isoelétrico da CN), ou seja, acidificar o leite, ficando a CN instável, tornando-se frágil a ligação entre estes aminoácidos e ocorrendo assim a lise desta ligação pela atuação da enzima do coalho (quimosina/renina) (Castilho, 2008; Nassu et al., 2006). A coalhada formada tem a aparência de um gel, que ocupa o mesmo volume do leite empregue no processo. A temperatura de coagulação depende do fermento e das enzimas do coalho (Nassu et al., 2006).

Reduzir a acidez do leite ativo de pH 6,7 para 5,8 resulta numa coagulação mais rápida e também reduz a concentração de CN levando a um encurtamento do tempo de

coagulação. Conclui-se que um aumento nas proteínas do leite, CN, frações de CN, e do número de CN diminui o tempo de CL (Chládek et al., 2011).

A CL compreende duas fases distintas, uma enzimática outra não enzimática. No fabrico de queijo estas duas fases sobrepõem-se consideravelmente. A fase enzimática corresponde a uma proteólise limitada e específica das CN, pois a única proteína que se divide é a κ -CN a nível da ligação fenilalanina 105 e metionina 106 (Phe₁₀₅-Met₁₀₆). Esta ligação é muito instável (a sua fragilidade aumenta com o aumento da cadeia de aminoácidos), daí ser a primeira ligação a ser quebrada pelas enzimas proteolíticas (Harzia, 2013).

Figura 10: Ataque esquemático pela quimosina (representada por pequenos pontos negros) sobre as micelas de caseína.

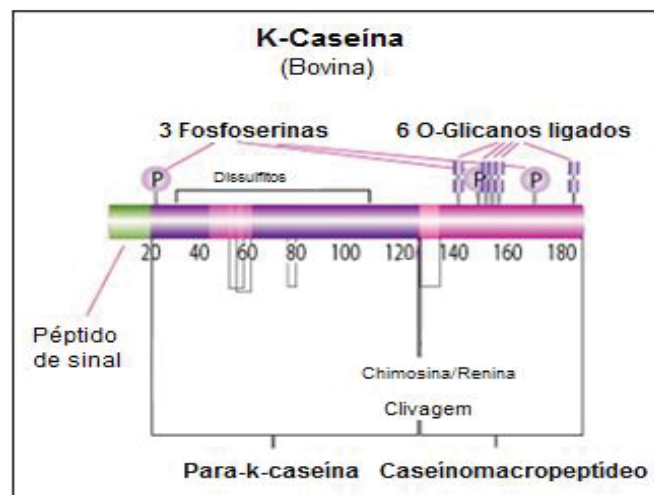


Fonte: Bandeira (2011)

Na Figura 10 ilustram-se três diferentes momentos da reação das CN ao ataque enzimático: a) o invólucro das micelas está intacto e a quimosina (representada pelos pequenos círculos a preto) acabou de ser adicionada; b) algum tempo depois, grande parte das κ -CN estão a ser hidrolisadas e uma parte do caseínomacropeptídeo está no soro, mas ainda resta o suficiente para evitar a agregação; c) mais tarde, aproximadamente quase todas as κ -CN estão hidrolisadas e as micelas começam a agregar-se. A κ -CN é então dividida pela quimosina em dois segmentos de natureza diferente, um hidrofóbico e básico, designado por para- κ -CN e outro hidrofílico e ácido,

chamado caseínomacropeptídeo (CMP) (Figura 11). O primeiro segmento peptídico fica ligado às outras CN e integrado nas micelas, enquanto o segundo se liberta e fica em solução. À medida que, se vai processando a fase de hidrólise da κ -CN vai aumentando o número de micelas modificadas e conseqüentemente a sua agregação. Constituem-se cadeias de micelas, o que leva à formação de um gel. Estas micelas vão se inter cruzando dando origem a uma rede proteica, até que se atinge um ponto em que existe suficiente κ -CN hidrolisada para que a interação entre as cadeias de micelas atinja um limite. Neste ponto, o gel é termodinamicamente instável e destrói-se, formando uma coalhada compacta quando há uma rutura física (Bandeira, 2010).

Figura 11: Ataque da quimosina, 1ª fase da Coagulação do Leite



Fonte: Sigma-Aldrich (2015)

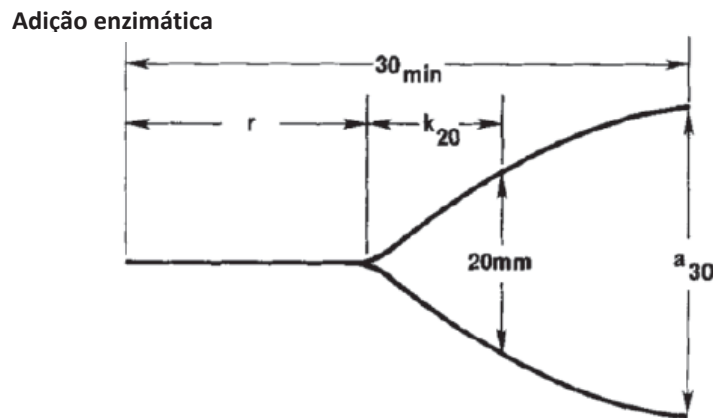
O processo de CL consiste na precipitação do sistema proteico principal (as CN) arrastando consigo as gorduras, que ficam aprisionadas no coágulo. Os restantes constituintes solúveis do leite, tais como as restantes proteínas, a lactose, algumas vitaminas e sais minerais, vão constituir o soro que será removido (Harzia, 2013).

Quando o CMP é descartado no soro de leite, a segunda fase pode ser iniciada e ocorre a agregação das micelas de CN. A agregação das micelas de CN é sensível à temperatura, uma vez que tem lugar a temperaturas de 18°C ou mais. Durante a gelificação, as micelas são reorganizadas em redes tridimensionais, permitindo que a

desidratação do leite durante o processo de fabricação de queijo produza as características desejadas (Harzia, 2013).

A primeira fase da CL pode ser medida através do tempo, em minutos, desde a adição do coalho ao leite até ao início da coagulação, que é descrito como o tempo de coagulação do coalho. A segunda etapa é, normalmente, medida como a firmeza da coalhada, 30 minutos após a adição das enzimas (Figura 12) (Harzia, 2013).

Figura 12: Diagrama do tempo de coagulação e firmeza da coalhada (tempo para a formação de uma coalhada com uma firmeza de 20 milímetros em minutos (k_{20}), e a firmeza da coalhada 30 min após a adição enzimática (a_{30})) em função do tempo, gravado através de formográfico.

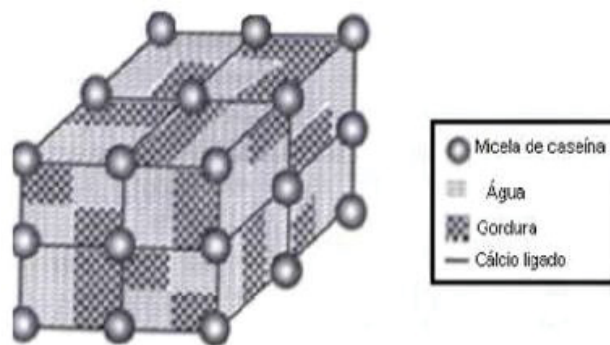


Fonte: Bittante (2011)

Para entender os fatores que envolvem a CL torna-se necessário esclarecer o mecanismo de formação da coalhada por meio de três fases. Na primeira fase da coagulação, ocorre o ataque da enzima coagulante à fração κ -CN, com consequente libertação de uma fração proteica denominada CMP. Esta fração libertada é solúvel e, por isso, perde-se no soro afetando diretamente o rendimento na fabricação de queijo. Uma proteólise mais elevada nesta fase, como ocorre com o uso de outras enzimas diferentes da quimosina, provoca a rutura de várias ligações peptídicas e uma solubilização importante das proteínas que, fatalmente, serão perdidas no soro. Isto induz a formação de coágulos com ligações de baixa tensão ou muito fracos, com consequentes perdas de sólidos para o soro da fabricação, em outras palavras, com redução do rendimento. Na sequência, observa-se a segunda fase que corresponde à

formação da coalhada, onde todos os componentes (proteínas, gordura, lactose e sais minerais) são aprisionados em uma estrutura de gel (Figura 13), a qual, após o processo de corte e demais tratamentos, dá origem aos queijos. Já a terceira e última fase corresponde à participação da enzima na maturação do queijo, evidenciando que a sua ação pode conduzir à formação de sabor amargo, quando excessivamente proteolítico. É esta proteólise limitada, comparativamente às demais enzimas, que faz da quimosina a enzima de referência para a CL. As restantes enzimas sejam de origem vegetal, microbiana ou animal, possuem uma maior atividade proteolítica, propriedade que pode conduzir a três consequências negativas; diminuição do rendimento do queijo; formação de sabor amargo; e amolecimento do queijo durante a armazenagem (Food Ingredients Brasil Nº16, 2011).

Figura 13: Modelo esquemático da coagulação do leite a nível molecular



Fonte: Castilho (2008)

Geralmente a força do coalho é medida através da sua eficácia ao romper as ligações peptídicas, ação que produz a CL. Na κ -CN existem 164 ligações peptídicas que podem ser atacadas, além de outras que existem nas outras frações da micela. O segundo papel do coalho é hidrolisar essas ligações, de acordo com uma ordem específica, que é característica da enzima utilizada. Esta ação secundária sobre as proteínas começa lentamente depois da coagulação e continua durante a maturação do queijo (Cecchinato et al, 2013).

2.1.1.3.1. Enzimas Coagulantes do Leite

O coalho e os coagulantes são preparações de enzimas proteolíticas, que têm sido utilizadas na indústria queijeira há milhares de anos, sendo esta a aplicação de enzimas mais antiga de que há memória. Historicamente, a maioria das enzimas utilizadas no fabrico de queijo eram constituídas de extratos de estômagos de ruminantes jovens, embora tenha sido observado na antiguidade o uso de alguns coagulantes de origem microbiana e vegetal (Antunes et al., 2004). Entre o vasto número de proteases com aplicação na indústria alimentar, as proteases aspárticas, tais como a quimosina, são usadas na produção de queijo há milhares de anos (Shah et al., 2013; Egipo et al., 2006).

Basicamente, todos os tipos de coalho e coagulantes disponíveis caracterizam-se pela presença de uma ou mais proteases que atuam sobre a κ -CN, promovendo a CL. Algumas destas proteases são mais proteolíticas ou menos específicas na sua ação sobre a fração proteica. As mais proteolíticas, e as proteases ácidas, além de romperem a ligação específica Met (105)-(106) Phe da κ -CN, continuam a degradar rapidamente o restante da cadeia de aminoácidos durante a etapa de CL, provocando maior perda de proteína e gordura durante o corte da coalhada (Antunes et al., 2004).

Os diferentes tipos de coalhos e coagulantes são classificados de acordo com a sua origem. O Quadro 4 apresenta os tipos de coalho e coagulantes mais comumente utilizados no fabrico de queijo, assim como os seus componentes enzimáticos ativos (Antunes et al., 2004).

Quadro 4: Principais tipos e fontes de enzimas coagulantes utilizadas na produção de queijo

Tipo de coalho	Fonte	Produtos	Componente enzimático ativo	Características tecnológicas
Animal	Estômago bovino	Coalho bovino e de vitelo	Quimosina A e B, pepsina e gástrica	Alta proporção de κ -caseína: hidrólise da caseína, máxima produtividade, textura e sabor tradicional em queijos de massa dura e semidura.
		Coalho em pasta	Idem ao coalho de bezerro + lípase pré-gástrica	Ótima coagulação e rendimento, com produção de sabor picante.
	Estômago ovino	Coalho de cordeiro, ovelha	Quimosina e pepsina	Não é amplamente utilizado; melhor uso com o leite dos animais correspondentes.
	Estômago caprino	Coalho de cabrito, cabra	Quimosina e pepsina	
	Estômago suíno	Coagulante suíno	Pepsina A e B, pepsina gástrica	
Vegetal	<i>Cynara cardunculus</i> L.	Cardo	Cyprosina 1, 2 e 3 e/ou cardosina A e B	Produzido localmente em pequena escala para queijo artesanal.
Microbiano	<i>Rhizomucor miehei</i> tipo L, TL e XL	Coagulante <i>Miehei</i>	Protease aspártica de <i>R. miehei</i>	A enzima nativa do tipo L é muito estável ao calor e proteolítica na fabricação de queijos duros; também produzido como estabilizado, TL e XL.
	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Coagulante <i>Pusillus</i>	Protease aspártica de <i>R. pusillus</i>	Propriedades semelhantes ao tipo de enzima L-miehei, porém mais sensíveis ao pH.
	<i>Criphonectria parasitica</i>	Coagulante de <i>Parasítica</i>	Protease aspártica de <i>C. parasítica</i>	Muito resistente ao calor, uso limitado a queijos de alto cozimento, como o Emmental.
FPC (Quimosina produzida por fermentação)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Chymax™ Maxiren™	Quimosina B Quimosina B	Idêntica à quimosina de bezerro em todos os aspetos.

Fonte: Adaptado de Antunes et al. (2004)

Um importante fator a ser considerado com relação ao coagulante utilizado diz respeito ao seu efeito sobre o rendimento e sobre as características sensoriais do queijo, como sabor e textura, sendo que a atividade proteolítica das enzimas exerce grande influência nesses fatores. Além da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ na κ -CN, cuja hidrólise determina a coagulação enzimática do leite, outras ligações peptídicas são hidrolisadas a taxas que variam de acordo com a enzima utilizada (atividade proteolítica não específica). As enzimas coagulantes variam amplamente com respeito à atividade proteolítica, e algumas são tão ativas a ponto de não ser possível o seu aproveitamento para a produção de queijos duros. Geralmente, os coalhos microbianos apresentam maiores atividades proteolíticas que os coalhos de bezerro e genético (Vasconcelos et al., 2004).

Na comparação do coagulante de origem animal (quimosinas e pepsinas) e de origem vegetal (cardosinas-proteases aspárticas), não se distinguem diferenças durante o processo de coagulação. No entanto, a atividade proteolítica é superior no coagulante de origem vegetal. No caso da mistura de cardosinas com quimosinas, estas não apresentam uma relação linear entre o tempo de coagulação e a concentração da enzima na CL como seria de esperar, uma vez que se estabelece uma relação de competição entre a quimosina e a cardosina pela ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Assim, uma boa enzima para o fabrico de queijo caracteriza-se por um elevado poder coagulante e baixa atividade proteolítica, isto é, a enzima deverá romper rapidamente a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -CN, mas ter pouca atividade proteolítica em relação às outras CN (Shah et al., 2013).

a) Coagulantes de origem animal: Coalho comercial

O coalho natural, renina, foi o primeiro a ser utilizado no fabrico de queijo, é uma enzima proteolítica secretada pela mucosa gástrica do quarto estômago dos bezerros, antes do desmame. Esta secreção é produzida na forma de um precursor inativo, a pró-renina, que em meio neutro não tem atividade enzimática, mas que em meio ácido transforma-se rapidamente em renina ativa. O coalho possui duas enzimas: a quimosina (88 a 94%) e a pepsina (6 a 10%). A primeira é o componente principal a qual, após o desmame, tem a sua produção reduzida, passando a pepsina a componente majoritário (Castilho, 2008).

A quimosina foi a primeira enzima estudada seguida da pepsina. Quanto mais novo for o animal, mais elevado é o teor de quimosina presente no coalho, sendo este influenciado pela dieta (Rodrigues, 2014).

Sintetizada pelas células do estômago de bezerros recém-nascidos (lactentes), a quimosina, é secretada como uma proenzima inativa chamada pró-quimosina que é ativada pela exposição a ácidos. O papel desta enzima na digestão é a de coagular o leite no estômago, processo de considerável importância em animais jovens. Se o leite não for coagulado, este poderá fluir rapidamente do estômago e perder a possibilidade de digestão das proteínas. A quimosina converte eficientemente o leite líquido em uma

solução semi-sólida permitindo que seja retida por longos períodos de tempo no estômago. A secreção da quimosina é máxima durante os primeiros dias após o nascimento e diminui depois, sendo compensado o efeito pela pepsina, a maior protease gástrica (Castilho, 2008).

A pepsina tem uma maior ação proteolítica degradando uma grande variedade de proteínas. Esta enzima começa a ser necessária quando o animal deixa de ter o leite como única fonte alimentar. Comparando as duas enzimas podemos dizer que a quimosina atua especificamente como agente coagulante apresentando um pH ótimo próximo da neutralidade (pH 6,2 a 6,4), enquanto a pepsina tem um poder proteolítico muito intenso, situando-se o ótimo de atividade em meio ácido (pH 1,7 a 2,3). Como a quimosina possui maior poder coagulante que proteolítico, é mais apropriada para o fabrico de queijo do que a pepsina. Industrialmente, estas duas enzimas são utilizadas em misturas cujas proporções variam conforme as fórmulas comerciais. Quanto maior a quantidade de quimosina na mistura melhor será o coalho. O facto de os coalhos não acusarem grande poder proteolítico, apesar de possuírem pepsina, deve-se em parte à baixa de concentração desta e por outro, à sua fraca atividade por atuar longe do seu pH ótimo (Castilho, 2008).

Devido ao aumento significativo da produção de queijo em todo o mundo, à diminuição de bezerros abatidos e ao conseqüente aumento do preço do coalho animal, e ainda a questões religiosas (por exemplo, Judaísmo e Islamismo), de dieta (vegetarianismo) ou devido à crescente preocupação do consumidor perante o aparecimento de alimentos geneticamente modificados, razão pela qual alguns países, como a Alemanha, Holanda e França, proibiram o uso de coalho recombinante, muitos trabalhos de investigação têm procurado proteases de fontes alternativas com potencial uso no fabrico de queijo (Rodrigues, 2014; Shah et al., 2013). Assim, tem-se vindo a experimentar extratos enzimáticos provenientes do sistema digestivo de outros animais ruminantes, como borregos novos, cabritos, porcos e frangos. Contudo, o estômago do frango e do porco contém unicamente pepsina, em contraste com os sucos gástricos dos ruminantes, que regra geral contêm quimosina e pepsina (Castilho, 2008).

Os substitutos mais importantes do coalho de origem animal, ou seja aqueles que melhor preenchem os requisitos de fabricação de queijo, incluem enzimas de origem vegetal, microbiana e recombinante (Shah et al. 2013).

b) Coagulantes de origem vegetal

As enzimas de origem vegetal estão presentes em quase todos os tipos de plantas, sendo que todas as enzimas proteolíticas têm a capacidade de coagular o leite, quando em condições adequadas. A maioria das enzimas utilizadas como coagulante do leite pertence ao grupo das proteases aspárticas, mas as enzimas de outros grupos, tais como as proteases cisteínicas e serínicas, também têm sido utilizadas (Quadro 5) (Shah et al., 2013).

Quadro 5: Tipos e fontes vegetais de enzimas coagulantes

Tipo de protease	Aminoácido no sítio catalítico	Nome da protease	Fonte
Aspártica	Resíduos de ácido aspártico	Cardosinas e cyprosinas	<i>Cynara cardunculus</i>
		Cynarase	<i>Cynara scolymus</i>
		Cardosina como extracto proteico	<i>Cynara humilis</i> <i>Silybum marianum</i>
		Onopordosina	<i>Onopordum acanthium</i>
		Extracto proteico	<i>Onopordum turcicum</i>
		Oryzasina	<i>Oryza sativa</i>
		Extracto proteico	<i>Centaurea calcitapa</i>
Cisteínica	Resíduos de cisteína	Procirsina	<i>Cirsium vulgare</i>
		Extracto proteico	<i>Solanum elaeagnifolium</i>
		Ficina	<i>Ficus racemosa</i>
		Coagulante Caprifig	<i>Ficus carica sylvestris</i>
		Extracto proteico	<i>Albizia lebbek</i>
Serínica	Resíduos de serina	Extracto proteico	<i>Helianthus annuus</i>
		Actinidina	<i>Actinidia chinensis</i>
		Cucumisina	<i>Cucumis melo</i>
		Neriifolina	<i>Euphorbia neriifolia</i>
		Neriifolina S	<i>Euphorbia neriifolia</i>
		Dubiumin	<i>Solanum dubium Fresen</i>
		Religiosina	<i>Ficus religiosa</i>
		Religiosina B	<i>Ficus religiosa</i>
		Religiosina C	<i>Ficus religiosa</i>
Streblina	<i>Streblus asper</i>		
Letucina	<i>Lactuca sativa</i>		
Não especificada	----	Hieronymain	<i>Bromelia hieronymi Mez</i>
		Extracto proteico	<i>Moringa oleifera</i>

Fonte: Adaptado de Shah et al. (2013)

As proteases das plantas têm vindo a ser isoladas a partir de várias fontes vegetais, de modo a estudar a sua habilidade para a CL. Estas enzimas podem ser obtidas a partir das suas fontes naturais ou por meio de cultura *in vitro*. A extração de proteases provenientes de partes intactas de plantas para CL é trabalhosa e, assim, as culturas de células de plantas (*in vitro*) são consideradas uma alternativa viável para a obtenção de enzimas coagulantes. O extratos em bruto podem ser purificados para obtermos a enzima purificada ou parcialmente pura, dependendo do grau de purificação (Shah et al., 2013).

Têm sido identificadas fontes vegetais para enzimas coagulantes a partir de *Ananas comosus*, *Calotropis procera*, *phylloclades Opuntia*, *Cereus triangularis*, *Euphorbia caducifolia*, *Ficus bengalensis*, *F. elastica*, *E. Hista*, *Lactuca sativa*, sete espécies de *Papilionoideae* (*Eriosema shirensense*, *E. ellipticum*, *E. pauciflorum*, *E. gossweilleri*, *E. psoraleoides*, *Adenolichos anchietae* e *Droogmansia megalantha*), *Cynara scolymus*, *C. cardunculus*, e *Helianthus annuus*. Infelizmente, a maioria destes coagulantes tem sido considerada inadequada, por produzirem queijos extremamente amargos. Constituem uma exceção, os extratos de Cardos (Egito et al., 2006).

Os extratos de *Cynara spp.* (vulgo cardo) são utilizados há séculos na Península Ibérica, para o fabrico de queijo, especialmente de leite de ovelha. Apesar da sua elevada atividade proteolítica, a *Cynara cardunculus* pode ser um substituto dos coalhos de origem animal, para o fabrico de queijos amanteigados. Das flores de *Cynara cardunculus* (Figura 14), é possível isolar cardosinas (proteases aspárticas) que apresentam o mesmo comportamento que outras enzimas coagulantes do leite, na clivagem da κ -CN (Rodrigues, 2014).

Figura 14: Cardo (*Cynara cardunculus* L.)



Fonte: fine Gardening, 2015

As proteases aspárticas presentes na flor de *C. cardunculus* são a cardosina A, a mais abundante; e a cardosina B. A cardosina A tem sido estudada em detalhe, sendo mostrado quebrar a κ -CN na mesma ligação peptídica que a quimosina. A cardosina B, em comparação, é semelhante à pepsina, quer em termos de especificidade e de atividade. Por outro lado as proteases aspárticas encontradas nas células da flor da *C. scolymus* são chamadas cynarases A, B e C (Egito et al., 2006).

A espécie *Cynara cardunculus* L. apresenta agentes coagulantes, nas pétalas (época de floração Junho/Julho). Esses agentes são proteínases aspárticas, um grupo de enzimas com uma estrutura tridimensional semelhante, distribuídas na natureza e com grande importância na regulação de sistemas biológicos, como precursores de proteínas, regulação sanguínea entre outros. Além disso, julga-se que as proteínas aspárticas das plantas estejam, também envolvidas na hidrólise e armazenamento de proteínas intracelulares. As duas formas isoladas de cardosinas que encontramos nos estigmas da florescência da *Cynara cardunculus* L. são do tipo A e B. Ambas as cardosinas são constituídas por duas subunidades. Apresentam atividade em pH que varia entre 2 e 7, sendo a atividade máxima no valor pH 5,5. Contudo, fazendo uma extração a pH 3 obtêm-se extratos aquosos com maior atividade coagulante, e em condições de pH alcalino caracterizam-se por elevada instabilidade (Sousa e Malcata, 2002).

Alguns autores sugerem que as cardosinas são endopeptídases e também glicoproteínas. Ambas as cardosinas mantêm atividade a 60°C, contudo a estabilidade a

elevadas temperaturas é relativamente baixa, como na maioria das outras proteínases aspárticas, as cardosinas clivam, preferencialmente, péptidos em bandas entre resíduos hidrofóbicos. A cardosina B apresenta maior especificidade que a cardosina A, contudo ambas mostram preferência por ligações peptídeas com lugar nas cadeias hidrofóbicas (Shah et al., 2013).

c) Coagulantes de origem microbiana

Todos os coagulantes microbianos conhecidos, utilizados no fabrico de queijo, são de origem “fúngica”. A maioria das proteases aspárticas que compõem este grupo e que atuam como coagulantes do leite mostraram-se inadequadas para a fabricação de alguns tipos de queijo, principalmente, por possuírem alta atividade proteolítica e pouca especificidade. A maior consequência do uso destes coagulantes é o surgimento do gosto amargo em alguns tipos de queijos maturados e destinados a armazenagem prolongada (Antunes et al., 2004).

Microrganismos como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactics* são extensivamente usados para a produção de proteínases para uso como coagulantes de leite. Os coagulantes microbianos são atualmente utilizados em cerca de 1/3 de toda a produção mundial de queijo (Vasconcelos et al., 2004).

Dos principais coagulantes microbianos usados no fabrico de queijo, o *Rhizomucor mihei* tem sido o mais usado. Proteases de *Rhizomucor mihei* e *R. pusillus* são soluções de proteases aspárticas obtidas por fermentação a partir de fungos filamentosos. As duas enzimas são similares, porém possuem diferente especificidade. Ambas caracterizam-se por apresentar maior estabilidade ao tratamento térmico. Consequentemente, a maior termorresistência destas enzimas comprometerá a qualidade e posterior utilização do soro proveniente da fabricação. Outro coagulante de origem fúngica é a protease de *Cryphonectria parasítica*, que provém de um fungo anteriormente denominado *Endothia parasítica*. Esta enzima é também uma protease ácida e apresenta características semelhantes às anteriores (Antunes et al., 2004).

d) Coagulantes OMG (organismos geneticamente modificados):

Quimosina produzida por fermentação

Surgiu no mercado outra alternativa ao coalho de bezerro, o chamado “coalho genético”, constituído de quimosina pura. A sua obtenção foi possível graças à tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a clonagem do gene que codifica a quimosina de bezerro em células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Trichoderma reesei* (Vasconcelos et al., 2004).

A alternativa para o coalho de bezerro mais utilizada na indústria queijeira no mundo inteiro é a quimosina produzida por fermentação, FPC (Fermentation Produced Chymosin), em larga escala de *Kluyveromyces lactis* ou *Aspergillus niger*, geneticamente modificados. Em ambos os casos, o microrganismo foi modificado geneticamente, com a incorporação do gene da pró-quimosina do bezerro no organismo hospedeiro como um promotor adequado para assegurar a sua secreção eficiente no meio de crescimento. A enzima é relativamente fácil de colher e purificar a partir da cultura, ao contrário do sistema de produção anterior, que utilizava *Escherichia coli* e a pró-quimosina era empacotada em corpos de inclusão, solubilizada, isolada, purificada e tratada com ácido para produzir uma quimosina geneticamente ativa (Antunes et al., 2004).

2.1.2.2. Coagulação ácida

O fenómeno de coagulação pode dar-se também por acidificação do leite. Ao pH normal do leite (pH 6,8), as CN apresentam um excesso de carga negativa. Isto acontece devido a grande parte dos aminoácidos das CN apresentarem os radicais ácidos ionizados (COO⁻), pois os pontos isoelétricos desses aminoácidos são inferiores ao pH do meio. As micelas estão, por isso, carregadas, o que origina uma repulsão electrostática que se opõe à agregação micelar. A agregação resulta do abaixamento do pH que fará diminuir a repulsão electrostática entre as micelas, pois a maioria dos aminoácidos das CN deixam de estar carregados negativamente (Castilho, 2008).

A coagulação ácida é obtida por via biológica, através da produção de ácido láctico, pelas bactérias lácticas ou pela adição direta de ácidos orgânicos ao leite. Nesta, as propriedades das micelas de CN são alteradas com o decréscimo do pH do leite, o que faz com que o fosfato de cálcio coloidal dissocie a micela e neutralize as suas cargas negativas, com a agregação ocorrendo à medida que o ponto isoelétrico destas (pH 4,6) é abordado (Castilho, 2008; Hallén, 2008).

As culturas adicionadas têm como função produzir ácido láctico, a partir de lactose, desnaturar as proteínas e, nalguns casos, produzir dióxido de carbono. A produção de ácido láctico contribui para a diminuição do pH, que apresenta uma elevada importância na compressão do coágulo e na eliminação do soro. O pH resultante influencia parâmetros como a consistência e a maturação do queijo. Independentemente da taxa de acidificação, o pH no final da coalhada para a maioria dos queijos, situa-se entre os valores 5,0 e 5,3. Durante este processo, são também libertados sais de Ca e P, que influenciam a firmeza ou rigidez da coalhada. Outra função importante das bactérias lácticas é a supressão de outras bactérias que sobreviveram à pasteurização (Moreira, 2011).

A relação entre tempo/velocidade, de produção de ácido, é fundamental para o fabrico de queijos de boa qualidade. Esta produção afeta vários aspetos do processo de fabrico, nomeadamente, a atividade coagulante; a desnaturação e retenção do coagulante, que influenciam a taxa de proteólise durante a maturação; a força da coalhada, que altera o rendimento do queijo; a estrutura do gel que, para além de controlar a humidade e regular o crescimento bacteriológico e a atividade enzimática nos queijos, influencia a taxa e o padrão de maturação; e, por fim, a extensão da dissolução do fosfato de cálcio, que modifica a suscetibilidade das CN à proteólise durante a maturação e afeta as propriedades reológicas do queijo (Moreira, 2011).

A coalhada láctica é porosa, frágil, pouco contráctil e difícil de dessorar, predominando a elaboração de iogurtes e queijos moles. Em função da CL ocorrer na faixa de pH ácido, o soro obtido é denominado de soro ácido (Castilho, 2008).

Este tipo de coagulação é muito diferente da coagulação enzimática, pois utiliza a acidificação de forma a conduzir o pH do leite ao ponto isoelétrico das proteínas (4,6).

Esta coagulação depende de diversos fatores, como a concentração de proteínas, as condições e os agentes de acidificação, a temperatura, a velocidade da acidificação e o pH no final da fermentação. O resultado final é o isolamento da CN pura, em que o fosfato de cálcio é libertado pelo efeito da acidificação e o Ca do caseinato vai formar o lactato de cálcio, solúvel, ficando assim a CN livre. Este fenómeno implica perda de Ca no soro, dando origem a coalhadas descalcificadas, por conseguinte mais frágeis, exigindo outros cuidados no processamento posterior (Barros, 2012).

A temperatura é um dos fatores que mais influi na coagulação ácida do leite. A baixas temperaturas (entre 0 e 5°C) pode-se acidificar o leite até ao pH de 4,6, sem que ocorra a formação de coágulo, apenas com aumento de viscosidade. Contudo, as CN precipitam a pH tanto maior quanto mais elevada for a temperatura. A 20°C obtém-se a precipitação das CN a pH em torno de 4,6. A 40°C a precipitação produz-se a pH próximo de 5,2. O coágulo obtido é o resultado da formação de um resíduo proteico insolúvel, que engloba na sua rede tridimensional a gordura e a totalidade da fase aquosa. O leite usado para a produção de produtos lácteos fermentados é geralmente sujeito a um tratamento a altas temperaturas (90°C, 5-10 min), com um efeito marcado no produto final. Temperaturas abaixo dos 60°C causam a desnaturação das proteínas do soro (principalmente da β -LG), que via pontes disulfureto se associam com a κ -CN nas micelas ou formam agregados solúveis, o que resulta no aumento da firmeza da coalhada, devido a um aumento do número e da força de ligações do gel ácido (Hallén, 2008).

2.1.2.3. Coagulação mista

A coagulação mista é realizada por ação conjunta de enzimas coagulantes e do ácido láctico produzido por culturas (fermentos) lácticas. Contudo, a formação do coágulo faz-se geralmente com a ação dominante das enzimas, o qual adquire gradualmente características de uma pasta láctica à medida que a fermentação láctica progride. O produto final apresenta características diferentes consoante o momento e a intensidade em que ocorrem a acidificação e o dessoramento no processo de fabrico. As coalhadas obtidas segundo este modo de coagulação, apresentam características

intermédias entre a coagulação puramente enzimática e a coagulação obtida apenas por acidificação do leite (Bandeira, 2010).

A fabricação de alguns queijos ocorre pela formação de uma coalhada mista, obtida pela ação acidificante e enzimática. O pH é crítico nas características do comportamento deste tipo de gel; a pH abaixo de 5,15, as características são fundamentais para um gel ácido e para pH acima de 5,15, a coalhada tem características enzimáticas. As características do gel ácido modificam-se na presença do coalho, cuja atividade proteolítica (a temperaturas superiores a 15°C) faz com que a rigidez da coalhada final seja menor. As coalhadas mistas (ácido/coalho) caracterizam-se por uma microsinerése muito intensa, que tem lugar a valores de pH superiores a 5,15 (Castilho, 2008).

Este tipo de coagulação é uma junção dos dois anteriores, podendo ser predominantemente ácida ou enzimática. Quando é predominantemente ácida, adiciona-se coalho para melhorar um pouco a qualidade da coalhada, e quando é predominantemente enzimática, o comportamento é intermédio entre os dois tipos de coagulação. Na maioria dos fabricos de queijo, a coagulação é efetuada por via enzimática, por vezes acompanhada por acidificação, não suficiente, no entanto, para promover, só por si, a coagulação (Barros, 2012).

2.1.1.3. Dessoramento, Salga e Maturação/Cura

Terminado o processo de coagulação, procede-se ao dessoramento, ou seja, à separação do soro da coalhada, após rutura mecânica do gel (corte da coalhada), de modo a conseguir um produto moldável. A quantidade de soro libertado e a facilidade dessa libertação dependem das características do gel e variam consoante o tipo de queijo que se pretende obter (Bandeira, 2010).

O corte da coalhada tem por objetivo facilitar a saída do soro com o mínimo de perdas de proteína e gordura. O corte é feito por facas especiais chamadas liras, que podem cortar a coalhada vertical e/ou horizontalmente. O tipo e tempo de corte conduzem a diferentes tipos de queijo. Quanto maior a duração e quanto mais

pequenos forem os fragmentos da coalhada, maior o dessoramento e menor a humidade do queijo resultante (Nassu et al., 2006).

Após a coagulação, a rede de coalhada continua a sua formação por um tempo considerável após a obtenção de um gel visível, mesmo após o corte. A força do gel é muito importante do ponto de vista da sinérese e para o controlo da humidade e rendimento da produção (Paula et al; 2010).

O gel de coalhada formado é bastante estável, mas apresenta sinérese (saída do soro), quando cortado ou quebrado. Para controlar a sinérese, o queijeiro pode facilmente controlar o conteúdo de humidade da massa do queijo e também o grau e a extensão da maturação e a estabilidade do queijo. Quanto maior a humidade do queijo, mais rápida será a sua maturação, porém, menor será a sua estabilidade (Paula et al; 2010).

O processo de salga pode ser efetuado de diversas formas: incorporação de sal na coalhada; à superfície do queijo; em salmoura; ou no próprio leite. O sal tem um triplo papel: conferir um sabor característico ao queijo; favorecer a libertação do soro; tem também um papel importante na seleção da flora microbiana e na sua evolução no processo de maturação (Bandeira, 2010).

A maturação/cura corresponde à etapa final do fabrico e é uma fase de digestão enzimática da coalhada. Nesta fase, verifica-se um conjunto de reações bioquímicas complexas (proteólise e lipólise) que modificam os diversos componentes da coalhada, obtendo-se no final um produto completamente diferente do queijo em fresco, no que se refere ao aspeto, sabor e textura (Bandeira, 2010).

2.1.2. Principais Fatores Que Afetam a Coagulação do Leite

As PCL são medidas importantes da qualidade tecnológica do leite. Uma boa reatividade ao coalho, uma coalhada firme, uma boa capacidade de sinérese, e drenagem de soro de leite são características cruciais para fabricação de queijo. A medição do tempo de coagulação, da firmeza, elasticidade, permeabilidade, contratilidade e sinérese da coalhada permitem avaliar se o leite é adequado para o

fabrico de queijo. Os métodos utilizados para avaliar as PCL exploram as alterações físico-químicas que ocorrem durante a coagulação induzida pela adição do coalho. O coalho modifica as micelas de CN, resultando em mudanças de viscosidade e elasticidade. Várias técnicas têm sido utilizadas para medir as PCL, com uma vasta gama de instrumentos mecânicos, ultrassônicos, térmicos e óticos. Apenas alguns estudos examinaram a repetibilidade e reprodutibilidade das PCL utilizando instrumentos mecânicos tradicionais. Embora as PCL sejam frequentemente expressas de várias formas na literatura, a sua repetibilidade parece ser baixa. Vários estudos mostraram que existe uma variação genética aditiva explorável para as PCL, medidas com dispositivos mecânicos e óticos. No entanto, do ponto de vista fenotípico, algumas comparações entre tais instrumentos têm sido realizadas, baseadas num pequeno número de amostras, sob diferentes condições de análise ou de ambos (Cipolat-Gotet et al., 2012).

Através de leite com propriedades favoráveis de coagulação (tempo de coagulação curto e uma coalhada firme) obtemos uma maior quantidade de queijo com uma composição desejável. O leite utilizado para a produção de queijo tem que ter, além de parâmetros de boa qualidade, boas propriedades de coagulação para assegurar a conversão de sólidos do leite para o queijo e evitar perdas de lucro para as empresas de laticínios (Jõudu et al., 2009).

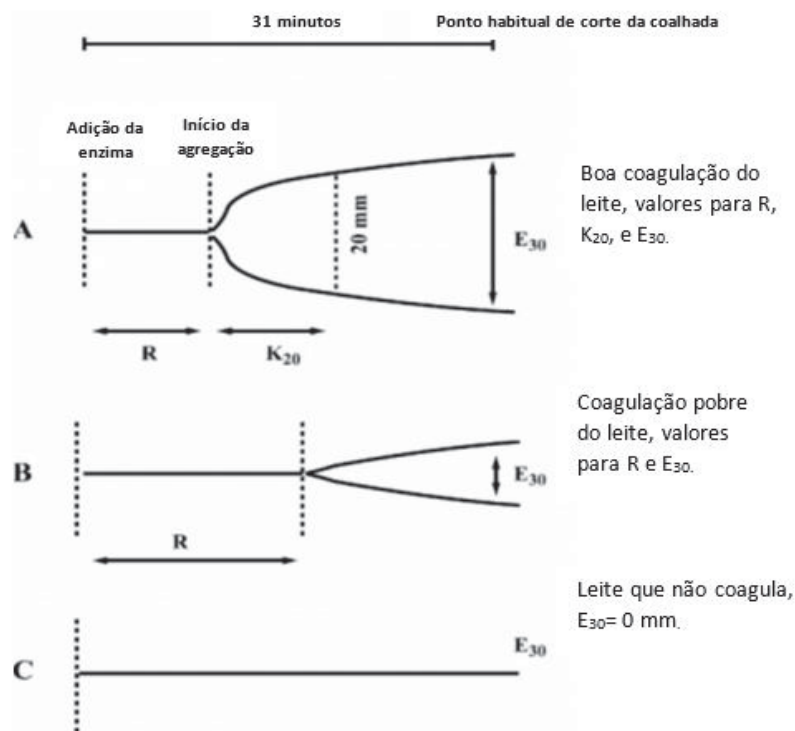
Teores mais elevados de proteínas do leite, CN e todas as frações de proteína estudadas reduzem o tempo de coagulação e proporcionam uma coalhada mais firme. O leite forma uma coalhada mais firme quando a proporção de α_{s2} -CN e β -CN em CN total é menor, ou a proporção de κ -CN em CN total é superior. Além disso, uma proporção mais elevada de κ -CN com respeito a α_{s1} -CN e β -CN assistida na formação de uma coalhada mais firme (Jõudu et al., 2009).

Por um lado, têm sido obtidos resultados contraditórios em relação ao tempo de coagulação, que após adição do coalho, diminui de acordo com o aumento da temperatura de coagulação. Um aumento do pH resulta num prolongamento do tempo de coagulação (Chládek et al., 2011; Glantz et al., 2010). Vários estudos têm tentado determinar qual a etapa da coagulação que é prejudicada em leites que coagulam mal e leites NC (Jensen et al., 2012).

O leite com boas características de coagulação foi definido como leite que forma um coágulo forte (Ver figura 14), conforme indicado pelos valores da firmeza da coalhada (E_{30}), tempo de endurecimento da coalhada (K_{20}) e tempo de coagulação mais curto (R) (Barros, 2012).

De acordo com a sua capacidade de coagulação, o leite pode ser dividido em leite que coagula bem, que coagula mal e leite NC (Figura 15). O leite NC não é capaz de formar uma coalhada dentro de 30 minutos após a adição do coalho, ao passo que o leite que coagula mal forma uma coalhada pouco consistente (Harzia, 2013).

Figura 15: Diagramas para uma coagulação normal do leite (A), coagulação pobre do leite (B) e leite que não coagula (C), produzidos por um formográfico. As PCL calculadas através do diagrama são: o tempo de coagulação (R) em minutos, o tempo de endurecimento da coalhada (K_{20}) em minutos, e a firmeza da coalhada (E_{30}) em milímetros (mm)



Fonte: Adaptado de Ikonen et al. (2004)

A capacidade do leite para reagir à presença de coalho tem sido intensamente estudada na raça bovina. Sendo amplamente demonstrado que o leite com características desejáveis de coagulação, ou seja, com um tempo de coagulação

relativamente curto e uma boa firmeza da coalhada, resulta numa maior produção de queijo e numa maior rentabilidade para a indústria de laticínios (Castilho, 2008).

Boas PCL proporcionam uma boa conversão do leite em queijo e lucros para as empresas de laticínios, em detrimento de leites NC ou que coagulam mal (Harzia, 2013). O leite com boa capacidade de coagulação é, portanto, uma matéria-prima preferencial para a indústria de laticínios. Sendo de interesse compreender as causas subjacentes de leite com capacidade de coagulação deficiente, um problema comum em várias raças leiteiras. Embora a composição do leite individual com uma má coagulação ou leite NC seja cada vez mais estudada, a causa do fenómeno ainda não foi totalmente compreendida (Jensen et al., 2012). Nenhum dos fatores ambientais pode explicar minuciosamente o surgimento de leite NC, embora tenha sido relatado que o pH, a CCS, o teor de Ca do leite, e o estágio de lactação estão, de alguma forma, associados a este fenómeno, que parece ser causado, em grande parte, por fatores genéticos (Tyrisvä et al., 2004).

As propriedades tecnológicas do leite bovino, medidas por reologia oscilatória, incluem a firmeza da coalhada. Esta é definida pela força do produto coagulado e pela taxa de endurecimento da coalhada, que estão intimamente relacionadas e dependem principalmente da concentração e composição de CN, ao passo que a relação de outra propriedade tecnológica, isto é, o tempo de coagulação após adição do coalho, é mais sutil e não completamente correlacionada, devendo ser influenciada por múltiplos fatores (Jensen et al., 2012). Uma forma de avaliar as PCL é medir o tempo de coagulação, por um determinado coagulante, em condições de temperatura controlada (Tavanti et al., 2009).

As PCL são fortemente influenciados pelo instrumento de análise (mecânico vs. ótico) e pelo esquema operacional (tipo e concentração de coalho, a temperatura do leite, e pH), fazendo com que comparações entre diferentes estudos laboratoriais e abordagens sejam difíceis (Bittante et al., 2012).

De acordo com Fox et al. (2000), os principais fatores que afetam a coagulação são: a) quantidade da quimosina (depende do tipo de queijo); b) temperatura; c) pH (o pH entre 5,8 e 6,5 permite que se obtenha um coágulo não granuloso, elástico e

contráctil, enquanto que em pH mais ácido o coágulo obtido é granuloso e inelástico); d) concentração do ião Ca; e) temperatura de armazenamento do leite (não é recomendável conservar o leite a baixas temperaturas por longos períodos, pois a estabilidade da emulsão pode ser comprometida, dificultando a coagulação); f) teor de gordura do leite; g) eventuais interações da K-CN com aminoácidos e/ou ácidos gordos livres no leite; h) tempo de coagulação (varia entre 30 a 90 min, dependendo do tipo de queijo) (Quadro 6 e Gráfico 3).

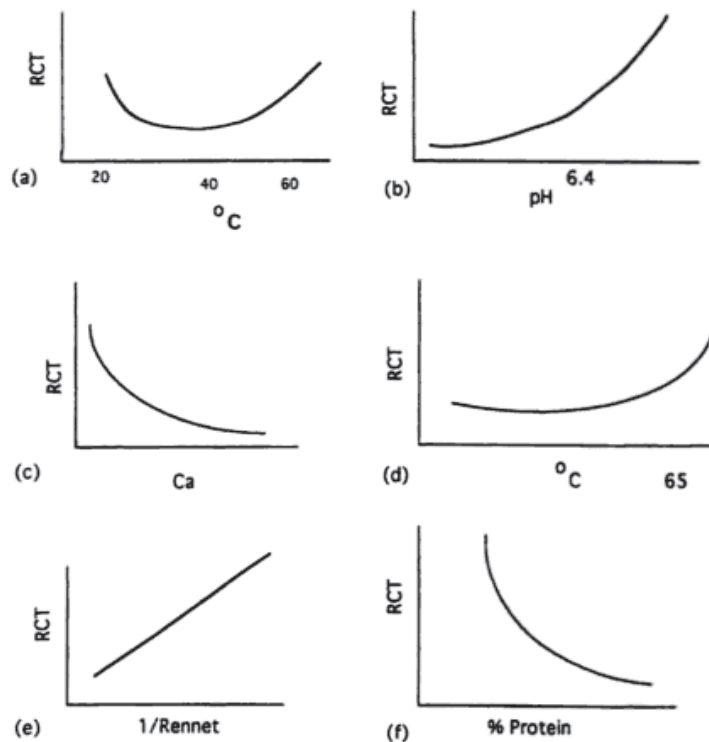
Quadro 6: Efeito de vários fatores sobre o tempo de coagulação do leite (RTC) durante a 1ª e 2ª fases de coagulação

Fator	1ª fase	2ª fase	Efeito global, ver gráfico abaixo
Temperatura	+	++	(a)
pH	+++	-	(b)
Ca	-	+++	(c)
Pré-aquecimento	++	++++	(d)
Concentração de coalho	++++	-	(e)
Concentração de proteína	+	++++	(f)

Legenda: - = ligeiro efeito negativo; + = ligeiro efeito positivo; ++ = efeito positivo moderado; +++ = grande efeito positivo; ++++ = efeito positivo muito grande.

Fonte: Fox et al. (2000)

Gráfico 3: Efeito de vários fatores sobre o tempo de coagulação do leite (RTC)



Fonte: Fox et al. (2000)

Das características principais do leite, uma diminuição do pH aumenta o tempo de coagulação, mas os teores de gordura e lactose mais elevados resultam num menor tempo de coagulação, e os resultados da firmeza da coalhada são melhores para teores mais elevados de Ca e de proteína. Estes fatores têm sido amplamente estudados, mas nenhum deles pode explicar de forma inequívoca o fenómeno de leite NC (Harzia, 2013).

Fatores como a proteína, a CN, os teores de Ca, o pH, a lactose e a razão de proteínas do soro e CN têm demonstrado influenciar as características de gelificação, desempenhando um papel importante no processamento de queijo (Glantz et al., 2010).

A temperatura exerce um papel importante na CL e afeta cada uma das suas fases. As condições ótimas para a ação do coalho encontram-se entre 40 e 42°C, em temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 65°C, não se produz coagulação. A fase primária de ação enzimática sobre a κ -CN pode ser produzida, inclusive, a temperaturas inferiores a 10°C; já a fase secundária, mais sensível, necessita temperaturas superiores para se produzir a coagulação propriamente dita (Bittante et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado que o tratamento térmico do leite a temperaturas acima de 70°C leva à formação de complexos químicos entre a κ -CN e as proteínas do soro (agregados de proteínas do leite). Foi também constatado que a formação destes agregados leva a uma menor sensibilidade da CN às enzimas proteolíticas, mesmo que a concentração de Ca^{2+} seja maior que no leite cru. Este problema requer investigações adicionais, que podem resolver numerosos problemas associados à CL, com o objetivo de criar condições ótimas de coagulação para o uso de leite tratado a elevadas temperaturas na produção de queijo. Esta é também uma via para aumentar o rendimento queijeiro, devido a uma maior utilização das proteínas do soro, que são perdidas durante a produção tradicional de queijo (Jovanović et al., 2002).

Certos estudos apontam que o tratamento térmico do leite a altas temperaturas tem mais influência na fase secundária da coagulação do que na fase primária, outros assumem que ambas as fases, primária e secundária, da coagulação são retardadas em leites sujeitos a tratamentos térmicos a temperaturas que influenciam a desnaturação e agregação das proteínas do soro, via intercâmbio tiol-dissulfureto, que torna a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ menos suscetível ao coalho (Jovanović et al., 2002).

O leite tratado termicamente, após acidificação e subsequente neutralização do pH 6,6, tem um tempo de coagulação mais curto, que o leite sem tratamento prévio (Jovanović et al., 2002).

Muitos fatores estão interligados e a fração proteica do leite tem diferentes efeitos nas PCL. A diminuição do pH e aumento da temperatura conduzem à diminuição do tempo de coagulação (Hallén, 2008).

Alguns fatores influenciam fortemente a CL: a coagulação e formação do gel não ocorre abaixo de 18°C e acima de 55-60°C o coalho é inativado; temperaturas próximas a 40°C estimulam a ação do coalho e diminuem o tempo de coagulação; quanto mais próximo do pH ótimo de ação da enzima (aproximadamente pH 6,0) melhor a ação do coalho e maior a força da coalhada (Paula et al; 2010).

A sinérese da coalhada é prejudicada quando o leite é aquecido excessivamente, originando a sua redução. Redução desejável em produtos fermentados como o iogurte, mas indesejável em queijo (Paula et al; 2010).

A qualidade da coalhada formada depende das propriedades físico-químicas das micelas de CN, das quais o tamanho micelar é de grande importância. As micelas pequenas formam uma rede de gel mais compacta e, portanto, mais firme do que micelas maiores (Glantz et al., 2010).

Nas mesmas condições, a quantidade de coalho adicionado influencia, proporcionalmente, a velocidade de coagulação e as propriedades reológicas (firmeza) da coalhada. A dependência da taxa de endurecimento da coalhada sobre a concentração de proteína foi investigada, descobrindo-se que não depende apenas da concentração total de proteína em si, mas também das interações entre proteínas (Frederiksen et al., 2011b).

A metodologia utilizada e, principalmente, o tipo e a concentração do coalho podem modificar em grande parte o tempo de coagulação médio, a frequência de leite NC a firmeza da coalhada das amostras (Bittante et al., 2013).

O coalho tem grande importância, pois a sua composição em renina e pepsina afeta a coagulação, em função do pH do leite. Além disso, certos coalhos, dependendo

do processo em que são produzidos e da matéria-prima utilizada têm um maior grau de impurezas e estão assim sujeitos a uma maior perda da atividade coagulante, o que os torna menos efetivos na formação da coalhada. O pH influi sobre a velocidade de coagulação e a consistência da coalhada. No meio alcalino, o coalho é inativado e o leite não coagula. Ao contrário, um abaixamento do pH facilita a ação do coalho sobre a CN, pois a acidez reduz a sua carga elétrica, diminuindo a estabilidade da micela. O pH ótimo para a ação do coalho é de 5,5 (Cecchinato et al., 2011).

A alteração da composição do leite implica modificar as suas propriedades tecnológicas. Quando essas propriedades são afetadas temos uma redução no rendimento de produtos de base proteica, inibição de culturas lácteas, defeitos de sabor (ranço e amargo) e textura, maior tempo de coagulação e menor síntese do coágulo na fabricação de queijos (Tavanti et al., 2009).

Estudos sobre a variação do rendimento do queijo em relação à composição do leite, a partir de um número significativo de amostras de leite individuais são raros, sendo mais frequentes estudos sobre queijos produzidos a partir de amostras de leite a granel (Wedholm et al., 2006).

As associações entre as PCL e a produção de queijo variam. A firmeza da coalhada no corte pode estar associada com alto rendimento de queijo, não sendo encontrada uma diferença significativa no rendimento entre os queijos feitos a partir de leite que coagula mal e que coagula bem. O tempo de formação da coalhada afeta mais fortemente o rendimento do queijo que a força da coalhada no corte. No entanto, também tem sido sugerido que a firmeza da coalhada no corte é importante para os atributos sensoriais do queijo. Foi relatado que um aumento no teor de humidade do queijo, devido a uma coalhada mais firme no corte, resulta em queijos com uma textura mais macia e suave em queijos Cheddar com gordura reduzida. A diferença no rendimento do queijo entre o leite que coagula mal e o leite que coagula bem foi mais pronunciada, quando o rendimento foi expressado em gramas de queijo por cem gramas de leite, do que como gramas de sólidos secos de queijo por cem gramas de leite. O que sugere que um aumento no rendimento do queijo devido a uma coalhada mais firme no corte poderá estar associado a um aumento da capacidade de retenção

de água dos queijos preparados a partir de leite que coagula bem (Wedholm et al., 2006).

Uma grande fração das amostras de leites individuais analisados em Wedholm et al. (2006) tinha más propriedades de coagulação, prejudicando o rendimento queijeiro. A baixa concentração de κ -CN e uma baixa proporção de κ -CN em relação ao CN total analisado foram associados com leite que coagula mal e leite NC. No entanto, a composição das proteínas do leite analisadas, apenas explicou, parcialmente, a variação total das PCL. Estes resultados sugerem que um leite ideal para o fabrico de queijo deverá ser rico em concentrações de α_{s1} -, β -, e κ -CN, e possuir uma alta taxa de κ -CN em relação ao total de CN e conter β -LG B. Além disso, a alta concentração de CN para o total de proteína analisado foi significativa para a transferência das proteínas do leite para o queijo (Wedholm et al., 2006).

O pH do leite e os seus conteúdos de proteína, CN, e lactose afetam a sua gelificação. Foi demonstrado que as micelas de CN nativas de menores dimensões formam géis mais fortes, quando o leite que coagula mal é excluído da análise. Além disso, o pH do leite, Mg e K têm efeitos sobre o tamanho das micelas de CN nativas. Isso pode implicar que a seleção para micelas de CN nativas de menores dimensões e menor pH do leite através da reprodução iria melhorar as suas propriedades de gelificação, assim, pode-se otimizar o passo inicial para o processamento de queijo. Mais estudos são necessários para obter informações específicas sobre os genes que estão associados a essas características, a fim de adequar as práticas de criação (Glantz et al., 2010).

2.1.2.1. Efeito dos Fatores Genéticos Sobre as PCL

Em geral, os fatores genéticos desempenham um papel importante na determinação da capacidade de CL, e a influência positiva dos alelos B de ambas κ -CN e β -CN tem sido bem estabelecida. Em contraste, os alelos A e E da κ -CN estão associados com propriedades de coagulação pobres e vacas com o alelo E da κ -CN têm sido associadas com a produção de leite NC em várias ocasiões (Frederiksen et al., 2011a). Com base numa pesquisa, as correlações genéticas entre as PCL e a CN e entre as PCL e o teor de proteína são insignificantes (Tyrisvä et al., 2004).

Além das grandes diferenças entre as raças, as PCL têm sido apontadas como hereditárias, quando medidas, quer diretamente quer, quando indiretamente previstas a partir de espectros no infravermelho médio de leite não processado. Estas previsões permitem uma informação rápida, automatizada e económica de ambos os parâmetros, tempo de coagulação e a firmeza da coalhada, caracterizados por uma precisão útil para a avaliação genética dos animais ao nível da população. São necessárias mais pesquisas para estimar as herdabilidades das medidas das PCL e verificar as correlações genéticas entre elas. Além disso, os valores das PCL são fortemente influenciados pelos genótipos das CN e proteínas do soro (Bittante et al., 2013).

As variantes genéticas das proteínas do leite desempenham um papel importante na explicação da variação genética aditiva das PCL (Penasa et al., 2010) e, conseqüentemente, as diferenças entre raças dependem das frequências relativas das variantes genéticas, em especial, as relativas aos alelos da para- κ -caseína (Cecchinato et al; 2013).

A segunda característica genética mais importante que influencia as PCL é a raça do animal dentro de cada espécie, o que tem levado a que sejam estudadas diferenças nas PCL entre raças. Vários relatórios sobre este tema têm surgido, mas estes trabalhos são frequentemente realizados sob condições experimentais muito diferentes. Entre raças dentro da mesma espécie, e entre cada indivíduo, ocorrem variações no tempo de coagulação, na firmeza da coalhada, e no desenvolvimento da sinérese. O leite de vacas de raças originárias da Europa centro-sul é, geralmente, mais valioso em termos de fabricação de queijo do que leite de raças que se originaram na Europa centro-norte, nomeadamente a HF e raças escandinavas. Assim, as condições ambientais, o regime de alimentação, o número total de amostras, o número de amostras analisadas para cada animal, o uso ou não de conservante, o intervalo de tempo entre a amostragem e a medição das PCL, as condições de armazenamento, o pré-tratamento do leite, o tipo de instrumento, o tipo e quantidade de coalho utilizado, a temperatura de coagulação, a duração da observação, os traços gravados, a consideração concedida às amostras NC, os métodos estatísticos utilizados e a forma como os resultados são apresentados variam, consideravelmente, entre os estudos. A terceira influência genética é a estrutura de genes que codificam as suas proteínas e, em particular, os efeitos nas suas variantes

genéticas. As seis principais proteínas do leite de vaca são codificadas por genes polimórficos, com um máximo de 47 variantes identificadas. Começou-se a trabalhar os efeitos das variações genéticas das proteínas nas PCL há décadas e, desde então, um volume impressionante de dados tem sido colhido. O modo como a variação dos traços das proteínas afeta a genética das PCL envolve efeitos do genótipo no teor de proteína bruta, os níveis e proporções das frações proteicas individuais, a acidez do leite e o seu conteúdo mineral. Tal como descrito em vários estudos, as variantes genéticas das proteínas influenciam tanto a quantidade e proporção das diferentes PL. Além disso, as dimensões das micelas de CN são influenciadas por variantes genéticas, tendo sido demonstrado que a quantidade de algumas frações proteicas tem influência sobre as PCL (Bittante et al., 2012).

Em termos genéticos, um aumento no conteúdo de κ -CN ou proporção relativa de κ -CN, em relação aos níveis totais de CN, diminui os níveis gerais ou proporções relativas das caseínas α_{s1} - e α_{s2} -, e exerce efeitos favoráveis sobre o pH do leite coagulado, ao passo que qualquer efeito da β -CN no leite coagulado permanece controverso (Bittante et al., 2012).

Certas variações nas características do leite podem ser atribuídas a diferenças qualitativas (estruturais) entre produtos alélicos dos genes das proteínas do leite e quantitativas (a quantidade de tais proteínas). Alguns relatórios têm procurado estimar o grau em que o efeito das variantes genéticas nas PCL pode ser explicado através de um efeito sobre os níveis de determinadas frações de proteínas, e em que grau tal variação é independente destes efeitos (Bittante et al., 2012). A evidência de uma contribuição genética para a CL tem sido confirmada, com os resultados mais consistentes que acordam que as variantes B da κ -CN, β -CN, e β -LG são favoráveis para a coagulação do leite e fabricação de queijo (Jensen et al., 2012).

A quantidade, proporção, e variantes genéticas (especialmente da κ -CN) das frações proteicas do leite influenciam fortemente as suas propriedades de coagulação e explicam as proporções variáveis de diferenças observadas entre as raças e entre os indivíduos da mesma raça (Bittante et al., 2012). Relatou-se que um aumento do teor de proteínas do leite e CN reduz o tempo de coagulação (Toffanin et al., 2012).

As PCL são fortemente influenciadas por variações nos principais genes, especialmente nas variantes genéticas de κ -CN. No entanto, essas influências genéticas explicam apenas parte da variância genética observada. Em sentido restrito, a herdabilidade é moderada. Em sentido lato, no entanto, a hereditariedade (incluindo os efeitos dos genes principais) é elevada e comparável à de outras características de qualidade do leite. As PCL não foram bem estudadas em termos de influências possíveis de endogamia e heterose, sendo necessários esforços atuais para este fim (Bittante et al., 2012).

Em Jensen et al. (2012), foram observadas diferenças claras na composição do leite e na composição genética das principais proteínas do leite, e modificações pós-traducionais da CN entre amostras de leite quer com boa ou menor capacidade de coagulação, por sua vez, o leite que coagula mal e leite NC apresentou uma composição mais semelhante.

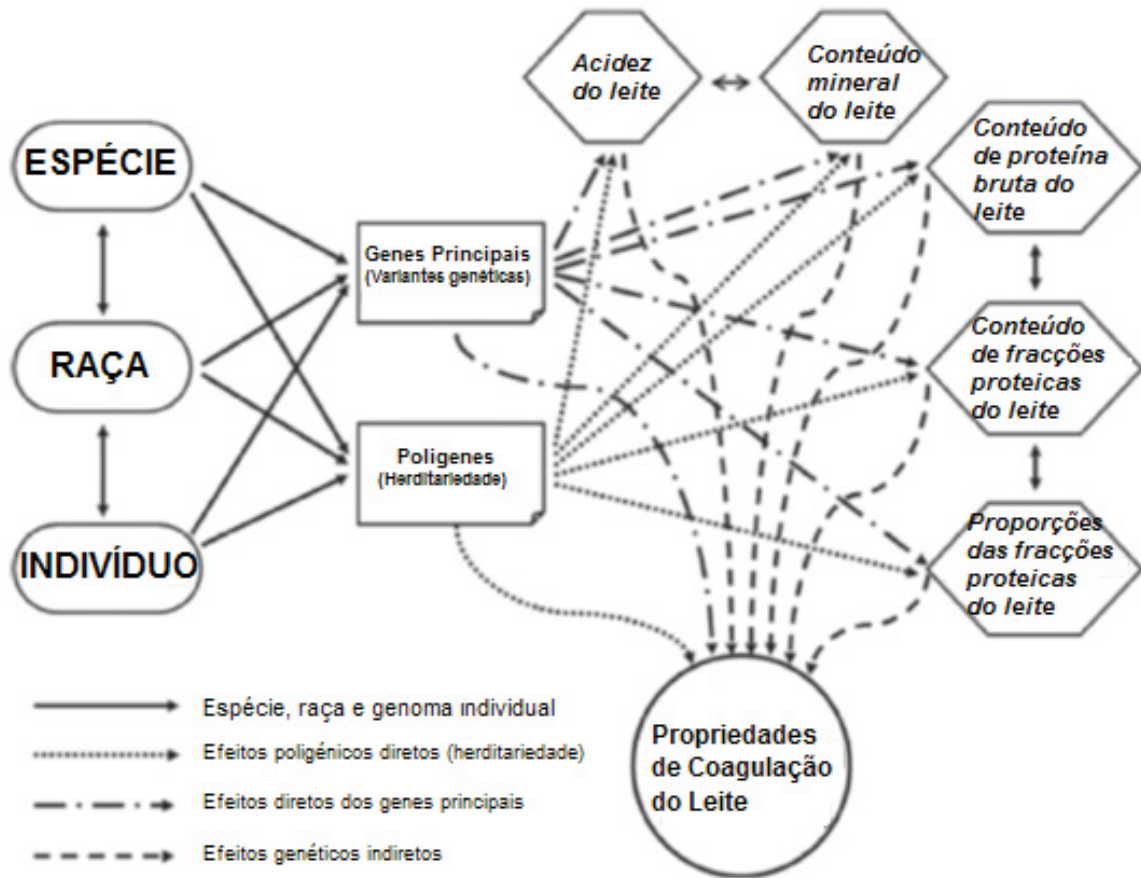
A correlação positiva significativa entre β -LG B e rendimento do queijo é esperada porque foi sugerido que o alelo B se correlaciona com um maior número CN devido à menor concentração de β -LG neste leite. A proporção total de CN não afeta o rendimento do queijo, expressa em gramas de queijo por cem gramas de leite, ao passo que o rendimento, expresso em gramas de sólidos secos de queijo por cem gramas de proteína de leite é afetado. A gordura do leite é importante para o rendimento de queijo, mesmo que o leite seja desnatado antes de fazer o queijo. Isto é, provavelmente, devido à forte correlação significativa entre a concentração de proteína total e de gordura do leite (Wedholm et al., 2006).

Os genes das proteínas do leite explicam uma parte considerável da variância genética aditiva de algumas frações proteicas. No entanto, existem variâncias genéticas adicionais no resto do genoma que podem ser exploradas para alterar a composição de proteínas por reprodução seletiva. A seleção para aumentar o teor total de CN do leite não é útil para o reforço das PCL. Aumentar o conteúdo β -CN e κ -CN, diminuir o conteúdo de α_{s1} -CN e o pH do leite através de reprodução seletiva são alternativas mais atrativas. A herdabilidade das PCL continua a ser sentida após o ajuste para os halótipos de CN e os efeitos dos genótipos de β -LG, sugerindo que o fenótipo para essas características não pode ser substituído por genotipagem de animais para as variantes

proteicas do leite. A falta de métodos analíticos rápidos e automáticos que permitam a quantificação das frações proteicas do leite em grande escala limita a oportunidade de explorar a variação genética da composição das proteínas do leite para o melhoramento das suas PCL através do melhoramento seletivo. As relações genéticas entre a composição proteica do leite, as propriedades de coagulação, o rendimento do queijo, e os traços na criação atual de populações bovinas leiteiras precisam ser investigados (Bonfatti et al., 2011).

As PCL são fortemente influenciadas pelo instrumento de análise (mecânico vs. ótico) e características do processo (tipo e concentração de coalho, temperatura do leite e pH), o que torna as comparações entre diferentes estudos, laboratórios e abordagens muito difíceis. São influenciadas pela exploração, mas esta influência é muito mais baixa do que a exercida sobre outros parâmetros do leite (rendimento, conteúdo, acidez, e saúde mamária), o que significa que as instalações de alojamento, alimentação, higiene, e a gestão da exploração modificam as PCL apenas de forma limitada. São fortemente influenciadas pela idade da vaca ou paridade, e os dados obtidos a partir de diferentes lactações do mesmo animal podem ser combinados. As PCL são muito mais influenciadas pelo estágio de lactação da vaca e, como a produção de leite e conteúdo, requerem uma modelagem adequada. São fortemente influenciadas pelo ambiente permanente de uma vaca. A sua repetibilidade individual é elevada e não há necessidade de testar frequentemente uma vaca para caracterizar as propriedades de coagulação do seu leite. São fortemente influenciadas por variações nos principais genes; isso é especialmente verdadeiro para as variantes genéticas de κ -CN, no entanto, tais influências genéticas explicam apenas parte da variação genética observada. São também influenciadas pela variação poligénica. Em um sentido mais restrito, a herdabilidade é moderada. Em sentido lato, no entanto, hereditariedade (incluindo os efeitos principais de genes) é elevada e comparável à de outras características de qualidade do leite (Figura 16). As PCL não foram bem estudadas em termos de possíveis influências de endogamia e heterose, e são necessários esforços atuais para este fim (Bittante et al., 2012).

Figura 16: Efeitos genéticos diretos e indiretos sobre as PCL



Fonte: Bittante et al. (2012)

Os resultados de estudos anteriores têm contribuído para uma melhor compreensão das correlações genéticas entre características diferentes. Em particular, o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada estão rigorosamente correlacionados, o que significa que a medição de este último traço acrescenta pouco à informação proporcionada pelo primeiro. O tempo de coagulação é fortemente influenciado pelo pH e acidez titulável do leite. A firmeza da coalhada é fortemente afetada pela acidez do leite e, em menor medida, pela qualidade do leite, particularmente pelo seu conteúdo em CN. A firmeza da coalhada é negativamente influenciada pela CCS e outros indicadores de mamite (Bittante et al., 2012).

Por fim, tanto a indústria queijeira como as associações envolvidas na seleção dos animais podem ser assistidas, na resolução de vários problemas associados com os

métodos tradicionais de medição das PCL. Podem ser conseguidos dados úteis mediante o prolongamento do período de testes no lactodinamógrafo, via modelagem adequada das PCL. Estas abordagens, que também fornecem informações sobre a sinerese, devem ser investigadas, tanto a nível fenotípico como genético (Bittante et al., 2012).

A melhoria da capacidade de CL é um tema em debate na genética de bovinos de leite, principalmente porque a quantidade de leite utilizado para o fabrico de queijo está em crescimento em todo o mundo e vários estudos têm confirmado o papel das PCL na fabricação de queijo. Verifica-se a existência de variação genética aditiva explorável para a capacidade de CL, e de herdabilidade numa taxa estimada de 15 a 40%. Foi proposto o uso de espectroscopia de infravermelho médio para gravar rotineiramente as PCL em amostras de leites individuais, foi também sugerido que a aplicação desta técnica em grande escala para o melhoramento genético das PCL é viável (Penasa et al., 2010).

Os polimorfismos das proteínas e a composição do leite afetam a variação da sua capacidade de coagulação e as alterações nas concentrações relativas de frações de proteína parecem ser a causa principal de efeitos de polimorfismos genéticos proteicos nas PCL e rendimento do queijo. Por este motivo, a composição das PL pode desempenhar um papel importante para a rentabilidade da indústria de laticínios (Bonfatti et al., 2011).

Os polimorfismos de CN têm sido amplamente estudados no passado junto com as suas associações com características de produção leiteira e de propriedades tecnológicas do leite. Nesses estudos, a atenção estava voltada para o efeito do *loci* da CN no leite individual, em vez do efeito de genótipos compostos sobre o rendimento, composição e propriedades do leite e fabricação de queijo. Devido à estreita ligação entre o *loci* CN no cromossomo 6 bovino, os alelos de diferentes CN estão em desequilíbrio de ligação, levando a vieses na estimativa dos efeitos dos genótipos quando as CN individuais são simultaneamente incluídas num modelo. Consequentemente, a utilização de combinações de genótipos de CN ou halótipos é uma abordagem mais apropriada para estimar os efeitos desses *loci* sobre as características de produção de leite e suas propriedades de coagulação. Estes relataram a influência notável dos genótipos compostos da β - e κ -CN sobre as PCL e o efeito moderado a

negligenciável sobre as características de produção de leite. A herdabilidade do tempo de CL continua a ser sentida após o ajuste para os compostos genótipos da β - e κ -CN, sugerindo que a gravação desta característica não pode ser substituída por genotipagem de animais para as variantes de PL. No entanto, porque as PCL são afetadas por *loci* CN e porque as técnicas baratas e poderosas para a detecção simultânea das variantes genéticas estão disponíveis, pode-se argumentar que a combinação de dados em relação ao tempo de coagulação e informações sobre a CN poderiam fornecer uma ferramenta para melhor atender a futuras decisões de seleção que visam melhorar as PCL (Penasa et al., 2010).

As estimativas pontuais de correlações genéticas de tempo de coagulação com o rendimento ou composição do leite (percentagens de gordura, proteína e CN) foram pouco ou moderadamente negativas. Estes resultados indicam que a resposta correlacionada da capacidade de CL para alterações no rendimento e composição do leite, como ditada pelas metas de reprodução das populações de gado leiteiro, deverá ser limitada. Além disso, eles fornecem evidência do papel limitado que a percentagem de CN pode jogar como um traço indicador em programas de melhoramento que visam aprofundar o tempo de coagulação. Recentemente, tem sido relatado que a composição de proteínas do leite afeta a variação das suas propriedades de coagulação (Cecchinato et al., 2011).

A CSS apresentou correlações genéticas positivas com o tempo de coagulação do leite. Foi também relatado que o tempo de coagulação não se correlacionou com características de saúde do úbere da vaca e estimaram uma correlação genética moderada entre o tempo de coagulação e a CCS (Cecchinato et al., 2011).

Tyrisevä et al. (2008) descobriram vários *loci* que afetam tanto o leite NC como a capacidade de CL. Alguns dos *loci* encontrados também foram associados com o pH do leite.

A capacidade de CL é uma característica quantitativa, e assim, afetada por muitos genes, alguns com efeitos maiores do que outros. Alguns alelos destes genes podem mesmo ter efeitos dramáticos, causando leite NC, o que, inevitavelmente, afeta a estrutura do conjunto de dados coletados. As vacas que produzem leite NC constituem

um grupo muito heterogêneo para os genes que afetam a capacidade de coagulação do leite, em geral, ao passo que as vacas que produzem leite com excelentes propriedades de coagulação, provavelmente, possuem predominantemente bons genes para a PCL (Tyrisevä et al., 2008).

Uma vez que os próprios genes de CN não parecem ser a causa da não coagulabilidade, a hipótese seguinte mais óbvia é a ocorrência de uma mutação desfavorável no gene ou genes responsáveis pela modificação pós-traducional (fosforilação e glicosilação) dos genes de CN ou nos genes que controlam a sua atividade. A modificação pós-traducional das CN, em grande medida, influencia a sua capacidade de se ligar ao Ca e o seu grau de hidrofobicidade, a qual vai afetar posteriormente a estrutura das micelas de CN. Foram encontrados dois genes candidatos. Ambos são enzimas que catalisam a modificação pós-traducional dos aminoácidos. Ambos os genes são fortes candidatos, mas os seus papéis na não coagulação de leite ainda deve ser verificado (Tyrisevä et al., 2008). Em muitos países, verificou-se que, como um resultado da criação de gado, tem vindo a aumentar a produção de leite, mas as PCL têm vindo a diminuir, e o número de vacas que produz leite NC tem vindo a aumentar (Jõudu et al., 2009).

O estudo de Tyrisevä et al. (2008) foi o primeiro que teve como objetivo localizar regiões genómicas associadas com o fenómeno de leite NC em gado leiteiro. Dois resultados altamente significativos de mapeamento de genes associados com a não coagulação do leite surgiram sobre as famílias nos cromossomos 2 e 18. Descobriu-se também outros *loci* associados com a capacidade de coagulação, pH, e CCS do leite. Foram encontrados indícios de que as mesmas regiões nos cromossomos 4 e 27 estão associadas, tanto com a capacidade de coagulação como com o pH do leite.

Em Tiezzi et al. (2013) verificou-se uma relação fraca entre o pH do leite e as PCL a nível ambiental e genético. Os resultados para as relações genéticas são muito mais baixos do que os relatados por outros autores.

As variações genéticas para as PCL previstas por espectroscopia de infravermelho médio existente podem ser exploradas para melhorar o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada em vacas leiteiras. No geral, características de qualidade do leite

medidas durante a coleta de dados de rotina não fornecem uma ferramenta valiosa para prever as PCL, nem para aumentar a precisão da estimativa do valor genético (Tiezzi et al., 2013).

2.1.2.2. Efeito da Raça Sobre as PCL

Diferentes estudos têm focado a avaliação dos traços e da capacidade de CL para as raças de vaca, ovelha e cabra. As amostras são analisadas para a capacidade de CL, o tempo de coagulação, e firmeza da coalhada, bem como as percentagens de proteína e gordura, CCS, acidez, e contagem bacteriana. A conclusão foi de que a raça é a mais importante fonte de variação para as PCL (Hoxha e Mara, 2012).

Como mencionado anteriormente, vacas da raça HF tendem a produzir mais leite NC do que outras raças, o que pode afetar a CL ao nível da exploração leiteira (Harzia et al., 2013). O leite de vacas HF é geralmente caracterizado por um processo de coagulação mais lento do que o leite de vacas de outras raças, mesmo que a incidência de amostras de leite NC seja raramente relatada na literatura (Malacarne et al., 2006).

As diferenças de raça nas PCL e na qualidade do queijo podem basear-se nas diferenças de genótipos da proteína e composição físico-química do leite. O leite NC está também associado à raça e constitui uma matéria-prima extremamente pobre para a produção de queijo (Tyrisevä et al., 2004).

Os fatores ambientais sistemáticos, tais como, estágio de lactação, paridade e estação do ano afetam as PCL, afetando a sua composição química. Estas são ainda afetadas através do manejo, alimentação e raça das vacas (Tyrisevä et al., 2004), por parâmetros físico-químicos, como acidez titulável, concentração de coalho adicionado e pelo polimorfismo genético das proteínas (Sturaro et al., 2012).

Uma vez que a metodologia utilizada e, principalmente, o tipo e concentração de coalho podem modificar o tempo médio de coagulação, a frequência de amostras de leite NC e, em menor medida, a firmeza da coalhada das amostras, qualquer efeito da raça não pode ser plenamente avaliado, quando a duração do teste tradicional é empregue (Bittante et al., 2013).

Comparações entre raças, em estudos anteriores, usaram as médias dos dados das amostras que coagularam bem. No entanto, as proporções de amostras de leite NC variam consideravelmente entre raças. Ao analisar e comparar duas raças de vacas leiteiras, constatou-se que 3,5% das vacas Brown Swiss (BS) produziram leite NC, em comparação com os 9,7% das vacas da raça HF (Bittante et al., 2013).

Para além das grandes diferenças entre as raças, tem sido mostrado que as PCL são hereditárias quando medidas, quer direta ou indiretamente, a partir de espectros de infravermelho médio de leite não processado (Bittante et al., 2013).

Jensen et al. (2012) não identificou nenhuma variabilidade significativa na CCS ou na produção de leite entre as classes de coagulação dentre as raças Jersey e HF. A comparação entre as duas raças revelou que, o leite de vacas Jersey, em geral, exibe propriedades de coagulação superiores, quando comparado com o leite das vacas HF (Jensen et al., 2012).

Pode-se argumentar que qualquer efeito da raça não pode ser plenamente avaliado, quando a duração do teste tradicional é empregada. As influências reconhecidas dos valores das PCL sobre a escolha dos processos tecnológicos e sobre o rendimento do queijo, provavelmente, podem ser melhor quantificadas e compreendidas se o período de observação for prolongado, para eliminar amostras de leite NC, e pelo uso dum modelo adequado para interpretar as tendências observadas (Bittante et al., 2013).

As PCL são economicamente importantes na indústria de laticínios, especialmente, no fabrico de queijo. A capacidade de CL varia, consideravelmente, entre as espécies ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos), entre raças dentro das espécies, e entre os indivíduos dentro de cada raça. As variações ocorrem no tempo de coagulação, na firmeza da coalhada, e no desenvolvimento de sinérese. As raças de gado são caracterizadas por grandes variações na capacidade de coagulação. O leite de vacas de raças originárias do sul da Europa e Ilhas de Jersey e Guernsey é geralmente mais valioso em termos de fabricação de queijo (exibindo coagulação mais cedo e maior firmeza da coalhada) do que leite de raças que se originaram na Europa central e do norte, nomeadamente a HF e raças escandinavas (Bittante et al., 2012).

Para ambas as raças, foram identificados conteúdos significativamente mais baixos de proteína e CN total, no leite mal coagulado e leite NC, em comparação com leite com boa capacidade de coagulação. No leite de vacas da raça Jersey, foi identificado leite que coagula mal com um pH inferior significativo, por outro lado, foi detetado um teor de gordura significativamente mais baixo no leite que coagula mal e leite NC de animais da raça HF, assim como uma maior quantidade de CN no leite de coagula mal nos animais dessa raça. Não foram encontradas diferenças na composição do leite entre leite que coagula mal e leite NC da raça HF. Esta investigação mostrou uma variação no leite, em geral, e na composição de minerais e proteínas em relação à PCL de vacas individuais da raça Jersey e HF. As amostras representado extremos em relação à capacidade de coagulação, e nas quais se verificou que o leite de vacas da raça Jersey em geral, apresenta propriedades de coagulação superiores em comparação com o leite de vacas da raça HF, o que está de acordo com outros estudos. Este resultado é, provavelmente, explicado pelo maior teor de proteína no leite dos animais da raça Jersey, comparativamente com o do leite de vacas HF (Quadro 7), o teor de proteína encontra-se positivamente associado uma boa capacidade de coagulação induzida por adição de coalho. Os principais resultados do estudo incluem diferenças significativas na composição do leite entre as classes de coagulação para ambas as raças, mostrando menores teores de proteína total e CN total, em leite que coagula mal e leite NC, em comparação com leite com boa capacidade de coagulação. Isso é importante em relação à produção de queijo, porque estudos anteriores mostraram que a produção de queijo está positivamente correlacionada com a concentração de CN (Jensen et al., 2012).

Foi avaliado o efeito da composição do leite nas PCL de vacas leiteiras HF e Jersey. A composição da PL apenas explicou parcialmente a variação total das PCL. No entanto, o processo de transformação de leite em queijo é muito complexo, com muitas variáveis significativas, o que faz com que seja difícil encontrar um único, ou poucos marcadores, para as propriedades de fabricação do queijo (Wedholm et al., 2006).

Quadro 7: Composição físico-química do leite de três raças bovinas leiteiras

Raça	Sólidos totais (%)	Gordura (%)	Caseína (%)	Lactose (%)	Cinza (%)
<i>Holstein-Friesian</i>	11,91	3,56	2,49	4,61	0,73
<i>Jersey</i>	14,15	4,97	3,02	4,70	0,77
<i>Brown Swiss</i>	12,69	3,80	2,63	4,80	0,72

Fonte: Adaptado de Larson (1985)

De acordo com Cecchinato et al. (2011), com exceção da relação entre o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada 30 minutos após a adição do coalho, as correlações genéticas das PCL com o pH e acidez titulável são os relacionamentos que exibem maior magnitude, tanto para vacas HF e BS. O pH baixo e a elevada acidez titulável encontram-se correlacionados com um tempo de coagulação mais curto e firmeza da coalhada, que são propriedades leiteiras desejáveis para produção de queijos. Isto sugere que a variação na acidez do leite pode ser explorada para aumentar a capacidade de CL. Verificou-se em maior magnitude a associação genética do tempo de coagulação com o pH para as vacas BS do que para vacas HF. A firmeza da coalhada exibiu relações estreitas com traços de acidez do leite, sendo relatado que esta diminuiu com o aumento do pH e, em geral, as amostras de leite não coagulam quando o pH é maior do que 6,85 (Cecchinato et al., 2011).

A inclusão de informações relativas ao leite NC diminuiu as correlações estimadas de tempo de coagulação com outros traços em relação às estimativas obtidas com o modelo linear padrão. As exceções foram as correlações genéticas com CCS e pH que, quando os dados do leite NC foram incluídas em um modelo linear, resultou em uma estimativa mais elevada em comparação com o padrão linear modelo. A CCS e pH foram as únicas características que apresentam correlações positivas com o tempo de coagulação na análise omitindo registros de leite NC. As variações absolutas de correlações entre tempo de coagulação e outras características foram maiores para a produção e composição do leite do que para a CCS e acidez do leite (Cecchinato et al., 2011).

As relações genéticas das PCL com a produção e composição de leite, CCS, e acidez foram estimados para as raças HF e BS, incluindo informações acerca de leite NC.

Com base nos parâmetros estimados, são esperados efeitos limitados sobre as PCL a partir de cruzamentos seletivos com o objetivo de melhorar a produtividade e os teores de gordura e proteína do leite. A inclusão de registros de leite NC nos dados e utilização de modelos estatísticos apropriados é aconselhável, especialmente quando existe maior prevalência de leite NC (Cecchinato et al., 2011).

O fenómeno de leite NC tem sido largamente observado em vacas da raça HF. A derradeira causa do fenómeno ainda não foi estabelecida. Além disso, também ainda não foi estabelecida uma estrutura exata das micelas de CN, o que torna a tarefa mais difícil. No entanto, existem alguns consensos em relação à estrutura da micela: (a) o papel de estabilizador hidrofílico da κ -CN na superfície da micela e (b) ligações de Ca-P entre α_{s1-} , α_{s2-} , e β -CN no núcleo da micela. Como as CN são ligadas entre si para formar uma estrutura tridimensional, e se existem ou não submicelas encontra-se ainda sob debate, principalmente porque a estrutura da micela não pode ser cristalizada (Tyrisevä et al., 2008).

Os fatores que mais afetam a CL nas raças BS e HF são a exploração, a percentagem de CN e a acidez do leite. Para as vacas BS, a CCS tem um valor mais significativo sobre as PCL do que para as vacas HF. Apesar de ser necessários mais estudos para investigar o efeito destas fontes de variação no rendimento do queijo, os resultados indicam que estes fatores podem vir a ser usados como características que reforçam as propriedades tecnológicas do leite bovino (Cecchinato, 2013).

Num estudo efetuado em Itália foram analisadas amostras de leites de 5 raças bovinas (HF, BS, Simmental, Rendena e Alpine Gray) em relação às suas propriedades de coagulação. Esse estudo demonstrou que as PCL são altamente variáveis, especialmente, em relação à raça e às estações do ano. O leite da raça HF demonstrou uma aptidão razoável em termos de qualidade para a produção de queijo. Contudo, as outras raças produzem um leite caracterizado por melhores PCL (De Marchi et al., 2007).

Em De Marchi et al. (2007) concluiu-se que as raças bovinas locais analisadas são muitas vezes caracterizadas por possuírem uma maior robustez, fertilidade, longevidade e adaptabilidade ao ambiente montanhoso, o que pode compensar o seu menor nível de produção de leite. As espécies locais Alpine Gray e Rendena tiveram os melhores

resultados para as PCL, confirmando que o risco de extinção de algumas raças, e consequente redução da biodiversidade, pode causar perda de características genéticas economicamente viáveis e que este risco ainda não se encontra completamente estudado.

O desenvolvimento de um sistema de pagamento de leite que tenha em conta o seu valor intrínseco para a produção de queijo pode ser uma oportunidade importante para conservar as espécies locais em perigo de extinção, mantendo os seus recursos genéticos. Para além do seu valor genético, estas raças exercem uma influência positiva na sustentabilidade da produção de leite em ambiente frágeis, como em áreas montanhosas (De Marchi et al., 2007).

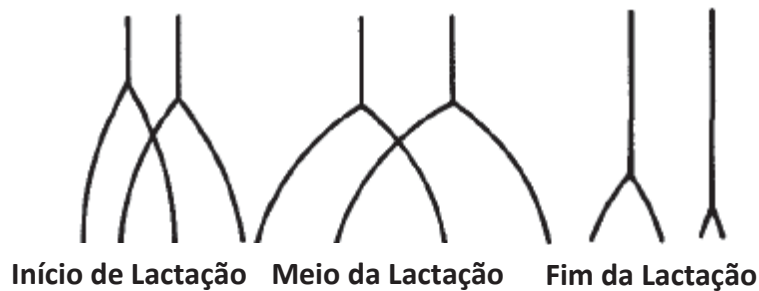
2.1.2.3 Efeito da Fase de Lactação da Vaca Sobre as PCL

Durante a lactação a composição do leite tende a mudar, uma vez que com o crescimento do bezerro as suas necessidades nutricionais mudam ao longo do tempo. Talvez, devido a estas mudanças biológicas a capacidade de CL muda ao longo da lactação (Harzia, 2013).

Tem sido observado que o leite com más propriedades de coagulação e leite NC poderá vir de amostras de leite de vacas no início de lactação, e as deficientes propriedades de coagulação devidas a diferenças de composição e distribuição dos sais do leite. No entanto, o fenómeno de leite NC também foi observado em vacas saudáveis no meio da lactação (Frederiksen et al., 2011b).

No estudo de Tyriseva et al. (2004) a fase de lactação da vaca provou ter um forte efeito sobre o tempo de coagulação, firmeza da coalhada, e pH do leite. A capacidade de CL revelou-se superior no início e no final da lactação (Figura 17). No entanto, as PCL no final da lactação não atingiram o mesmo nível daquele que foi obtido no início da mesma. Em vacas da raça HF, todas as amostras de leite NC estavam no fim da lactação. O pH do leite foi mais baixo no início da lactação, aumentou acentuadamente até ao segundo mês e aumentou de forma constante até ao fim da lactação. Sabe-se que o conteúdo de Ca do leite é mais alto no início e no fim da lactação, o que pode, em parte, explicar as boas PCL durante esses períodos (Tyriseva et al., 2004).

Figura 17: Traços típicos da coagulação do leite, obtidos pelo formográfico, de vacas em diferentes estádios de lactação.



Fonte: Adaptado de Okigbo et al. (1985)

Num estudo de Cecchinato (2013) constatou-se que a parição, a produção diária de leite, a ingestão de matéria seca e a gordura têm efeitos menores sobre o tempo de coagulação que outros efeitos individuais. O leite de vacas em início de lactação exibe um tempo de coagulação mais favorável, tanto para a raça HF como para a raça BS. Para ambas as raças, o rácio de coagulação, diminui rapidamente até ao meio da lactação e recupera após esse período. Esta melhora é mais pronunciada para as vacas HF do que para as BS.

Sob as mesmas condições, número de partos, ingestão de matéria seca e composição do leite, vacas com maior produção diária de leite revelaram melhores PCL que vacas com menos produção de leite, contudo, o efeito foi apenas significativo para vacas da raça BS (Cecchinato, 2013).

De acordo com o estudo de Harzia (2013), a curva estimada para a firmeza da coalhada manteve valores favoráveis durante toda a lactação sem picos visíveis. No meio da lactação foi registada a formação de uma coalhada pouco consistente. Outra característica que permite descrever a capacidade de coagulação é o tempo de coagulação, que foi melhor durante os primeiros 18 dias (menos de 6 minutos) e pior durante o meio da lactação.

O leite NC está associado com o pico e o meio da lactação, mas tal facto não pode ser explicado inequivocamente por nenhum dos fatores ambientais. Assim, a causa do leite NC não pode ser puramente ambiental. A primeira indicação foi a observação de

que muitas das vacas produtoras de leite NC, em conjuntos de dados, eram filhas de touros estreitamente relacionados. Muitos touros tiveram grandes grupos de filhas, e detetou-se diferenças claras na proporção das vacas produtoras de leite NC entre touros (Tyrisevä et al., 2008).

Os efeitos de fatores ambientais sistemáticos ainda necessitam de confirmação, porque existem poucos estudos que conseguiram cobrir todo o ciclo de lactação dos animais e foram publicados poucos estudos relativos ao efeito da parição nas PCL (Tyrisevä et al, 2003).

No estudo de Tyrisevä et al. (2003) para a maioria das vacas pariram no outono e as que se encontravam no final da lactação durante a estação do pastoreio (primavera, outono) é possível que parte dos efeitos favoráveis do final da lactação na capacidade de CL foi devida aos efeitos parcialmente confundidos da estação do pastoreio.

As PCL são influenciadas pela exploração, mas esta influência é muito menor do que a exercida sobre outros traços de leite (produção de conteúdos, acidez, e de saúde mamária). Isso significa que as instalações de alojamento, alimentação, higiene e manejo da exploração modificam as PCL, apenas de forma limitada. Não são fortemente influenciadas por qualquer idade da vaca ou de paridade, e os dados obtidos a partir de diferentes lactações do mesmo animal podem ser combinados. São muito mais influenciadas pelo estágio de lactação da vaca e, como a produção de leite e conteúdo, requerem modelagem adequada. São fortemente influenciadas pelo ambiente permanente de uma vaca; a repetibilidade individual é alta e não há necessidade de provar frequentemente uma vaca para caracterizar as suas PCL (Bittante et al., 2012).

2.1.2.4. Efeito da Contagem de Células Somáticas Sobre as PCL

As boas práticas de ordenha ao nível da higiene e saúde do animal têm um efeito sobre a CL. O leite com mamites ou com um valor elevado de CCS tende a coagular mal ou não coagular; um maior teor de CCS altera a proporção de proteínas do leite e ácidos gordos, e aumenta a atividade enzimática. Como as vacas ficam mais velhas e o número de aleitamentos aumenta, a coalhada fica mais fraca. Tem-se observado que a capacidade de coagulação também pode ser alterada pela alimentação (Harzia, 2013).

A CCS exibe correlações genéticas positivas com o tempo de CL, após adição do coalho. Uma baixa CCS está correlacionada com a formação de uma coalhada mais firme, o que é desejável em termos de fabrico de queijo. Uma possível explicação é que o aumento da CCS no leite está associado ao aumento da atividade da plasmina. A acumulação de produtos de degradação de plasmina pode alterar a coagulação, porque esses componentes interferem com as micelas responsáveis pela formação do coalho. A plasmina pode rapidamente unir tanto a β -CN em γ -CN e polipeptídeos menores e α_{s1} e α_{s2} -CN. O aumento da atividade da plasmina é um fator importante para os recursos de coagulação com deficiência e degradação da CN. O aumento da atividade da plasmina leva à diminuição da produção de queijo e a alterações na funcionalidade das proteínas do leite que afetam a coagulação (Cecchinato et al., 2011).

A variação da composição do leite depende da fase de lactação, idade da vaca, mês de amostragem, CCS e variantes genéticas, influência as PCL. As alterações na composição do leite, devido a vários graus de mamites, que estão associadas com níveis elevados de CCS estão bem estabelecidas. As associações entre CCS no leite e as mudanças nas proporções relativas de CN individuais também foram relatados. Uma diminuição significativa de β -CN, devido ao aumento da CCS no leite pode contribuir para alterações no processo de fabricação de queijo. Juntamente com a mamite tem sido relatado um aumento na proporção de solúvel de CN micelar. O leite mastítico tem propriedades de coagulação inferiores, o que conduz a uma fraca produtividade e qualidade do queijo. Grande parte da informação disponível foi obtida a partir de um número limitado de amostras de leite. Na maioria dos casos, o leite de vacas com mamites foi utilizado com CCS superior a 1.000.000/ml, uma condição extrema (Poliutis and NG-Kwai-Hang, 1988).

O nível de CCS influenciou significativamente o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada. Uma elevada CCS foi associada a um aumento significativo no tempo de coagulação, o que está de acordo com os achados anteriores. Não houve diferença significativa no tempo de coagulação entre amostras de leite que contêm uma CCS entre 100.000 e 500.000/ml. O leite contendo entre 600.000 e 1.000.000/ml esteve associado com um tempo de coagulação maior do que leite com uma CCS de 100.000/ml (Poliutis e NG-Kwai-Hang, 1988).

As amostras de leite com CCS elevada continham componentes sanguíneos que podem ter reagido com as CN individuais e convertendo-as em produtos que não participam na formação da coalhada, mas que ficam retidos na coalhada. O aumento da CCS está associado a um aumento significativo na atividade da plasmina. Pode ser postulado que a acumulação de produtos de degradação de plasmina também pode afetar o processo de coagulação, porque esses componentes podem interferir com a agregação de micelas responsáveis pela formação do coalho. O efeito indesejável da CCS na firmeza da coalhada poderia ser explicado pelo fato de que a β -CN foi extensivamente hidrolisada no leite com elevada CCS. Tem sido demonstrado que a β -CN é essencial para o endurecimento da coalhada (Poliutis and NG-Kwai-Hang, 1988).

De acordo com Poliutis e NG-Kwai-Hang (1988) entre as CN individuais, a K-CN é mais importante para a firmeza da coalhada do que qualquer outro tipo de CN. Tal facto contrasta com outras descobertas que verificaram que a α_s -CN encontra-se melhor correlacionada com a força do coágulo. Estes resultados também estão em contraste com outros estudos, nos quais se observou que a β -CN foi essencial para o endurecimento da coalhada. Esta discrepância é possivelmente explicada pelos diferentes métodos de avaliação das PCL utilizados. A CN individual e CN total apresentaram tendências similares de propriedades de coagulação. Isto pode ser atribuído ao facto de que um aumento em qualquer um dos fatores individuais de CN contribui para um aumento global da CN total (Poliutis and NG-Kwai-Hang, 1988).

Num estudo recente, que teve por objetivo estudar a relação causal entre as características tradicionais de qualidade do leite (CCS e percentagem de CN) e as PCL, foram observados os efeitos causais da CCS e da percentagem de CN sobre o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada 30 minutos após a adição do coalho, o que sugere que a relação entre a capacidade de CL e as características tradicionais de qualidade do leite depende em maior medida de causas fenotípicas do que diretamente de influências genéticas (Tiezzi et al., 2015).

O estudo de Tiezzi et al. (2015) incidiu sobre as relações causais entre duas características tradicionais da qualidade do leite (CCS e percentagem de CN) e as PCL (tempo de coagulação e firmeza da coalhada). Os resultados deste estudo sugerem que as variâncias genéticas aditivas das PCL não dependem dos traços de qualidade do leite

apontados. Se a seleção é feita com base nesses traços as PCL apenas serão melhoradas indiretamente e em pequena extensão. Isto significa que a seleção para as PCL deve ser efetuada através das suas medições diretas, e não depender inteiramente de traços correlacionados, uma vez que intervenções externas sobre esses traços podem acabar com as correlações casuais. Incluir simultaneamente o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada em avaliações genéticas parece ser redundante, considerando que a firmeza da coalhada depende largamente do tempo de coagulação.

Enquanto o tempo de coagulação não parece ser largamente controlado pela CCS e pela percentagem de CN, algumas variações na firmeza da coalhada 30 minutos após a adição do coalho dependem da expressão fenotípica destas características. Contudo, a firmeza da coalhada 30 minutos após a adição do coalho depende fortemente do tempo de coagulação. Os resultados também indicaram que, quando os efeitos diretos da CCS, percentagem de CN e tempo de coagulação são considerados simultaneamente, a maioria da variabilidade genética da firmeza da coalhada após a adição do coalho é influenciada por outras características (Tiezzi et al., 2015).

O leite de vaca com mamites está associado a um pH elevado e níveis mais baixos de CN, mais sólidos e plasmina, e tem sido indicado como tendo efeitos negativos na produção de queijo (Hallén, 2008).

O estado geral de saúde da vaca leiteira, também desempenha um papel importante na qualidade do leite. Leite com uma elevada CCS ($CCS > 500.000$ células/ml) reduz o rendimento de queijeiro, devido a uma maior atividade proteolítica, uma menor concentração de gordura e CN, e um conteúdo mais elevado de proteínas do soro, albumina e, em especial, de imunoglobulinas (Frederiksen et al., 2011b).

Diversas características de fabricação de queijo são afetadas pela mamite, incluindo: aumento do tempo de coagulação, diminuição da firmeza do coágulo formado, maior perda de componentes do leite para o soro, menor rendimento de fabricação, defeitos de textura e alterações das características organoléticas (Santos, 2003).

A firmeza da coalhada exibiu relações estreitas com os traços de acidez do leite. Esta diminui quando se dá o aumento do pH e, em geral, as amostras de leite não

coagulam, quando o pH é maior do que 6,85. A plasmina é menos ativa no leite de pH baixo. Devido à existência de associações entre a CCS, pH e atividade da plasmina, pode prever-se as relações recorrentes entre essas características, o que não é possível separar nos estudos (Cecchinato et al., 2011).

A seleção para o tempo de coagulação e firmeza da coalhada 30 minutos após adição do coalho não deve ser efetuada através da correlação com características como a CCS ou a percentagem de CN, mas através de medidas diretas, porque a CL melhora, em maior escala, através do efeito causal que o primeiro (tempo de coagulação) tem sobre o segundo (firmeza da coalhada 30 minutos após adição do coalho), do que devido a uma fonte comum de variação genética. Quebrar a ligação causal (padronização da CCS e percentagem de CN antes que o leite seja processado em queijo) irá reduzir o impacto do melhoramento devido à reprodução seletiva (Tiezzi et al., 2015).

2.1.2.5. Efeito da Dieta do Animal Sobre as PCL

Alimentar os animais com concentrados apenas duas vezes por dia tem um efeito ligeiramente desfavorável sobre as PCL e o pH, em comparação com as vacas alimentadas com concentrado com mais frequência (Tyriseva et al., 2004).

Em Tyriseva et al. (2004), a frequência da alimentação não teve qualquer efeito sobre a proporção de amostras de leite NC, mas a produção de leite que coagula mal foi 10% mais comum para as vacas alimentadas apenas duas vezes por dia. Por outro lado, alimentar as vacas leiteiras com concentrado apenas duas vezes por dia, teve um efeito muito negativo sobre a produção de leite, gordura e proteína. As vacas alimentadas duas vezes por dia com concentrado produziram cerca de 1000kg a menos de leite, 25kg a menos de gordura, e 30kg a menos de proteína por ano, em comparação com as vacas alimentadas quatro vezes por dia com concentrado. A frequência de alimentação não teve nenhum efeito claro sobre o teor de proteína, mas o conteúdo de gordura diminuiu linearmente ao longo das frequências de alimentação. No mesmo estudo, constatou-se que o tipo de concentrado utilizado não teve efeito na proporção de amostras de leite que coagula mal e leite NC. O facto dos animais pertencerem à mesma exploração apenas explica uma pequena parte das variações no pH e nas PCL.

A frequência da alimentação dos animais com concentrado pode ser associada ao estado de energia das vacas, embora os resultados na literatura sejam contraditórios. Com base em algumas experiências, alimentar mais frequentemente os animais com concentrado, aumentou a produção de leite, proteína e/ou gordura. Por outro lado, em alguns estudos, uma maior frequência na alimentação das explorações com concentrado não teve uma resposta positiva sobre as características de produção de leite. Uma explicação dos resultados contraditórios pode ser a interação entre o concentrado e o tipo de forragem, a sua proporção na dieta, e o nível de produção de leite (Tyriseva et al., 2004).

Alguns estudos observaram um efeito favorável na administração de uma dieta altamente calórica sobre as PCL. Foi também detetada uma associação favorável entre a oferta diária de forragem e boas PCL (Tyriseva et al., 2004).

O balanço energético das vacas no início da lactação acaba por afetar as PCL durante toda a lactação, assim, vacas com um balanço energético positivo estão associadas a leite com boas propriedades de coagulação. Observou-se que a percentagem de amostras de leite que coagula mal diminuiu à medida que aumenta o nível de energia da dieta dos animais. No entanto, tal situação não foi associada ao leite NC (Tyriseva et al., 2004).

É possível que explorações mais modernas alimentem os seus animais com maior regularidade e utilizem uma combinação de mistura de forragens e alimentos compostos para animais com mais frequência do que as explorações mais tradicionais. No entanto, o tipo de exploração explica apenas uma pequena parte da variação na capacidade de CL (Tyriseva et al., 2004).

O efeito da dieta nas características químicas e nas PCL de vacas BS e HF foi examinado por Malossin et al. (1996), tendo o período experimental decorrido entre a nona e a vigésima semanas de lactação dos animais em estudo. O aumento do nível de ingestão calórica diária dos animais levou a um aumento na concentração de proteína e CN do seu leite e melhorou as suas propriedades de coagulação. Uma análise de todo o procedimento experimental revelou que as vacas BS, em comparação com as vacas HF, produzem leite com conteúdo significativamente mais elevado de proteína, CN, Ca e P,

com efeitos positivos na qualidade do queijo produzido, particularmente, na firmeza do gel formado.

A falta de interações significativas entre raça e dieta, relativamente à composição do leite e aos seus parâmetros reológicos demonstrou que as consequências de modificações dietéticas são independentes da raça (Malossin et al., 1996).

2.1.2.6. Efeito do Cálcio e do Fosfato sobre as PCL

O Ca está presente no leite sobre várias formas, parte sob a forma iónica Ca^{2+} , o restante ligado ao citrato, fosfato ou proteínas do soro. No estado coloidal, o Ca pode estar complexado com o estér de fosfato ou grupos carboxil das micelas de CN ou, com fosfato coloidal (e citrato) associado com a micela de CN (Okigbo et al., 1985b).

Parte dos aniões de fosfato no leite encontram-se distribuídos no estado coloidal, outra parte como fosfato inorgânico livre e o restante ligado ao Ca no soro do leite. Quanto ao citrato presente no leite, uma parte encontra-se incorporada nas micelas de CN (Okigbo et al., 1985b).

A taxa de coagulação enzimática do leite encontra-se relacionada inversamente com o pH e é sensível a pH entre 6,5 e 7, sendo este efeito agravado por alterações na atividade do Ca^{2+} causadas por mudanças do pH. A acidificação direta com ácido clorídrico causa a redução da concentração de fosfato de cálcio coloidal e do tempo de coagulação enzimática, provavelmente, devido ao aumento concomitante da atividade do Ca^{2+} . Se a atividade do Ca^{2+} for mantida constante, então o tempo de coagulação enzimática aumenta, tanto abaixo como acima do pH natural do leite (Okigbo et al., 1985b).

A acidificação do leite causa o aumento da CN do soro, possivelmente, como resultado da perda de Ca a partir da micela. A adição de fosfato tem um efeito similar, contudo, a adição de Ca move a CN do soro para a forma micelar. Se o leite é acidificado com ácido cítrico, a atividade do Ca^{2+} mantém-se constante, sendo o fosfato de cálcio coloidal reduzido. No leite existe uma grande reserva de Ca na forma de fosfato de cálcio

coloidal em equilíbrio com o Ca^{2+} livre. Como os íons de Ca^{2+} encontram-se em complexo com o citrato, o fosfato de cálcio coloidal dissolve-se para reequilibrar o sistema e manter a atividade do Ca^{2+} (Okigbo et al., 1985b).

A acidificação com o ácido cítrico causa a retardação da coagulação. Não foi observada coagulação a pH 6,4 neste sistema. Reduzir o fosfato de cálcio coloidal por acidificação e diálise também retarda a coagulação enzimática. A coagulação também não é observada após a remoção de 30% de fosfato de cálcio coloidal. O coalho atua sobre toda a CN na presença de Ca^{2+} , na ausência de fosfato forma apenas um precipitado floculento no lugar do gel firme (Okigbo et al., 1985b).

Monitorizar as mudanças de turvação durante a coagulação enzimática do leite não diluído fornece informações adicionais sobre os efeitos da alteração do equilíbrio cálcio-fosfato na coagulação. Tais medições podem ser relacionadas com mudanças na firmeza e viscosidade da coalhada. A detecção de coagulação pela turvação foi possível bastante antes do desenvolvimento da medição da firmeza da coalhada através do formográfico (Okigbo et al., 1985b).

Alterações na concentração de Ca afetam não apenas a taxa na qual a coagulação ocorre mas também a firmeza da coalhada. As medições de turvação sugerem que o aumento da concentração de Ca inibe a gelificação, enquanto reforça a agregação de micelas de para-CN. Consequentemente, a rede de gel torna-se menos extensiva, apesar da coalhada ser mais firme (McMahon et al., 1984).

A adição de cloreto de cálcio ao leite é uma prática comum na indústria queijeira, tanto para a produção de queijo por coagulação enzimática como ácida. No processo enzimático, a acidificação do leite é fraca antes da coagulação e o grau de solubilização do Ca ligado à CN é baixo ou inexistente. Consequentemente, a CL resulta numa rede tridimensional formada por micelas de CN com a sua estrutura original. Na coagulação mista, a CL começa com uma pequena quantidade de coalho, a uma temperatura baixa (cerca de 20°C) e a acidificação é prolongada até que o ponto isoelétrico do pH da CN é atingido. A solubilização progressiva de sais ligados à CN leva a uma desmineralização quase completa a pH 5,0. O que sugere que a adição de cloreto de cálcio ao leite não se justifica (Gastaldi et al., 1994).

Em Gastaldi et al. (1994) foram investigadas as mudanças na solubilização do Ca após a adição de cloreto de cálcio ao leite reconstituído. A análise do Ca solúvel e iônico mostrou que a distribuição do Ca adicionado foi bastante rápida e as micelas do leite enriquecido permaneceram mais mineralizadas a pH de 6,7 a 5,0. Na presença de quantidades suficientes de coelho e iões de hidrogénio, a hidrólise da κ -CN e os rácios de agregação aumentaram com a adição de Ca. A suplementação de Ca leva ao prolongamento da manutenção da estrutura micelar e a uma drenagem mais fácil da coalhada. Assim, pode ser usada como uma vantagem para o fabrico de queijo através de coagulação ácida.

A remoção de fosfato coloidal leva a alterações nas propriedades do leite, das quais o aumento da viscosidade, o aumento gradual da sensibilidade dos sais de Ca, e a aparente diminuição do grau de integração mútua de várias frações de CN são as mais destacáveis. A reintrodução do fosfato coloidal restaura de modo incompleto e, apenas em determinados casos, as propriedades originais do leite. Estas observações são interpretadas como favorecendo a conceção de ligações químicas entre o fosfato coloidal e a CN no leite (McGann e Pyne, 1960).

Considerando a concentração de Ca^{2+} como um fator significativo para a CL, foi descoberto que a coagulação começa com um nível mais baixo de hidrólise de κ -CN (30% no lugar de 90%) se a concentração de Ca^{2+} for aumentada de 3 mM para 60 mM. Finalmente, podemos concluir que o pH tem uma maior influência sobre o tempo de coagulação, particularmente, no tempo de coagulação do leite no qual são formados agregados a cada concentração de Ca^{2+} e é aplicada a temperatura de coagulação (Jovanović et al., 2002).

Apesar do número crescente de estudos, as causas da coagulação anormal do leite não se encontram completamente compreendidas. O objetivo do estudo de Malacarne et al. (2014) foi determinar as relações entre as características do leite e a sua capacidade de coagulação, focando-se na influência do Ca e do P, que são constituintes essenciais das micelas. O P micelar pode estar presente como parte do fosfato de cálcio coloidal (P inorgânico) ou ligado covalentemente às CN como grupos fosfato (CN-P). As amostras foram analisadas para a sua composição química (frações

proteicas e equilíbrio de minerais e sais) e para as suas propriedades reológicas. O leite ótimo para a CL foi caracterizado como aquele com maiores conteúdos em proteína e minerais, conteúdo mais baixo de cloretos e valores mais elevados de acidez titulável. O leite NC foi caracterizado por valores mais elevados de pH e mais baixos de acidez titulável. A nível micelar, o leite ótimo revelou os valores mais elevados de Ca coloidal, CN-P e Mg coloidal, enquanto o leite NC apresentou valores mais baixos para os mesmos constituintes. Curiosamente, não existiram diferenças estatísticas, relativamente, ao conteúdo de P coloidal inorgânico entre o leite ótimo e o leite NC. Em geral, uma elevada mineralização da micela afeta positivamente a sua coagulação. Contudo, uma mineralização excessiva pode levar a uma redução dos grupos fosfato disponíveis para a formação da coalhada.

As PCL são cruciais em relação ao fabrico de queijo e influenciadas por uma série de fatores diferentes, que têm implicações no conteúdo e composição das proteínas do leite. Estas são altamente afetadas por fatores, tais como o conteúdo total em CN, o conteúdo de α_{s1} -, α_{s2} -, β e κ -CN, a sua proporção relativa, e, além disso, pelo teor de íões de Ca, P, Na e K. Em relação ao Ca, a reação de coagulação é favorecida tanto pelos níveis aumentados de ligações Ca e de íões de Ca livres. A concentração do Ca^{2+} influencia a coagulação intervindo na fase secundária. Quando o conteúdo de Ca^{2+} é anormalmente baixo, a coagulação é lenta e obtém-se uma coalhada branda. Para evitar este defeito adiciona-se $CaCl_2$. O conteúdo de fosfato de cálcico coloidal também é importante no processo de coagulação, principalmente no que se refere à tensão do gel (Frederiksen et al., 2011b).

Quanto maior a quantidade de Ca solúvel presente no meio mais rápido será a formação do coágulo e maior a sua firmeza; quanto maior a percentagem de PL melhor será a sua coagulabilidade; e, quanto maior a concentração de enzimas, menor o tempo de CL (Paula et al; 2010).

O papel dos sais minerais na estrutura micelar da CN e no processo de CL é fundamental. Propriedades de coagulação deficientes têm sido ligadas a um menor teor dos principais catiões no leite, incluindo o Ca e o Mg, juntamente com um menor teor do anião principal, o P inorgânico, e até um conteúdo de citrato superior. Os minerais

do leite existem num equilíbrio dinâmico entre a fase do soro solúvel e a fase micelar coloidal. Esta distribuição mineral é influenciada por vários fatores, tais como o arrefecimento, a diminuição do pH, e um maior teor de citrato, que conduzem à dissolução do fosfato de cálcio, juntamente com a dissolução de pequenas quantidades de Mg e de citrato, a partir da fase micelar, influenciando negativamente as PCL (Jensen et al., 2012).

Wedholm et al. (2006) constatou que a concentração média de Ca entre as amostras de leite NC esteve abaixo da média em todas amostras de leite. Assim, é possível que a concentração inferior de Ca, em combinação com uma baixa concentração de κ -CN, seja responsável pelas amostras de leite NC. Assim, seria interessante avaliar a composição do leite num número significativo de amostras de leite NC.

Algumas diferenças entre leite normal e leite NC foram estabelecidas. Com base em vários estudos, o conteúdo de Ca (coloidal, ativo e total) é menor entre os leites NC do que em leites normais, e as micelas parecem ser mais hidratadas. Esta é provavelmente uma consequência direta do menor teor de Ca, porque aumenta a hidrofobicidade de CN Cálcio-vinculativas. Outra observação é que o conteúdo κ -CN parece ser menor no leite NC, e algumas indicações de maior pH do leite NC também têm sido relatadas. Revelando que há algo errado com as micelas. No entanto, a primeira fase do processo de coagulação, a clivagem da κ -CN micelar de estabilização em duas partes, é mais ou menos normal; com base em diversos estudos, o leite normal e leite NC diferem apenas ligeiramente no conteúdo em glicomacropéptido. O macropéptido é uma extremidade C-terminal da κ -CN que vai para o soro após a sua clivagem (Tyrisevä et al., 2008).

2.1.2.7. Efeito do Azoto Livre Sobre as PCL

Um estudo recente demonstrou o impacto positivo da gordura nas PCL e uma forte relação entre a lactose, a ureia e taxa de firmeza da coalhada, os quais merecem uma investigação mais aprofundada, devido à atual falta de conhecimentos acerca do mecanismo subjacente. Estes resultados demonstram a importância da utilização de

uma ampla gama de variáveis de composição do leite para a predição das suas propriedades de coagulação, e, portanto, como indicadores de adequação de leite para o fabrico de queijo (Bland et al; 2015).

Os conteúdos totais de proteína, ureia e citrato influenciam a CL, sendo que leites com maiores níveis de proteína total e menores níveis de ureia e citrato possuem melhores propriedades de coagulação (Frederiksen et al., 2011b).

O azoto não proteico representa apenas 5 a 6% do total de azoto presente no leite. A maior contribuição em azoto não proteico para o leite é a ureia, que é responsável pelo equilíbrio hidroelectrolítico do organismo. A ureia do leite pode provir duas fontes: como produto final da digestão ou do catabolismo dos aminoácidos. O azoto da ureia do sangue encontra-se positivamente associado com a ingestão de proteína degradada e não degradada por ruminação e negativamente associada com a ingestão de alimentos líquidos. Consequentemente, poderá vir a ser possível desenvolver um sistema de avaliação da proteína da dieta e do estado energético de vacas em lactação, utilizando a ureia do leite e a conjugação com a proteína efetiva do leite (DePeters e Ferguson, 1992).

Numerosos estudos demonstraram que altas concentrações de azoto ureico têm efeitos negativos no processo de fabrico de queijo. Estes são a causa direta e indireta de numerosos problemas, tais como aumento do tempo de coagulação, formação de uma coalhada mais frágil e menos estruturada, desenvolvimento irregular de fermentações e proteólises mais intensas. Com a análise do azoto ureico é possível evitar muitos dos problemas que afetam o fabrico de queijo (Hristova et al., 2014).

A elevada produção diária de leite, obtida através do melhoramento genético dos animais e de uma alimentação mais eficiente, não influencia visivelmente a qualidade do leite. No entanto, há uma redução na eficiência do processamento de leite em produtos lácteos concentrados. Poderá ser interessante determinar o conteúdo de ureia no leite, pelo menos em determinados períodos do ano, de modo a escolher os melhores leites para a produção de queijo (Hristova et al., 2014).

2.1.3. Leite que Não Coagula

O leite NC é definido como o leite que não forma um coágulo, 30 minutos após a adição do coalho (Jensen et al., 2012; Tyrisevä et al., 2008). É, portanto, uma matéria-prima pobre para a produção de queijo. Este fenómeno está associado ao pico de lactação da vaca, mas algumas vacas produzem leite NC de forma persistente (Tyrisevä et al., 2008). As razões subjacentes a este fenómeno estão relacionadas tanto com fatores genéticos como ambientais (Harzia et al., 2012; Frederiksen et al., 2011b).

Em Harzia et al. (2012), o baixo desempenho das amostras avaliadas quanto à sua capacidade de coagulação é ainda mais preocupante, quando são consideradas referências da literatura especializada, que indicam não haver melhora do produto mesmo quando misturada uma proporção igual de leite de boa qualidade, ou seja, ainda que o problema possa ter caráter individual, a mistura do leite de vários animais para fabricação de queijo pode, mesmo assim, constituir uma matéria-prima de qualidade duvidosa, quanto ao seu desempenho tecnológico e quanto ao rendimento dos queijos produzidos.

Há alternativas tecnológicas para obtenção de queijos a partir de leites com dificuldades de coagulação, como a redução do pH e a adição de uma dose adequada de CaCl_2 . Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de identificar e controlar as causas dos problemas de CL, mas certamente o uso de metodologias analíticas de rotina para avaliação desta propriedade pode ser útil para a seleção de leite ou para a adequação da tecnologia empregue, aproveitando da melhor forma a matéria-prima, incrementando o rendimento e a qualidade dos queijos. Se considerarmos a crescente mecanização da indústria de laticínios, o conhecimento do comportamento da matéria-prima pode viabilizar este processo e melhorar os ganhos das fábricas e dos produtores (Harzia et al., 2012).

A capacidade de CL é uma característica quantitativa afetada por muitos genes, alguns com efeitos maiores do que outros, alguns alelos destes genes podem mesmo ter efeitos dramáticos sobre o leite, o que, inevitavelmente, afeta a estrutura do conjunto de dados coletados. Vacas que produzem leite NC podem representar um grupo muito heterogêneo dos genes que afetam a capacidade de coagulação em geral.

Existem estudos que sugerem que os alelos A ou E da κ -CN estão associados com a existência de leite NC (Tyrisevã et al., 2008).

As causas do leite NC não estão completamente compreendidas, talvez porque a estrutura da micela de CN não está totalmente conhecida e devido à complexidade dos processos de CL, com os seus numerosos fatores de controlo. O surgimento de leite NC não pode ser completamente explicado por fatores ambientais, uma vez que também é prevalente em vacas saudáveis no meio da lactação. Tem sido demonstrado que a adição de Ca vai restaurar a coagulação do leite NC, contudo, não para o nível do leite que coagula bem (Hallén, 2008).

A percentagem de amostras de leite NC durante o período de observação de 30 minutos depende, principalmente, da raça da vaca, da quantidade de coalho utilizado e da acidez do leite (pH mais baixo reduz a proporção de amostras de leite NC). Esta é uma característica importante para a indústria de laticínios, mas é muito difícil de caracterizar, em qualquer estimativa, os parâmetros e valores genéticos dos animais (Bittante et al., 2012).

2.1.4. Tempo de Coagulação e Proporção de Amostras de Leite NC

Um dos problemas mais significativos na análise, tratamento estatístico, e interpretação das PCL é a existência de amostras de leite que não coagula 30 minutos após a adição do coalho. Trata-se de um problema na indústria de laticínios e, a entrega de leite NC pode, por vezes, penalizar os produtores. Em muitos países, verificou-se que o melhoramento genético do gado leiteiro tem aumentado o número de vacas produtoras de leite NC (Cipolat-Gotet et al., 2012).

Embora o leite NC tenha uma importância prática considerável, estas amostras são simplesmente ignorados na maioria dos estudos sobre as PCL. Noutras situações, a frequência de amostras de leite NC é na verdade relatada, em conjunto, com o tempo médio de coagulação das amostras coaguladas. Em alguns casos, as condições experimentais são modificados para limitar a incidência de amostras de leite NC, o que pode ser conseguido aumentando a concentração de coalho adicionada ao leite no início do teste (Cipolat-Gotet et al., 2012).

Para explicar as amostras de leite NC, em Cecchinato et al. (2011) comparou-se diferentes modelos estatísticos e concluiu-se que a melhor abordagem é tratar as amostras de leite NC como registros censurados. Assim sendo, a maioria das estimativas de parâmetros genéticos para o tempo de coagulação encontradas na literatura foram obtidas após descarte das amostras de leite NC.

Mais pesquisas são agora necessárias para estimar a herdabilidade deste novo parâmetro e as suas correlações genéticas. Os principais problemas associados com a estimativa de influências genéticas nas PCL surgem a partir do tratamento estatístico dos dados (obtidos dentro de 30 minutos) a partir de amostras de leite NC (Bittante et al., 2013). No estudo de Tyriseva et al. (2004), as vacas da raça HF que produziram leite NC estavam relacionadas umas com as outras, o que pode ser um indicador de que os fatores genéticos podem ser responsáveis por este fenómeno.

Os valores das PCL são fortemente influenciados pelos genótipos de CN e proteínas do soro, além disso, é necessário estender este tipo de estudos a um novo modelo de processos de firmeza da coalhada e sinérese (Bittante et al; 2013).

Como o risco de leite NC é maior para as vacas caracterizadas por um processo de coagulação lento, ambos os parâmetros genéticos e erros de variância estimados para o tempo de CL podem ser tendenciosos. Este risco é particularmente elevado em raças caracterizadas por produzir leite de coagulação lenta, tais como HF e algumas raças escandinavas (Cecchinato et al., 2013).

Apenas alguns estudos examinaram a repetibilidade e reprodutibilidade dos valores obtidos para as PCL utilizando instrumentos mecânicos tradicionais. Embora as PCL sejam frequentemente expressas de várias formas na literatura, a sua repetibilidade parece ser baixa (Cipolat-Gotet et al., 2012).

2.1.5. Medição da Firmeza da Coalhada em Diferentes Momentos Após Adição do Coalho

O tempo de coagulação e a firmeza da coalhada são valiosos para a indústria, pois definem o momento ideal para o corte da coalhada, limitando as perdas com o corte precoce e o excesso de humidade com o corte tardio (Cecchinato et al, 2013).

A firmeza da coalhada é geralmente avaliada 30 minutos após a adição da enzima (coalho). No entanto, e em especial, se as amostras em estudo forem de uma raça cujo leite coagula lentamente, o intervalo entre a gelificação e a medição da firmeza da coalhada é muitas vezes demasiado breve. Em esforços para definir características mais independentes, alguns autores têm estendido o intervalo entre a adição das enzimas e a medição da firmeza da coalhada a 45 ou 60 minutos. Sob tais circunstâncias, os dois traços tornam-se menos interdependentes, mas o problema com as medições atrasadas da firmeza da coalhada é que esta característica não aumenta continuamente, mas, por causa da sinérese, atinge um nível máximo e depois tende a diminuir (Cipolat-Gotet et al., 2012). A firmeza da coalhada pode aumentar inicialmente mas diminuir posteriormente. A queda na curva de firmeza da coalhada, mesmo dentro de 30 minutos, é afetada pelas condições tecnológicas, incluindo a concentração de enzima, pH, temperatura, suplementação de CaCl_2 e por características individuais da amostra, incluindo a composição química, dias de lactação e as características individuais das vacas. Entre os fatores individuais dos animais, as características genéticas são muito importantes (Bittante et al., 2013).

Bittante et al. (2013), num estudo no qual analisou as PCL de 105 amostras de leite individuais de vacas BS, detetou 4 amostras de leite NC. Contudo, todas as 4 amostras coagularam após a extensão do período de observação de 30 para 90 minutos. Nesse mesmo estudo, entre as amostras de leite que coagularam mal, algumas exibiram uma coagulação tardia, mas outras amostras, que coagularam cedo, caracterizaram-se por um breve aumento da firmeza da coalhada, seguido por uma queda antes dos 30 minutos. Os autores citados atribuem este facto à "microsinérese", causada pela consolidação das cadeias de micelas de CN, com formação simultânea de pequenas gotas de soro de leite entre os fios da rede de gel. Outros autores discutem um possível efeito mecânico do instrumento de oscilação utilizado no estudo, na velocidade de

coagulação (efeito positivo) e na firmeza da coalhada (efeito negativo) e sugerem condições técnicas que minimizem tais interferências (Bittante et al., 2013).

As influências reconhecidas dos valores das PCL sobre a escolha dos processos tecnológicos e no rendimento do queijo devem ser melhor quantificadas e compreendidas se o período de observação do processo de CL for prolongado. Deste modo poder-se-á eliminar amostras de leite NC e, através da utilização de um modelo adequado, interpretar as tendências observadas (Bittante et al., 2013).

Tradicionalmente, as PCL são avaliadas ao longo do tempo de teste de 30 minutos utilizando um lactodinamógrafo, que é um dispositivo mecânico personalizado para avaliar várias amostras de leite ao mesmo tempo (geralmente 10). A temperatura do leite é mantida constante durante a análise. O lactodinamógrafo mede as minúsculas forças que agem sobre um pendulo submerso, quando as amostras oscilam de maneira linear. São obtidos gráficos com a relação entre a firmeza e o tempo de coagulação (Cipolat-Gotet et al., 2012).

Observações prolongadas através de lactodinamógrafo, para além dos tradicionais 30 minutos, permitem que os problemas associados com amostras de leite NC possam ser superados. Na verdade, essas amostras são mais propriamente definidas como amostras com coagulação tardia, em vez de amostras de leite NC. Na maioria das situações, um prolongamento de 45 minutos é suficiente para alcançar esses objetivos, contudo, um prolongamento de 60 minutos permite uma estimativa mais precisa dos parâmetros analisados em caso de raças cujo leite coagula mais tarde ou com baixa concentração de coalho. Isto é especialmente verdadeiro no caso do leite de vacas da raça HF e raças escandinavas, cujo leite é caracterizado por uma coagulação tardia e uma taxa de endurecimento lenta da coalhada. Assim, a estimativa das PCL é particularmente importante (Bittante et al., 2013).

Para superar o problema das amostras NC e definir traços mais independentes, alguns pesquisadores têm estendido o intervalo entre a adição de enzimas e a medição da firmeza da coalhada a 45 min ou 60 min, mas não há estimativas de parâmetros genéticos para estes dois tempos disponíveis na literatura (Cecchinato et al., 2013).

Em Cecchinato et al. (2013), o alargamento do tempo de teste de 30 a 45 min permitiu medir o tempo de coagulação de todas as amostras de leite e a firmeza da coalhada para a maioria dos leites coagulantes, evitando registos de leite NC. O uso de todos os dados do tempo de coagulação (incluindo aqueles maiores que 30 min) levou a variações genéticas superiores em comparação com outros dados encontrados na literatura, mas a hereditariedade permaneceu quase inalterada.

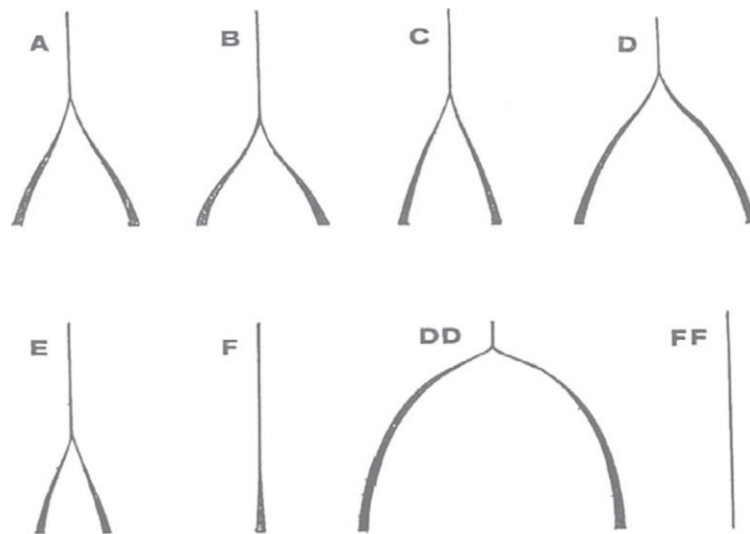
Diferenças no tipo e na atividade do agente coagulante utilizado e na análise estatística foram também encontrados nos estudos, dificultando a comparação entre estes (Cecchinato et al; 2013).

Os métodos utilizados para avaliar as PCL exploram mudanças físico-químicas, que ocorrem no leite durante a coagulação induzida pela adição do coalho. O coalho modifica as micelas de CN, resultando em alterações de viscosidade e elasticidade do leite. Várias técnicas têm sido utilizadas para medir as PCL e uma vasta gama de instrumentos mecânicos, vibracionais, ultrassónicos, térmicos e óticos encontram-se disponíveis. A abordagem mais comum, tanto a nível da investigação como da indústria, é monitorizar a viscosidade do leite, após a adição do coalho (Cipolat-Gotet et al., 2012).

Desde os primeiros estudos das PCL diferentes curvas de lactodinamógrafo têm sido reconhecidas (Figura 18). As combinações das PCL têm sido utilizadas para classificar o leite como ideal, sub-ótimo, defeituoso e leite NC. Em comparação com a curva ideal (tipo A), a curva tipo B apresenta um leite com uma coagulação mais tardia com uma firmeza de coalhada normal, frequente no final da lactação; a curva do tipo C, em contraste, representa um leite que coagula cedo com um lento endurecimento da coalhada, sendo mais frequente no início da lactação; a curva do tipo D representa um leite que coagula cedo com um endurecimento da coalhada rápido e intenso e é típico de leites muito ricos em CN ou ligeiramente ácidos; na curva do tipo E temos um leite com coagulação tardia com um endurecimento muito lento da coalhada, denotando uma reatividade baixa para o coalho, é frequente em vacas com uma CCS elevada e em vacas com algumas variantes genéticas de κ -CN; a curva do tipo F é uma variante mais extrema do tipo E, com apenas um início muito tardio de coagulação, frequente no leite com pH alto proveniente de vacas com mamite clínica; a curva do tipo DD, em contraste, representa um leite que coagula muito cedo com um endurecimento da coalhada rápido

e forte, frequente em leites muito ácidos; e por último, na curva do tipo FF temos um leite NC. É evidente que as PCL são caracterizadas por valores ótimos intermédios e pelo equilíbrio entre eles. Os defeitos da coagulação tardia ou do leite NC e o lento endurecimento coalhada são mais graves e frequentes do que os defeitos opostos (Bittante et al., 2012).

Figura 18: Classificação das curvas mais comuns do Lactodinamógrafo



Fonte: Bittante et al. (2012)

Os novos instrumentos óticos, em vez de imitarem os lactodinamógrafos mecânicos tradicionais, poderiam modelar os sinais obtidos para derivar novos parâmetros correlacionando-os com propriedades tecnológicas do leite úteis, especialmente para a sua modificação durante a primeira fase de coagulação, antes da coagulação visível (Cipolat-Gotet et al., 2012).

2.1.6. Considerações Para Melhorar a Coagulação do Leite

Têm sido propostas várias ações para explorar as possibilidades de melhorar a composição das proteínas do leite de vaca. Este tem sido um tema de interesse para os investigadores da área em todo o mundo, apesar de implementações práticas serem

escassas. A falta de análises de rotina simples para medir, por exemplo, o teor de CN do leite, é um dos fatores limitantes de progresso nessa direção (Hallén, 2008).

Tem sido revelado que variantes genéticas das proteínas do leite estão associadas com a composição da proteína e, assim, com as propriedades tecnológicas de leite. É razoável supor que o conjunto de proteínas do leite nas vacas leiteiras foi ligeiramente alterado devido à seleção eficiente para a produção de leite e que esta pode, em parte, explicar as alterações na composição das proteínas do leite que têm sido observadas ao longo das últimas décadas. As diferenças nas frequências genotípicas de proteína entre as raças de gado leiteiro podem ilustrar este desenvolvimento. As informações sobre o genótipo das proteínas do leite podem ser utilizadas em seleção assistida por marcadores para melhorar a sua composição. Considerando-se tal opção, seria desejável obter mais conhecimento sobre os efeitos das variantes genéticas de proteínas do leite na sua composição e sobre os processos de CL, que originam os produtos lácteos comuns (Hallén, 2008).

O efeito dos genótipos da proteína do leite na composição de proteínas: genótipo agregado β -/ κ -CN foi associado com a concentração de κ -CN no leite. Uma menor concentração de κ -CN foi encontrada no leite de vacas com genótipos incluindo o alelo E κ -CN e também o genótipo A^2A^2/AA . Por outro lado, concentrações mais elevadas de κ -CN foram associadas com genótipos, incluindo o alelo B κ -CN; tanto as variantes β -LG A e B da proteína e também, a variante κ -CN A, foram encontradas em concentrações mais elevadas, quando presente em vacas heterozigóticas em comparação com as vacas homozigóticas; em vacas heterozigóticas β -CN A1 e β -LG variantes de proteína A foram encontrados em concentrações mais elevadas no leite em comparação com a variante da proteína codificada pelo alelo alternativo nestes *loci*, ao passo que as variantes κ -CN A e B da proteína foram encontradas em semelhante concentração em vacas AB heterozigóticas; o genótipo β -LG BB está negativamente associado com a concentração de β -LG e positivamente associado com as CN (Hallén, 2008).

Na CL induzida por quimosina, o alelo B κ -CN tem um efeito positivo sobre a firmeza da coalhada, enquanto o genótipo AE κ -CN mostrou um efeito negativo, especialmente, em comparação com κ -CN AB; o genótipo A^2A^2 de β -CN foi associado

com propriedades coagulantes pobres em comparação com o β -CN A¹A²; a baixa concentração de κ -CN no leite aumenta o risco de leite NC (Hallén, 2008).

Num modelo de produção de queijo uma concentração mais elevada de κ -CN no leite está associada com um menor risco da CN a ser perdida no soro, após o corte e prensagem simulada; a CN no soro após o corte está negativamente associada com a concentração κ -CN no leite; a CN no soro após prensagem simulada está negativamente associada em relação à CN no leite; o rendimento da coalhada fresca está positivamente associado com concentrações de grandes proteínas, CN total, α_{s1} -CN e β -CN no leite; o genótipo β -LG BB está associado com o aumento da retenção de CN na coalhada (Hallén, 2008).

Na CL ácido-induzida os genótipos AA e AB de β -LG foram associados com uma maior firmeza da coalhada em comparação com os genótipos BB, possivelmente devido a um aumento da concentração de β -LG no leite. O leite das vacas com o genótipo BB β -LG produziu uma coalhada mais firme a concentrações iguais de β -LG (Hallén, 2008).

A melhoria da capacidade de CL é um tema muito debatido em genética de bovinos de leite, principalmente porque a quantidade de leite utilizado para a fabricação de queijo se encontra em crescimento no mundo e vários estudos têm confirmado o papel das PCL na produção de queijo (Penasa et al., 2010).

A melhoria das PCL é fortemente aconselhável para melhorar a eficiência do setor lácteo, especialmente, em países nos quais o leite é predominantemente destinado à produção de queijo (Tiezzi et al., 2013).

Tem sido explorada a existência da variação genética aditiva para a capacidade de CL, e as estimativas de herdabilidade variam de 15 a 40%. Recentemente, foi proposto o uso de espectroscopia de infravermelho médio para gravar rotineiramente as PCL, em amostras de leite individuais. Foi também sugerida a viabilidade da aplicação desta técnica em grande escala para o melhoramento genético das PCL. Além disso, os polimorfismos de CN foram amplamente investigados no passado, juntamente com as suas associações a características de produção de leite e propriedades tecnológicas (Penasa et al., 2010).

Os principais parâmetros que descrevem as PCL são o tempo decorrido entre a adição do coalho e o início da agregação das micelas de CN (tempo de coagulação), e a firmeza da coalhada 30 minutos após a adição do coalho. O melhoramento destas características pode ser alcançado por meio de seleção para as características correlacionadas, como o conteúdo e a composição de proteína do leite, a acidez e CCS. Além disso, tem sido demonstrado que as variantes genéticas nos *loci* de proteína exercem um efeito sobre as PCL. A possibilidade de melhorar as PCL através do melhoramento genético tem sido demonstrada em vários estudos, envolvendo diferentes populações de gado leiteiro, em diferentes países. As correlações genéticas entre as PCL, as características de rendimento e composição revelaram que as propriedades tecnológicas do leite podem ser melhoradas sem prejudicar a seleção para características de produção e qualidade (Tiezzi et al., 2013). Tem também sido sugerida a seleção assistida por marcadores, explorando polimorfismos em genes de proteínas do leite (Bonfatti et al., 2011).

Poucos estudos investigaram a variação genética das proteínas do leite, devido às dificuldades analíticas em quantificar simultaneamente as principais proteínas utilizando um grande número de amostras. Os genes das proteínas do leite explicam uma parte considerável da variância genética aditiva de algumas frações proteicas. No entanto, a variação genética adicional existe no resto do genoma e pode ser explorada para alterar a composição de proteína através de criação seletiva. A seleção para aumentar o teor de CN do leite não é útil para o reforço da capacidade de coagulação. O aumento do conteúdo em β -CN e κ -CN e a diminuição do teor de α_{s1} -CN e do pH do leite através do melhoramento genético constituem alternativas mais eficazes. A hereditariedade das PCL é significativa, após ajuste para os halótipos de CN e efeitos do genótipo da β -LG, sugerindo que o fenótipo associado a estas características não pode ser substituído por genotipagem de animais para as variantes de proteínas do leite (Bonfatti et al., 2011).

Tem sido sugerido o melhoramento genético das PCL por seleção direta dos fatores que afetam a composição do leite e assim as suas propriedades tecnológicas, implicando que a CL de cada vaca deva ser medida pelo menos três vezes durante uma lactação, para que possa ser feita uma avaliação adequada (Hallén, 2008). A falta de

métodos rápidos e automáticos de análise que permitam a quantificação de frações de proteínas do leite em larga escala, limita a possibilidade de explorar a variação genética da composição de proteínas do leite para a melhoria das suas propriedades de coagulação por meio de criação seletiva. É necessário investigar as relações genéticas entre a composição de proteína, de coagulação, de produção de queijo, e traços na atual meta de criação de populações de gado leiteiro (Bonfatti et al., 2011).

A seleção do locus da κ -CN poderá ser uma opção viável para melhorar as PCL. Como diferentes partes da fração proteica são importantes na coagulação enzimática e ácida, é possível que a composição proteica ideal varie de acordo com o produto que pretendemos produzir (Hallén, 2008). As enzimas coagulantes constituem uma das matérias-primas da produção de queijo de maior impacto e regulação das PCL. Apesar de todas as enzimas de coagulação utilizadas no fabrico de queijo pertencerem ao mesmo grupo de asparto-proteínases e apresentarem, em termos gerais, propriedades coagulantes semelhantes, estas têm grandes diferenças que modificam substancialmente o seu valor para o fabrico de queijo. Assim, por razões económicas e de processamento, é essencial conhecer toda a atividade de CL de um determinado tipo de coalho, o que permite que o fabricante de queijo selecione a enzima adequada para cada tipo de queijo e ajuste a proporção de enzima para controlar a coagulação e, assim, otimizar a produção e qualidade do queijo (Tabayehnejad et al., 2012).

Para explorar as possibilidades de alterar a composição das proteínas do leite através de reprodução seletiva, o conhecimento de certos parâmetros genéticos, tais como a herdabilidade e covariância genética, é necessário. Embora muitos estudos tenham relatado a variação genética para percentagens e rendimentos de proteína, apenas alguns estimaram a magnitude da variação genética das proteínas do leite. Estes estudos estimaram a hereditariedade das principais proteínas do leite, mas não há estudos que tenham encontrado correlações genéticas entre as principais proteínas do leite. O número limitado de estudos é um reflexo das dificuldades tecnológicas da quantificação simultânea das seis principais proteínas do leite bovino em um grande número de vacas, um pré-requisito para estimar os seus parâmetros genéticos (Schopen et al., 2010).

Em Schopen et al. (2010) a herdabilidade para a composição de proteína foi moderada a alta. A maioria das correlações genéticas entre as principais proteínas do leite foram baixas. A concentração relativa de β -LG foi fortemente relacionada negativamente com a proporção relativa de CN do leite, que é de alta importância para a produção de queijo. Os resultados do estudo sugerem possibilidades interessantes para mudar a composição de proteína do leite de vaca utilizando reprodução seletiva.

A herdabilidade e as correlações genéticas foram estimadas para a concentração relativa das seis principais proteínas do leite e para as principais características de produção de leite. Os resultados mostram que há uma considerável variação genética na concentração relativa das seis principais proteínas do leite. Contudo, no geral, as correlações genéticas entre estas foram baixas. O que indica que os genes que afetam a duas frações de proteínas do leite apenas se sobrepõem parcialmente. Uma tela de todo o genoma foi usada para identificar as regiões cromossômicas associadas com a composição de proteínas do leite. Regiões cromossômicas importantes foram detetadas nos cromossomas 5, 6, 11 e 14. Algumas destas regiões abrigam genes que têm sido relatados na literatura por influenciar a composição das proteínas do leite (Schopen et al., 2010).

O Ca e a composição das proteínas do leite também têm um efeito sobre as propriedades tecnológicas do leite. O Ca é importante para a CL durante a fabricação de queijo. Além disso, vários estudos têm demonstrado que a composição de CN influencia o processo de CL e as propriedades tecnológicas de queijo. Por exemplo, o leite com um teor elevado de β -CN irá resultar numa coagulação mais pobre e, como o conteúdo de água diminui, em queijos duros. Outro exemplo, é o leite com um elevado teor de κ -CN que tem uma melhor coagulação e uma coalhada mais firme, o que aumenta o rendimento do queijo. A proteína κ -CN estabiliza a superfície da micela de CN, enquanto as outras três CN formam o seu núcleo. A quantidade de κ -CN determina o tamanho das micelas e uma quantidade mais elevada de κ -CN resulta em micelas de CN de menores. Micelas de menores dimensões podem aumentar a capacidade de reter componentes do leite, agregam mais rapidamente e têm uma taxa mais elevada de gelificação do que as micelas de CN de grandes dimensões (Schopen et al., 2010).

Para Schopen et al. (2010) há uma considerável variação genética para a composição de proteínas do leite e as correlações genéticas entre as seis principais proteínas do leite são baixas; as regiões genômicas no cromossoma 5, 6, 11 e 14 encontram-se significativamente associadas à composição das proteínas do leite. Efeitos detetados nestas regiões podem ser parcialmente explicados pelos polimorfismos conhecidos dos genes de associados à proteína; além das quatro regiões principais, foi detetado que várias outras regiões cromossômicas afetam significativamente um dos seis principais tipos de proteínas do leite.

As PCL deficientes não são melhoradas por mistura com uma quantidade igual de leite que coagule bem. Os mesmos autores mostraram que as PCL de leite que coagula mal melhoram com a adição de CaCl_2 e por redução do pH do leite. No entanto, as PCL não são melhoradas para o mesmo nível que no leite que coagula bem. As amostras de leite de vacas no início da lactação formam coalhadas mais fracas do que o leite de vacas em lactações tardias, este efeito pode ser devido a diferenças na composição e distribuição de sais do leite (Wedholm et al., 2006).

Descobriu-se que a concentração de κ -CN e sua proporção em relação ao α_{s1} -CN e β -CN são significativamente mais baixas no leite que coagula mal e leite NC. Foi também demonstrado que os queijos produzidos a partir de leite enriquecido com β -CN são mais duros. A concentração mais elevada de κ -CN encontrada no leite de vacas com o genótipo κ -CN AB comparado com o genótipo AA e a associação positiva entre a concentração de κ -CN e leite que coagula bem indicam que o genótipo AB pode influenciar PCL, indiretamente, através da concentração de κ -CN. No entanto, a maior frequência de κ -CN AE no leite que coagula mal e leite NC sugere que as funcionalidades da κ -CN, não apenas a concentração, podem contribuir para as PCL. A alta frequência de κ -CN AE observada em leite que coagula mal também apoia a correlação significativa entre o alelo κ -CN E e a fraca capacidade de CL (Wedholm et al., 2006).

As PCL são muito úteis para a indústria de laticínios e são hereditárias, a realização de melhorias genéticas nas PCL ao nível da população parece difícil, porque os passos de análise necessários são caros e demorados (embora fiáveis). A seleção indireta poderia explorar medições de pH ou acidez titulável e, se for desejável, melhorar a firmeza da coalhada e o teor de CN (Bittante et al., 2012).

A seleção de variantes genéticas que expressam diferentes níveis de proteínas do leite, especialmente κ -CN, será valiosa se for desejável melhorar a capacidade de coagulação dentro de uma população (Bittante et al., 2012). Contudo, mesmo que a seleção de animais de criação baseada no polimorfismo da κ -CN possa ser usada para melhorar as PCL, a seleção direta para as PCL poderia ser mais efetiva do que a seleção indireta baseada no polimorfismo da κ -CN (Tyrisevä et al, 2003).

Se as PCL poderão ser melhoradas pela seleção de animais de criação diretamente para essas propriedades, alguns assuntos práticos ainda necessitam de ser considerados. Por causa dos métodos correntes de medição, as PCL não podem ser medidas facilmente, nem tão frequentemente, como as características usualmente determinadas na análise do leite, isto é a produção de leite e o seu conteúdo de gordura e proteína. Na prática, será necessário reduzir o número de medições por vacas para o mínimo possível. Tal é importante para estimar a repetibilidade das PCL, e assim estabelecer o número mínimo de medições necessárias para estimar a viabilidade a nível genético das PCL de uma vaca (Tyrisevä et al, 2003).

Em Tyrisevä et al. (2003) as correlações fenotípicas mais pronunciadas foram encontradas entre o pH e as características da coagulação do leite. O pH elevado tem claramente uma associação desfavorável com as PCL. Correlações fenotípicas entre a CCS as características da coagulação do leite também foram desfavoráveis, mas foram menores do que as correlações encontradas entre o pH e as características da coagulação do leite. Verificou-se que as correlações fenotípicas desfavoráveis entre o pH, a CCS e o tempo de coagulação são mais fortes do que aquelas entre o pH, a CCS e a firmeza da coalhada.

O tempo de coagulação e a firmeza da coalhada são traços com boa repetibilidade. A repetibilidade estimada para as PCL são da mesma magnitude que para o conteúdo de proteínas, mas para outros traços de produção do leite, as repetibilidades estimadas são mais baixas do que para as PCL. As repetibilidades estimadas das análises com múltiplas variáveis para o tempo de coagulação, pH e CCS foram maiores, e para o conteúdo de gordura menores do que as repetibilidades estimadas obtidas de análises com um variável (Tyrisevä et al, 2003).

As PCL variam com a parição, o estágio de lactação e as estações do ano. O efeito do estágio de lactação é mais pronunciado, ao passo que os efeitos da parição sobre as PCL são contraditórios. Enquanto vários estudos reportaram a deterioração das PCL com o número de partições, outros concluíram que esta não tem efeito sobre as PCL, ou ainda que possui um efeito favorável (Tyrisevä et al, 2003).

A variação das PCL com o número de partições, o estágio de lactação e a estação do ano deveu-se parcialmente à variação na composição e qualidade do leite, especialmente no pH e na CCS. Um elevado valor de pH e CCS do leite estão associados com leite com uma coagulação pobre (Tyrisevä et al, 2003).

Tyrisevä et al. (2003) verificaram correlações fenotípicas pouco favoráveis entre a firmeza da coalhada e o conteúdo do leite em gordura e proteína. Apesar disso, as correlações fenotípicas entre a firmeza da coalhada e o conteúdo em proteína tiveram uma magnitude favorável e moderada em vários estudos.

O maior risco de uma vaca produzir leite NC acontece no pico, ou no meio da lactação. Consequentemente, uma alta produção de leite e um baixo conteúdo de gordura e proteína aumentam o risco de leite NC. O ano e a estação também foram associados a amostras de leite NC. Isto pode indicar o efeito da alimentação da vaca no leite NC, porque durante os dois anos consecutivos, nos quais foi realizado o estudo, diferiram grandemente nas condições climáticas e, portanto, no rendimento e qualidade das colheitas. O risco de leite NC aumenta com o pH. Contudo, o leite NC não está, aparentemente, associado com a saúde do úbere da vaca, uma vez que a CCS não aumentou o risco de leite NC. Em adição, o registo de tratamentos de mastites não forneceram evidências de uma associação entre leite NC as e mastites (Tyrisevä et al, 2003).

O tempo de coagulação e a firmeza da coalhada revelaram boa repetibilidade. As estimativas de repetibilidade em Tyrisevä et al. (2003) indicaram que a capacidade de CL de vacas individuais é bastante estável. Contudo, para estimar de forma confiável a média da capacidade de coagulação de uma vaca em estudos genéticos, o leite de cada vaca deverá ser analisado pelo menos três vezes durante a lactação. Se as amostras forem colhidas no início e no fim da lactação, poderá ser possível observar o potencial

da vaca em relação à capacidade de CL. Porque o risco mais elevado da vaca produzir leite NC é durante o pico e meio da lactação, uma das três amostras colhidas deveria ser feita durante esse período.

No estudo de Ikonen et al. (2004), concluiu-se que com base em correlações genéticas entre as PCL e os traços de produção de leite, a CCS, o conteúdo de CN e o pH do leite, uma forma de melhorar geneticamente as PCL e de reduzir a ocorrência de leite NC, poderia ser a seleção e melhoramento para baixas CCS, o que já pode ser feito, uma vez que os toiros utilizados em inseminação artificial já são avaliados para este carácter.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo levantamento das PCL, em leites individuais de vacas da raça HF submetidas a contraste leiteiro, e verificar a ocorrência e importância relativa na Ilha Terceira do fenómeno do leite que coagula mal, ou não coagula.

Para a realização do trabalho experimental, foi solicitado aos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Ilha Terceira, através de requerimento dirigido à Diretora dos Serviços, o descarte das amostras utilizadas para a realização do contraste leiteiro, colhidas pela Associação Agrícola da Ilha Terceira. As amostras foram, portanto, cedidas com a autorização conjunta da Associação Agrícola e dos Serviços de Desenvolvimento Agrário da Ilha.

Para uma melhor comparação entre os resultados obtidos e os dados observados na literatura foram apenas analisadas amostras de leite de explorações agrícolas com vacas da raça HF, sendo todas as outras explorações excluídas logo à partida da análise.

As amostras fornecidas provieram de 36 explorações agrícolas distintas, cada uma identificada em ordem sequencial (1, 2... 36), com as vacas pertencentes a cada exploração a ser identificadas da mesma forma, colocando-se primeiro o número da exploração agrícola seguido do número sequencial da vaca (1.1, 1.2,... 36.1, 36.2).

1. Recolha e preparação das amostras

Todas as amostras individuais de leite cru foram fornecidas nos frascos de colheita, previamente esterilizados pelo Laboratório Regional de Veterinária, correspondendo cada amostra a uma média de leite individual da manhã e da tarde, colhida de vacas leiteiras pertencentes a produtores de leite da Ilha Terceira. Foram analisadas na totalidade 1342 amostras de leites individuais de animais pertencentes a 36 explorações agrícolas diferentes.

O período de ensaio do trabalho experimental decorreu durante o mês de Junho de 2014. As amostras foram colhidas pela Associação Agrícola da Ilha Terceira e

entregues no Laboratório de Regional de Veterinária, onde foram analisados, após homogeneização a 37°C, o seu conteúdo de proteína, matéria gorda e CCS num aparelho Foss Milkoscan, aparelho especializado para análise de leite, que determina diretamente a maioria destes teores no leite, através da absorção na gama da radiação de infravermelhos. Para reduzir o potencial efeito negativo de elevados valores de CCS sobre as PCL, foram excluídas todas as amostras de leite com valores elevados de CCS (> 689 ufc/ml), com algumas explorações a apresentar um número considerável de amostras a descartar.

Após análise pelo Laboratório Regional de Veterinária, as amostras de leite selecionadas (n= 1342) foram transportadas para o Laboratório de Tecnologia Alimentar da Universidade dos Açores, campus de Angra do Heroísmo. Todas as amostras (sem adição de qualquer conservante) foram analisadas imediatamente após a sua chegada ao laboratório. As informações sobre os animais e as explorações respetivas foram fornecidas pela Associação Agrícola da Ilha Terceira em conjunto com o Laboratório Regional de Veterinária.

Cada amostra foi preparada para avaliação da sua aptidão tecnológica para fabrico de queijo, em termos das suas propriedades individuais de coagulação, de modo a verificarmos a existência ou não de leite que coagula mal ou leite NC, fenómeno particularmente relatado na raça HF, raça existente em grande número no arquipélago dos Açores.

2. Métodos de análise

A aptidão tecnológica do leite para o fabrico de vários produtos lácteos, principalmente queijo, foi avaliada pelo comportamento do leite ao longo da etapa de coagulação. Foi observada, visualmente e por agitação manual, a formação de coalhada e do grau de firmeza da mesma 30 minutos após a adição do coalho.

Colocou-se 10 ml de amostra de leite cru em cada tubo de ensaio, e de seguida foi adicionado 1 ml de coalho, diluído à razão de 4:1 em água destilada, agitando-se o preparado. Após esta ação as amostras foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 35°C. Após 30 minutos as amostras foram retiradas do banho-maria e

analisadas. Os resultados foram registados de acordo com a capacidade de coagulação do leite 30 minutos após a adição do coalho numa amostra de leite, sendo agrupados em três categorias: leite que coagula bem, que coagula mal e leite NC.

Todas as condições experimentais (transporte e temperatura do leite, concentração e tipo de coalho) foram idênticas. O período de observação das amostras não se prolongou para além dos 30 minutos.

3. Análise de Resultados

Os resultados foram avaliados através dos parâmetros habituais da estatística descritiva, utilizando o programa IBM SPSS *Statistics Editor de dados* e o programa *Microsoft Excell* para o registo e avaliação da capacidade de CL individual e correlação com os resultados físico-químicos obtidos no contraste leiteiro para as mesmas amostras.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos deste estudo, foi avaliada, em todas as amostras, a sua respetiva aptidão tecnológica para o fabrico de queijo, simulando o processo de coagulação em laboratório e verificando o comportamento do leite nesta fase decisiva de fabrico.

A partir de todas as amostras utilizadas neste ensaio podemos retirar algumas informações sobre a capacidade de coagulação genérica do leite cru produzido por uma amostra significativa de vacas da raça HF sujeitas a contraste leiteiro na Ilha Terceira utilizado, inclusive, como matéria-prima para o fabrico de queijo.

O quadro 8 resume as médias calculadas para os parâmetros físico-químicos matéria gorda, proteína e ainda CCS analisados no contraste leiteiro. Esses resultados estão de acordo com a bibliografia consultada (Pinto, 2011), sendo valores esperados para o leite de vaca.

Quadro 8: Composição média dos parâmetros físico-químicos das amostras utilizadas no ensaio

	MG (%m/m)	Proteína (%m/m)	CCS (ufc/ml)
Média	3,4942	3,1884	159,89
Desv. Pad.	,71265	,41218	146,148
Variância	,508	,170	21359,092
Mínimo	1,67	2,27	7
Máximo	6,02	5,62	689
N	1342	1342	1342

De todas as 1342 amostras de leite individuais analisadas, 5 (0,4%) não coagularam 30 minutos após a adição do coalho e foram designadas como amostras de leite NC; 8 (0,6%) formaram uma coalhada quebradiça e pouco consistente, sendo denominadas de amostras de leite que coagularam mal e as restantes 1329 (99%), coagularam bem, isto é formaram uma coalhada firme e consistente (Quadro 9).

Quadro 9: Frequência das anomalias da coagulação das amostras de leite analisadas

	Frequência N	Percentagem (%)
Coagula bem	1329	99,0
Coagula mal	8	0,6
Não coagula	5	0,4
Total	1342	100,0

Foi feita a medição do pH às amostras que apresentaram defeitos de coagulação, de modo a aferir se estas se encontravam nas condições ideais de pH para que o processo de coagulação do leite ocorresse. Verificando-se que as amostras em causa não apresentaram desvios em relação ao pH considerado normal (pH entre 6,4 e 6,8).

1. Médias por amostra individual

De acordo com o relatado na literatura, é provável que as variações observadas nos parâmetros: proteína, matéria gorda e CCS tenham influenciado as propriedades tecnológicas do leite.

No entanto, todos os parâmetros analisados, apesar das suas variações para cada amostra (Ver gráficos 3, 4, e 5), apresentaram uma tendência definida para os valores médios apontados na literatura para o leite de vaca (Pinto,2011).

Gráfico 4: Valores de matéria gorda das amostras individuais analisadas

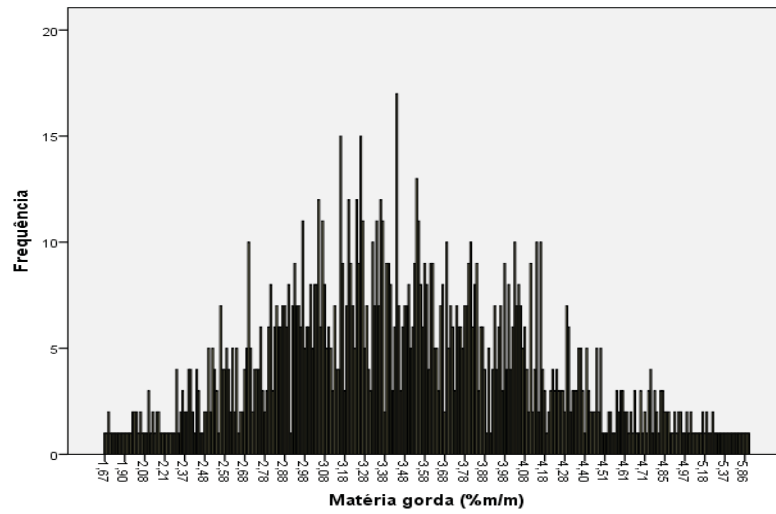


Gráfico 5: Valores de proteína das amostras individuais analisadas

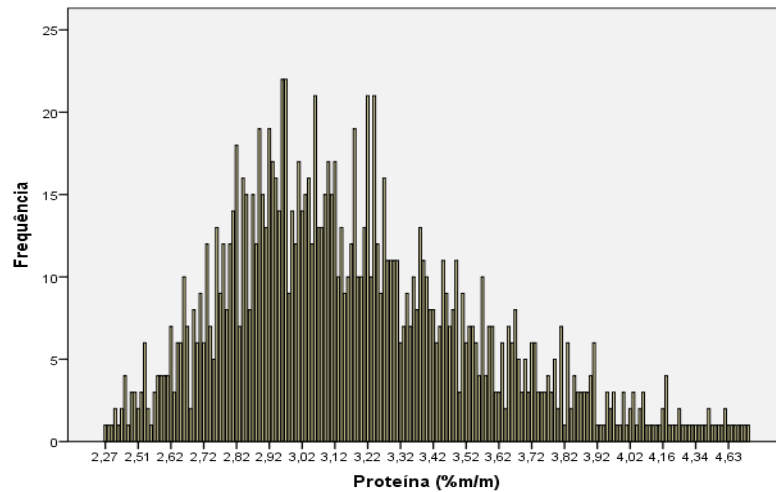
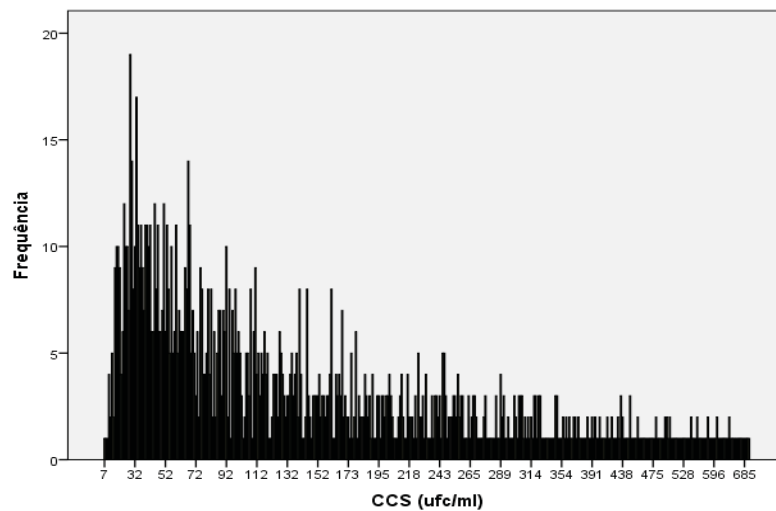


Gráfico 6: Valores de contagem de células somáticas das amostras individuais analisadas



2. Médias por exploração

Após uma abordagem geral da composição do leite das amostras individuais, analisou-se as médias das características físico-químicas do leite por exploração. O número de amostras de leite individuais por cada exploração foi bastante variável, desde apenas uma amostra no caso das explorações 21 e 35; 119 amostras no caso da exploração 1 e 115 amostras para a exploração 24.

Não houve oportunidade de analisar o leite das vacas HF de todas as explorações da Ilha Terceira, tendo sido necessário, para que o estudo incidisse apenas na raça pretendida, que fossem excluídas várias explorações agrícolas, por possuírem animais de outras raças ou cruzadas.

A falta de informações acerca dos sistemas de produção animal de cada exploração, do estado de lactação das vacas, ou até do estado de saúde do animal constitui um fator limitante para o estudo efetuado.

Os resultados médios de cada exploração obtidos para os parâmetros em análise encontram-se indicados no Quadro 10.

Quadro 10: Médias da composição físico-química percentual (matéria gorda e proteína), CCS e resultados do teste de coagulação das amostras de leite individuais por exploração

Identificação da exploração	Nº de animais analisados por exploração	MG (m/m)	Proteína (m/m)	CCS (ufc/ml)	Nº amostras que coagularam mal	Nº amostras que não coagularam	Nº amostras que coagularam bem
1	119	3,02	3,07	122	---	---	119
2	26	3,63	3,21	257	---	---	26
3	37	3,56	3,23	147	---	---	37
4	19	3,30	3,34	129	---	---	19
5	40	3,64	3,53	251	---	---	40
6	25	3,80	3,41	196	---	---	25
7	34	3,86	3,10	190	---	---	34
8	35	3,46	3,26	195	1	---	34
9	40	3,38	3,03	132	---	---	40
10	44	3,52	3,10	79	---	---	44
11	6	3,30	3,02	133	---	---	6
12	17	3,09	3,18	98	---	---	17
13	37	3,69	3,37	134	---	---	37
14	63	3,30	3,00	152	---	---	63
15	18	3,74	3,29	98	---	---	18
16	52	3,78	3,22	199	---	1	51
17	17	3,17	3,21	206	---	1	16
18	13	3,70	3,18	124	---	---	13
19	43	3,34	3,03	159	3	1	39
20	76	3,54	3,05	130	---	---	76
21	1	3,20	3,04	41	---	---	1

Identificação da exploração	Nº de animais analisados por exploração	MG (m/m)	Proteína (m/m)	CCS (ufc/ml)	Nº amostras que coagularam mal	Nº amostras que não coagularam	Nº amostras que coagularam bem
22	3	3,90	3,26	234	---	---	3
23	20	3,63	3,26	177	---	---	20
24	115	3,24	3,17	131	---	1	114
25	9	3,47	3,13	111	---	---	9
26	36	3,80	3,37	185	---	---	36
27	39	3,41	3,04	215	1	---	38
28	49	3,41	3,43	210	1	---	48
29	23	3,46	3,16	230	---	---	23
30	38	3,61	3,07	115	---	---	38
31	20	3,84	3,12	121	1	---	19
32	48	3,49	3,01	179	---	---	48
33	65	3,49	3,10	183	---	1	64
34	15	3,66	3,25	223	1	---	14
35	1	3,4	3,21	135	---	---	1
36	99	3,93	3,51	160	---	---	99

Avaliando a composição do leite, por produtor, consegue-se observar a variação de cada parâmetro analisado. Estas variações vão certamente influenciar as propriedades tecnológicas do leite, com teores proteicos inferiores (a mais baixa = 3,00) a originarem rendimentos queijeiros inferiores e coalhadas de qualidade inferior.

Observando o quadro 9 podemos constatar que todas as explorações apresentam valores muito semelhantes de matéria gorda e proteína bruta, com as explorações 1 e 12 a apresentar os resultados mais pobres, em termos de composição. No entanto, o leite da exploração 1 apresenta os piores resultados de CCS. Os teores médios de proteína e gordura bruta são os mais baixos nesta exploração, promovendo rendimentos potenciais inferiores ao leite das restantes explorações. A média da CCS totais das amostras de leite de todas as explorações apresenta-se dentro dos parâmetros, sendo que o leite da exploração 2 apresenta um valor ligeiramente superior, embora tecnicamente tal possa evidenciar a sua fraca qualidade em termos de aptidão tecnológica para a etapa da CL, este caso não foi constado no presente trabalho, com a exploração 19, com um valor médio de CCS de apenas 159 ufc/ml a apresentar uma maior taxa de leite com anomalias de coagulação, 3 amostras de leite individuais desta exploração coagularam mal, enquanto outra das amostras não coagudou.

Registou-se uma amostra de leite que coagula mal em cada uma das seguintes explorações: 8, 27, 28, 31 e 34. Nas explorações 16, 17, 24 e 33 verificou-se uma amostra

de leite NC em cada exploração. Em todas estas explorações não foi verificada uma razão com o parâmetro CCS, apesar do relatado na literatura.

Relativamente ao rendimento queijeiro potencial, os leites com maior percentagem de matéria útil (proteína e gordura) e que se comportam melhor na coagulação são com certeza os leites que obterão maiores rendimentos queijeiros posteriormente; quanto a estes aspetos, o leite que demonstrou melhor qualidade foi o proveniente das explorações 26 e 36, com médias de matéria útil superior.

Relativamente à aptidão tecnológica, que está mais relacionada com o processo de fabrico e o seu controlo, apesar de não o conseguirmos demonstrar, o fator produtor poderá ser, certamente, aquele com um efeito mais significativo em todos os parâmetros analisados.

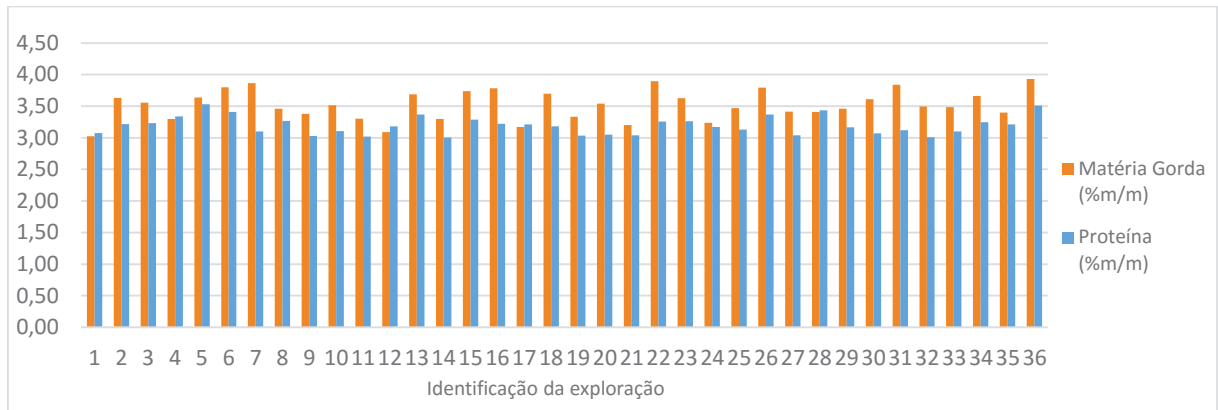
Não foi possível concluir se a variabilidade dos resultados está mais relacionada com os produtores, isto é, com a produção de leite, do que com a época do ano. Apesar de segundo, Barros (2012), a sazonalidade ser cada vez menos marcada face às mudanças dos sistemas de produção de leite, no sistema de produção de leite utilizado na Ilha Terceira, isto é, criação de gado em pastoreio ao ar livre, a sazonalidade poderá ter uma influência mais marcada comparativamente ao gado leiteiro criado e mantido em casas de ordenha.

Vários estudos contraditórios podem ser encontrados na literatura, em relação ao efeito da estação do ano sobre as PCL. Foi relatado que no Verão as amostras apresentaram um tempo de coagulação mais curto do que nas outras estações. No entanto, outros estudos têm vindo a apresentar resultados opostos, mostrando piores PCL em amostras de leite colhidas durante o Verão (Toffanin et al., 2012).

Neste trabalho, na perspetiva da produção animal, isto é, do lado do produtor de leite, faltam alguns fatores importantes que nos poderiam fornecer conclusões mais autênticas e detalhadas. É o caso da influência das condições de produção animal nos diferentes leites obtidos, cuja influência na composição físico-química, poderiam ajudar a perceber melhor o modo como, ao nível das explorações, se poderia atenuar alguma da variabilidade das propriedades da matéria-prima e propriedades tecnológicas para o fabrico de queijo (etapa da coagulação).

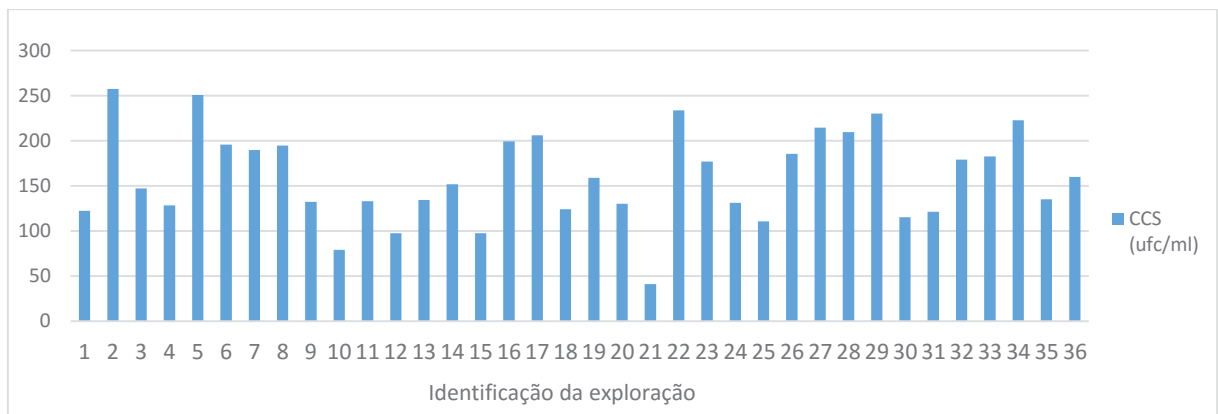
Deste modo, estudos futuros poderiam tentar incluir também a influência destes fatores, de forma a conseguir complementar este trabalho e tentar melhorar o sector queijeiro com o contributo não só da evolução das práticas de fabrico mas também a nível das condições de produção animal.

Gráfico 7: Teores percentuais médios de matéria gorda e proteína por exploração



Observando os valores médios calculados no gráfico 7 podemos afirmar que a exploração 5 foi aquela que obteve melhores resultados em relação ao valor médio de proteína por exploração (3,53% m/m) a par com a exploração 36 (3,51% m/m). Em relação aos valores médios de matéria gorda, as explorações que obtiveram melhores resultados foram a 36 (3,93% m/m) e 22 (3,90% m/m). Deste modo, podemos concluir que a exploração 36 foi aquela que apresentou melhores resultados quer de proteína, quer de matéria gorda.

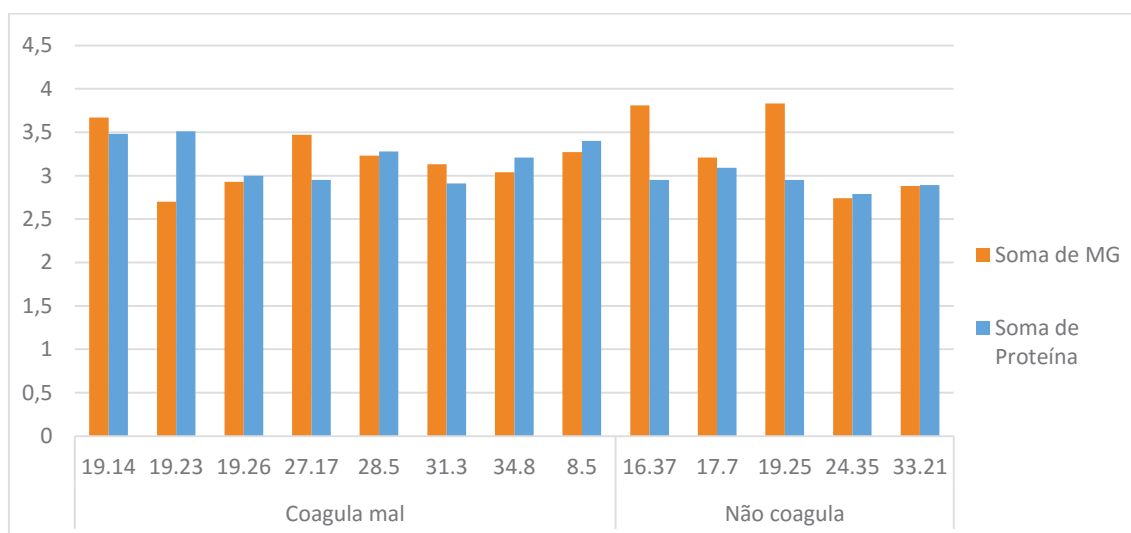
Gráfico 8: Valores médios de CCS em leites individuais por exploração (x1000)



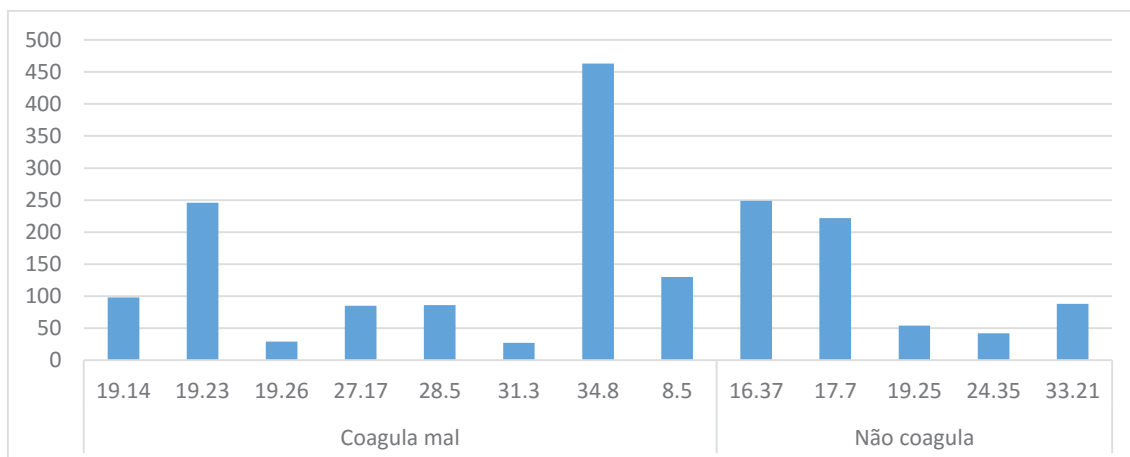
Através da análise do gráfico 8 podemos concluir que as explorações com melhores resultados médios de CCS, isto é, com um menor valor, foram as explorações 21, com 41 ufc/ml e a exploração 10, com 79 ufc/ml. Contrariamente, as explorações com resultados mais elevados foram as explorações 2 (257 ufc/ml) e 5 (251 ufc/ml).

De acordo com o objetivo deste estudo, foi avaliada, em todas as amostras, a sua respetiva aptidão tecnológica, simulando o processo de coagulação de leite em laboratório e verificado o comportamento do leite nesta decisiva fase do fabrico. Os valores obtidos de matéria gorda e proteína para as amostras que coagularam mal ou NC encontram-se descritos no gráfico 9.

Gráfico 9: Valores percentuais médios de proteína e matéria gorda obtidos nas amostras de leite com anomalias no teste de coagulação



No gráfico 8 verificamos que três das amostras de leite individuais que coagularam mal pertenciam à mesma exploração (19), onde se constatou, inclusive, uma amostra de leite NC. Em relação às restantes amostras, não se verificou mais de uma amostra com defeitos de coagulação numa mesma exploração. Os valores médios de proteína total e matéria gorda destas amostras não enfatizaram uma possível relação entre os mesmos e os defeitos de coagulação observados nas amostras.

Gráfico 10: Valores médios da CCS obtidos nas amostras de leite individuais com anomalias no teste de coagulação

Relativamente aos valores de CCS obtidos pelas amostras de leite com anomalias de coagulação (gráfico 10), a única amostra com um valor acima de 400 ufc/ml foi a 34.8, com 463 ufc/ml. Deste modo, não se observou o efeito negativo que elevados valores de CCS podem ter sobre a capacidade de CL, demonstrado na literatura, uma vez que seleccionámos os leites com CCS inferiores a 689 ufc/ml.

Observou-se que os traços de CL foram fortemente determinados pelas individualidades dos animais, e em adição ao efeito do animal, a firmeza da coalhada foi influenciada pelo tempo de ordenha, uma coalhada mais firme e um tempo de coagulação mais curto foram observados durante a ordenha do final de tarde (Harzia, 2013). No presente trabalho experimental todas as amostras foram analisadas em condições idênticas de colheita.

Apesar da influência que a CCS e a composição do leite podem ter no fabrico de queijo, quer a nível do rendimento queijeiro, quer na qualidade do queijo, há outros aspetos relevantes, e que se relacionam com a aptidão do leite para o fabrico do queijo e a sua variação.

Em relação aos aspetos físico-químicos, sabe-se que a composição do leite é, significativamente, influenciada pelo produtor e origem em quase todos os parâmetros. Neste trabalho, e na perspetiva da produção animal, isto é, do lado do produtor de leite, faltam alguns fatores importantes que nos poderiam fornecer conclusões mais

autênticas e detalhadas. É o caso da influência das condições de produção animal nos diferentes leites obtidos, cuja influência na composição físico-química, poderia ajudar a perceber melhor o modo como, ao nível das explorações, se poderia atenuar alguma da variabilidade das propriedades da matéria-prima.

Os estudos da variação na composição das amostras de leite individuais, em relação às suas propriedades de coagulação são numerosos, no entanto, existem poucos estudos sobre a composição do leite NC e sobre o efeito da mistura de leites com propriedades de coagulação divergentes. Frederiksen et al. (2011b) mostrou o efeito das variações na composição da proteína, do nível de fosforilação da α 1- e α 2-CN, do conteúdo iónico, da fração de κ -CN em relação ao teor total de CN, e do tamanho das micelas de CN sobre as PCL de vacas individuais.

De acordo com Frederiksen et al. (2011b), as PCL do leite que coagula mal poderiam ser melhoradas com a adição de CaCl_2 , ainda que não para o nível do leite que coagula bem.

Hallén et al. (2008) observaram que para melhorar as propriedades de coagulação de leites que não coagulam para o nível do leite que coagula bem, deve ser adicionado Ca a um nível de 0,05%. Uma vez que não é recomendada a adição de mais de 0,02% de CaCl_2 no fabrico de queijo comercial, esta torna-se uma razão importante para que seja feito o levantamento das PCL e, assim, evitar a utilização de altas quantidades de leite que coagula mal, e ainda que seja fornecido leite de vacas que produzem leite NC para a indústria de laticínios, principalmente, para a produção de queijo. Estes resultados sustentam fortemente a inclusão das PCL como um parâmetro importante em futuros programas de melhoramento de vacas leiteiras.

Os leites que coagulam mal e leite NC são caracterizados por possuírem um baixo teor total de κ -CN em relação ao teor total de CN e por micelas de CN maiores. Concluiu-se, que um baixo teor de κ -CN é um fator de risco para a não CL, porque esta correlaciona-se negativamente com o tamanho das micelas. A conexão entre o tamanho das micelas de CN e as PCL encontra-se estabelecida na literatura. O leite com micelas de CN de pequenas dimensões agrega-se mais rápido e forma uma coalhada mais firme do que o leite com micelas de grandes dimensões (Frederiksen et al., 2011b).

O limite superior de CCS tolerado neste trabalho é relativamente elevado para uma amostra de leite de vaca. Assim, a possibilidade de que algumas amostras de leite fossem afetadas por uma infecção do úbere causando uma proteólise da CN não podia ser excluída à partida. No entanto, a CCS de uma amostra de leite não reflete necessariamente o nível de proteólise do leite. Na mesma CCS, um úbere com três quartos saudáveis e um infetado poderia levar a um maior grau de proteólise de uma amostra composta, onde a CCS é distribuída uniformemente ao longo dos quatro úberes. A fim de elucidar os fatores por trás da ocorrência de leite NC é importante identificar quando o fenómeno é causado pela infecção do úbere (Hállen, 2008). No entanto, todas as amostras analisadas, com valores de CCS superiores a 500 ufc/ml, coagularam bem, não demonstrando aquilo que é evidenciado na literatura.

De acordo com a literatura consultada, as variações nas PCL de vacas individuais têm mais tendência a ocorrer no caso de leite que coagula mal, sendo as variações menores no caso do leite NC.

O estudo de Toffanin et al. (2012) mostrou a forte influência da cooperativa leiteira e das explorações sobre as PCL em leite a granel. As melhores PCL foram obtidas no verão; no entanto, o efeito da estação deve ser investigado devido a resultados contraditórios, que têm sido encontrados na literatura. A qualidade do leite afeta as suas PCL. Também estes autores detetaram uma piora das PCL, quando os valores de CCS excedem as 500.000 células/ml. A relação entre o teor de CN e as PCL tem sido investigada por vários autores que relataram uma associação positiva entre estas características: um aumento do teor de CN do leite está associado a um aumento da força do coágulo.

Quando analisado leite a granel para as PCL, a taxa de leite NC revela-se menor, uma possível explicação para essa diferença, é o facto da variação no leite a granel poder ser reduzida em consequência da mistura de leite de vacas diferentes (Toffanin et al., 2012).

IV. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o leite das vacas da raça HF submetidas a contraste leiteiro na Ilha Terceira é, no geral, bom para o fabrico de queijo. Não se verificando uma grande incidência de leite que coagula mal e leite NC.

De futuro, torna-se interessante avaliar as PCL acima dos 30 minutos após a adição do coalho, uma vez que a firmeza da coalha pode aumentar inicialmente após esse período mas decrescer num período posterior. Por outro lado, existem amostras de leite que podem exibir uma coagulação mais tardia.

No presente trabalho, todas as amostras de leite individuais foram analisadas do mesmo modo, isto é, através de observação visual e agitação manual e com o mesmo tipo e concentração de coalho. No entanto, as características das PCL analisadas com diferentes metodologias têm valores significativamente diferentes, devido à diversidade de instrumentos e da atividade coagulante. O tipo de coagulante utilizado pode ter um efeito desconhecido.

O método proposto para a padronização da avaliação das anomalias da coagulação em amostras de leites individuais mostraram que as amostras de leite NC de uma metodologia são altamente previsíveis com base na avaliação do tempo de coagulação em simultâneo com outra metodologia. Torna-se então necessária uma definição padrão para a análise dos traços das PCL, de modo a permitir comparações fiáveis entre os resultados das PCL registadas em diferentes laboratórios, e em diferentes populações de animais e raças. A medição das PCL com diferentes metodologias, instrumentos e atividade coagulante, pode originar valores consideravelmente diferentes, assim para que estes valores possam ser usados em conjunto numa avaliação genética, torna-se necessária a sua conversão numa escala comum.

Como as diferenças nas PCL refletem as diferenças fenotípicas entre vacas, ou seja, a soma dos genotípicos, dos fatores ambientais e a variação aleatória, uma melhor compreensão das atuais diferenças intra e inter-raça ao nível da vaca é um passo que pode conduzir a uma melhor caracterização das causas subjacentes ao surgimento de

leite mal coagulado e leite NC, o que pode conduzir a decisões de gestão e sistemas de reprodução ao nível das vacas e explorações para melhorar a qualidade do leite para queijo.

Melhorar a capacidade de coagulação do leite cru e investigar os fatores que afetam a coagulação a nível molecular são campos de grande interesse para melhorar a eficiência da produção de queijo. A capacidade de CL é de grande interesse, e uma vez que, é a propriedade mais importante do leite para queijo, tem um elevado efeito económico e gastronómico no produto final. É uma característica hereditária amplamente estudada, e que pode ser afetada por uma variedade de diferentes fatores ambientais, bem como genes. Infelizmente, os dados sobre as razões para a má coagulação ainda não são confiáveis. Uma nova abordagem seria o estudo dos compostos de baixo peso molecular associados com a capacidade de coagulação, e desse modo a compreender melhor os processos que ocorrem ao nível molecular.

Um fator a ter em consideração em estudos futuros seria demonstrar as possíveis diferenças na distribuição iónica entre os leites com boas e más propriedades de coagulação.

O presente estudo é uma pesquisa preliminar com necessidade de validação em estudos de maior escala, com um período de observação das amostras para além de 30 minutos e que tenham em consideração várias variáveis que possam influenciar as PCL para permitir que sejam obtidas informações mais úteis e superar as limitações da estimativa das PCL tradicionais.

Apesar de vários estudos referirem uma maior frequência de anomalias de coagulação em leites de vacas HF, tal não se verificou nas amostras de leite recolhidas no presente trabalho, que apresentaram uma taxa relativamente baixa de leite que coagula mal ou leite NC.

No futuro seria desejável obter um maior conhecimento sobre os efeitos das variantes genéticas das proteínas do leite, assim como sobre os processos de CL que levam à produção de produtos lácteos.

V. BIBLIOGRAFIA

- Antunes, L. A. F., S. C. Vilela, S. Campos, E. R. P. Dutra and A. V. Munck. 2004. Critérios para escolha de um coagulante. In: Alonso. P. (ed.). Ha-la biotec, ano 14. Valinhos: chr Hansen Ind. e Com. Ltda, nº 82, 4 pp.
- Bandeira, P. R. A. S. 2010. Desenvolvimento de um queijo fresco de cabra com contribuição da fermentação láctica. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 56pp.
- Barros, A. C. B. B. 2012. Avaliação da aptidão tecnológica do leite de ovelha para o fabrico de queijo de Azeitão DOP. Tese de mestrado em Engenharia Zootécnica-Produção Animal. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 71 pp.
- Bittante, G. 2011. Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *J. Dairy Sci.* 94:5821-5832.
- Bittante, G., B. Contiero and A. Cecchinato. 2013. Prolonged observation and modeling of milk coagulation curd firming, and syneresis. *Int. Dairy J.* 29:115-123.
- Bittante, G., M. Penasa and A. Cecchinato. 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 95:6843-6870.
- Bland, J. H., A. S. Grandison and C. C. Fagan. 2015. Evaluation of milk compositional variables on coagulation properties using partial least squares. *J. Dairy Res.* 82:8-14.
- Bonfatti, V., A. Cecchinato, L. Gallo, A. Blasco and P. Carnier. 2011. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental Cattle. *J. Dairy Sci.* 94:5183-5193.
- Botaro, B. G., Y. V. R. Lima, A. A. Aquino, R. H. R. Fernandes, J. F. Garcia and M. V. Santos. 2007. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. *Pesq. Agropec. Bras. Brasília*, v.42, n.5, p.747-753.
- Brasil, R. B. 2013. Estrutura e Estabilidade das Micelas de Caseína do Leite Bovino. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Seminários Aplicados. Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 15pp.
- Brasil, R. B. 2013. Leite instável não ácido e fatores que afetam a estabilidade do leite. Seminário apresentado junto à Disciplina de Seminários Aplicados do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 20pp.
- Castilho, M. H. 2008. Tipos de Coagulação Láctea – Enzimática e Ácida e sua Utilidade na Produção de Queijo. Especialização Lato Sensu Higiene e Inspeção de Produto de Origem Animal. Universidade de Castelo Branco, Goiânia. 42 pp.
- Cecchinato, A. 2013. Survival analysis as a statistical methodology for analyzing factors that affect milk coagulation time in Holstein-Friesian and Brown Swiss cows. *J. Dairy Sci.* 96:5556-5564.
- Cecchinato, A., C. Cipolat-Gotet, J. Casellas, M. Penasa, A. Rossini and G. Bittante. 2013. Genetic analysis of rennet coagulation time, curd-firming rate, and curd firmness assessed over an extended testing period using mechanical and near-infrared instruments. *J. Dairy Sci.* 96:50-62.
- Cecchinato, A., M. Penasa, M. de Marchi, L. Gallo, G. Bittante and P. Carnier. 2011. Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulation and noncoagulation milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 94:4205-4213.

- Chládek, G., V. Cejna, D. Falta and L. Máchal. 2011. Effect of season and herd on rennet coagulation time and other parameters of milk technological quality in Holstein dairy cows. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2011, LIX, No 5, pp. 113-118.
- Cipolat-Gotet, G., A. Cecchinato, M. de Marchi, M. Penasa and G. Bittante. 2012. Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 95:6806-6819.
- DePeters, E. J. and J. D. Ferguson. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75:3192-3209.
- De Marchi, M., R. Dal Zotto, M. Cassandro and G. Bittante. 2007. Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 90:3986-3992.
- Egito, A. S., J. –M. Girardet, L. E. Laguna, C. Poirson, D. Mollé, L. Miclo, G. Humbert and J. –L. Gaillard. 2006. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *Int. Dairy J.* 17:816-825.
- Enzimas: Natureza e ação nos alimentos. 2011. Food Ingredients Brasil, nº16: 26-37.
- Eurostat Statistics Explained. 2015. File: Utilisation of whole milk, EU-28, 2013 (¹) (%) YB15.png. [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Utilisation of whole milk, EU-28, 2013 \(%C2%B9\) \(%25\) YB15.png](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Utilisation_of_whole_milk,_EU-28,_2013_(%C2%B9)_(%25)_YB15.png) (Acedido em 14 de Março de 2015).
- Fine Gardening. 2015. <http://www.finegardening.com/cardoon-cynara-cardunculus> (Acedido em 20 de Abril de 2015).
- Fonseca, C. 2011. Diagnóstico ambiental de uma queijaria e proposta de melhorias. Mestrado em Engenharia Química: Tecnologias de Protecção Ambiental. Departamento de Engenharia Química – Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto.
- Fontaneli, R. S. 2001. Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal no programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. 25 pp.
- Fox, P. F., P. L. H. McSweeney, T. M. Logan and T. P. Guinee. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. 1st ed. Springer Science & Business Media LLC, New York, Philadelphia.
- Fox, P. F. 1993 (ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 1st ed. Chapman & Hall. Springer, US.
- Frederiksen, P. D., M. Hammershøj, M. Bakman, P. N. Andersen, J. B. Andersen, K. B. Qvist, and L. B. Larsen. 2011. Variations in coagulation properties of cheese milk from three Danish dairy breeds as determined by a new free oscillation rheometry-based method. *Dairy Sci. & Technol.* 91:309-321.
- Frederiksen, P. D., K. K. Andersen, H. D. Hammershøj, J. Poulsen, M. Sørensen, K. B. Bakman, K. B. Qvist and L. B. Larsen. 2011. Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:4787-4799.
- Gastaldi, E., O. Pellegrini, A. Lagaude and B. T. La Fuente. 1994. Functions of added calcium in acid milk coagulation. *J. Food Sci.* 59:310-312.
- Glantz, M., H. L. Mansson, H. Stalhammar, L. –O. Barstrom, M. Frojelin and A. Knutsson. 2009. Effects of animal selection on milk composition and processability. *J. Dairy Sci.* 92:4589-4603.
- Glantz, M., T. G. Devold, G. E. Vegarud, L. H. Mansson, H. Stalhammar and M. Paulsson. 2010. Importance of casein micelle size and composition for milk gelation. *J. Dairy Sci.* 93:1444-1451.
- Gomes, S. F. 2012. Qualidade do leite cru de ovinos da área geográfica de produção do Queijo Terrincho DOP (Trás-os-Montes): dos factores de produção animal à qualidade do

- queijo. Relatório Final de Estágio Profissional apresentado à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária, Bragança.
- Hallén, E. 2008. Coagulation Properties of Milk: Association With Milk Protein Composition and Genetic Polymorphism. Ph.D. Thesis. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 64 pp.
- Harzia, H. 2013. Associations Between Metabolic Profile and Coagulation Ability of Bovine Milk, Effect of Feeding and Lactation Stage. A thesis for applying for the degree of Doctor of Philosophy in Animal Sciences. Estonian University of Life Sciences, Tartu.
- Harzia, H., A. Ilves, M. Ots, M. Henno, I. Jõudu, T. Kaart, K. Ling, O. Kärt, K. Kilk and U. Soomets. 2013. Aletrations in milk metabolome and coagulation ability during the lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6440-6448.
- Harzia, H., K. Kilk, I. Jõudu, M. Henno, O. Kärt, and U. Soomets. 2012. Comparison of the metabolic profiles of noncoagulating and coagulating bovine milk. *J. Dairy Sci.* 95:533-540.
- Hoxha, M. and V. Mara. 2012. Impact of physical-chemical properties on milk coagulation ability of some albanian breeds of cow, sheep and goat. *IJSTR*. Vol. I, Issue 3:234-238.
- Hristova, V. K., M. A. Ahmad, J. Tomovska and B. B. Popov. 2014. Study of coagulation properties of Holstein cow's milk depending on the level of milk urea nitrogen in Macedonia dairy farms. *IJERSTE*. Vol. 3 Issue 3:522-529.
- Ikonen, T. 2000. Possibilities of Genetic Improvement of Milk Coagulation Properties of Dairy Cows. Academic dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, Helsinki. pp.34.
- Ikonen, T., S. Morri, A. –M. Tyrisevä, O. Ruottinen and M. Ojala. 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *J. Dairy Sci.* 87(2):458-467.
- Jensen, H. B., N. A. Poulsen, K. K. Andersen, M. Hammershø, H. D. Poulsen and L. B. Larsen. 2012. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *J. Dairy Sci.* 95:6905-6917.
- Jõudu, I., M. Henno, S. Värvi, H. Viinalass, T. Püssa, T. Kaart, D. Arney and O. Kärt. 2009. The effect of milk proteins on milk coagulation properties in estonian dairy breeds. *Veterinarija IR Zootechnika*, T. 46:1392-2130.
- Jovanović, S., O. Mačej and Djurdjević. 2002. The influence of various factors on milk clotting time. *J. Agric. Sci.* 47:57-73.
- Kunimura, A. A., C. F. Santos, D. A. Cyrino, I. A. Lancia, L. N. C. Oliveira, R. C. Ferreira and T. P. Garbulho. 2011. Coagulação de uma proteína do leite. IX Simpósio de Base Experimental das Ciências Naturais da Universidade Federal do ABC, 12 e 13 de Agosto de 2011.
- Law, B. A. and A. Tamime. 2011. Technology of Cheesemaking. 2nd ed. Wiley-Blackwell, UK.
- Lima, Y. V. R. 2005. Variantes genéticas de kappa-caseína em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite. Pós-Graduação em Nutrição Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, Pirassununga. 85 pp.
- Luquet, F. M. 1985. O Leite do Úbere à Fábrica de Lacticínios, Vol. 1. Coleção Euroagro. Publicações Europa-América, Men-Martins, Portugal.

- Machado, S. C. 2010. Fatores que Afetam a Estabilidade do Leite Bovino. Programa de Pós-Graduação em Zootécnia. Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Porto Alegre-RS, Brasil. 201 pp.
- Malacarne, M., P. Franceschi, P. Formaggioni, S. Sandri, P. Mariani and A. Summer. 2014. Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *J. Dairy Res.* 81(02):129-136.
- Malacarne, M., A. Summer, E. Fossa, P. Formaggioni, P. Franceschi, M. Pecorari and P. Mariani. 2006. Composition, coagulation properties and Parmigiano-Reggiano cheese yield of Italian Brown and Italian Friesian herd milks. *J. Dairy Res.* 73: 171-177.
- Malossini, F., S. Bovolenta, C. Piras, M. D. Rosa and W. Ventura. 1996. Effect of diet and breed on milk coagulation properties. *Ann Zootech.* 45:29-40.
- McGann, T. C. A. and G. T. Pyne. 1960. The colloidal phosphate of milk: III. Nature of its association with casein. *J. Dairy Res.* 27:403-417.
- Morreira, C. P. M. 2011. Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos Estudo de caso: Queijos da Beira Interior. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Nassu, R. T., B. A. Macedo and M. H. P. Lima. 2006. Queijo de coalho. 1ª ed. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF.
- NP 1598 (1983). Queijo. Definição, classificação, acondicionamento e marcação. 2ª Edição, Instituto Português da Qualidade, Caparica.
- O’Callaghan, D. J., C. P. O’Donnell and F. A. Payne. 2000. On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks. *J. Food Eng.* 43: 155-165.
- Okigbo, L. M., G. H. Richardson, R. J. Brown and C. A. Ernstrom. 1985. Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* 68:822-828.
- Okigbo, L. M., G. H. Richardson, R. J. Brown and C. A. Ernstrom. 1985. Interactions of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 68:3135-3142.
- Oliveira, D. S. and C. D. Timm. 2007. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.102, n.561-562, p.17-22.
- Paula, F. P., C. E. Cardoso and M. A. C. Rangel. 2010. Análise físico-química do leite cru refrigerado proveniente das propriedades leiteiras da região sul fluminense. *Revista eletrônica TECCEN, Vassouras*, v. 3, n. 4, p. 7-18.
- Penasa, M., M. Cassandro, D. Pretto, M. Marchi, A. Comin, S. Chessa, R. D. Zotto and G. Bittante. 2010. Short communication: influence of composite casein genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 93:3346-3349.
- Perry, K. S. P. 2004. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. *Quim. Nova*, 27(2):293-300.
- Phadungath, C. 2005. Casein micelle structure: a concise review. *J. Sci. Technol.* 27 (1):201-212.
- Pinto, M. F. P. G. 2011. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado produzido por micro empresas em Alagoas, Brasil. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Politis, I., and K. F. Ng-Kwai-Hang. 1988. Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. *J Dairy Sci.* 71:1740-1746.

- Pretto, D., T. Kaart, M. Vallas, I. Jõudu, M. Henno, L. Ancilotto, M. Cassandro and E. Pärna. 2011. Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *J. Dairy Sci.* 94: 4336-4346.
- Ramos, T. M. 2013. Tipos de Pasteurização e Agentes Coagulantes na Fabricação do Queijo Tipo Prato. Tese apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, área de concentração em Ciências dos Alimentos para obtenção do título de Doutor; Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Rodrigues, A. R. F. 2014. Optimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado. Tese de mestrado em Engenharia Agronómica, Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto.
- Santos, M. V. 2003. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. Brito, J. R. F.; Portugal J. A. B. (Org.). Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juís de Fora, 2003, V.1. pp. 139-149.
- Santos, M. V. & L. F. L. Fonseca. Módulo 1 – Composição e propriedades físico-químicas do leite. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo. 16pp.
- Schopen, G., C., B. 2010. Genetic analysis of protein composition on bovine milk. Ph.D. Thesis. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 189pp.
- Sgarbieri, V., 2005. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Braz. J. Food Technol.* V.8, n.1, p.43-56.
- Shah, M. A., S. A. Mir and M. A. Paray. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.* 94:5-16.
- Sigma Aldrich. 2015. General Properties of Casein. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/casein.html> (Acedido em 02 de Abril de 2015).
- Silva, G., A. M. A. D. Silva & M. P. B. Ferreira. 2012. Processamento de leite. Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas (CODAI) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 172pp.
- Sousa, M. J. and F. X. Malcata. 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus L.*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82:15-170.
- SREA. 2015. Fabrico dos principais Produtos Lácteos nos Açores em 2015. <http://estatistica.azores.gov.pt/upl/%7B76d28348-ea61-413e-a714-128f0d7abef9%7D.htm> (Acedido em 23 de Fevereiro de 2016).
- SREA. 2015. Entregas de Leite às Fábricas de Lacticínios nos Açores em 2015. <http://estatistica.azores.gov.pt/upl/%7B91e5dfde-5cd3-4e73-a739-659c51883ee2%7D.htm> (Acedido em 23 de Fevereiro de 2016).
- Sturaro, A., F. Tiezzi, M. Penasa, M. Marchi and M. Cassandro. 2012. Study of milk coagulation properties in multibreed italian dairy herds. Em *Acta agriculturae Slovenica*, suplement 3. Slovenia, Sept. 19-21, 2012. 20th Int. Symp. “Animal Science Days”, Kranjska gora, Ljubljana. pp. 89-92.
- Tabayehnejad, N., M. Castillo and F. A. Payne. 2012. Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the berridge clotting time method and a proposed optical

- method. Department of Biosystems and Agricultural Engineering, University of Kentucky. pp.42
- Tavanti, V. K., L. G. Bassi, G. C. C. Ferreira, R. T. Sato, M. E. T. Cunha, K. Sivieri, C. M. V. B. Rensis and M. R. Costa. 2009. Composição e capacidade de coagulação de leites de vacas holandesas e girolandas. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, Set/Out, nº 370, 64, 5-9.
- Tiezzi, F., D. Pretto, M. Marchi, M. Penasa and M. Cassandro. 2013. Heritability and repeatability of milk coagulation properties predicted by mid-infrared spectroscopy during routine data recording, and their relationships with milk yield and quality traits. *The Animal Consortium*, 7:10, 1592-1599.
- Tiezzi, F., B. D. Valente, M. Cassandro and C. Maltecca. 2015. Causal Relationships between milk quality and coagulation properties in Italian Holstein-Friesian dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 47(1):45.
- Toffanin, V., M. Marchi, M. Penasa, D. Pretto and M. Cassandro. 2012. Characterization of milk coagulation ability in bulk milk samples. Em *Acta agriculturae Slovenica*, suplement 3. Slovenia, Sept. 19-21, 2012. *20th Int. Symp. "Animal Science Days"*. Kranjska gora, Ljubljana. pp. 93-98.
- Tryrisevä, A. M., T. Vahlsten, O. Ruottinen and M. Ojala. 2004. Noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. *J. Dairy Sci.* 87(11):3958-3966.
- Tryrisevä, A. M., K. Elo, A. Kuusipuro, V. Vilva, I. Jänönen, H. Karakainen, T. Ikonen and M. Ojala. 2008. Chromosomal regions underlying noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire cows. *Genetics*. 180(2):1211-1220.
- Tryrisevä, A. M., T. Ikonen and M. Ojala. 2003. Repeatability estimates for milk coagulation traits and non-coagulation of milk in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Res.* 70:91-98.
- Vasconcelos, M. P., K. G. de L. Araújo & M. R. Verruma-Bernardi. 2004. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. *R. Bras. Agrociências*. 10:499-502.
- Veiros, C. B. R. 2005. Contributo para a caracterização do queijo Terrincho: Estudo da proteólise e avaliação da autenticidade por HPLC/UV. Mestrado em Controlo de Qualidade. Universidade do Porto – Faculdade de Farmácia, Porto.
- Velázquez-Varela, J., M. Castro-Giraldez and P. J. Fito. 2013. Modelling of milk coagulation using dielectric spectroscopy. *InsideFood Symposium*. 9-12.
- Venturini, K. S., M. F. Sarcinelli & L. C. Silva. 2007. Características do leite. Boletim Técnico – PIE-UFES: 01007.
- Wedholm, A., L. B. Larsen, H. Lindmark-Mansson, A. Karlsson and Andrén, A. 2006. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3296-3305.

VI. ANEXOS

ANEXO I – Resultados Contraste Lacto-Manteigueiro Ilha Terceira e teste de coagulação

Quadro 11: Resultados exploração 1

Ident.	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)	Ident.	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)
1.1	4,29	3,33	305	+	1.61	4,18	3,52	100	+
1.2	3,41	3,56	250	+	1.62	1,98	2,45	82	+
1.3	2,62	2,99	94	+	1.63	3,01	2,89	31	+
1.4	3,07	2,88	404	+	1.64	1,88	2,74	26	+
1.5	2,46	2,33	509	+	1.65	2,44	2,94	58	+
1.6	2,28	2,66	176	+	1.66	3,72	3,22	36	+
1.7	3,30	3,00	275	+	1.67	4,13	3,53	91	+
1.8	3,44	3,31	159	+	1.68	3,24	3,22	91	+
1.9	2,45	2,77	141	+	1.69	4,02	3,57	606	+
1.10	4,40	3,62	185	+	1.70	3,54	3,52	98	+
1.11	3,27	3,24	455	+	1.71	2,52	3,12	431	+
1.12	4,45	3,73	179	+	1.72	2,66	2,74	21	+
1.13	4,14	3,54	214	+	1.73	2,94	3,08	27	+
1.14	3,21	3,05	169	+	1.74	2,75	3,11	233	+
1.15	3,74	2,94	96	+	1.75	3,81	3,49	81	+
1.16	2,15	2,73	42	+	1.76	2,54	2,53	36	+
1.17	4,03	3,77	145	+	1.77	2,41	2,81	133	+
1.18	3,50	3,49	151	+	1.78	2,67	3,17	94	+
1.19	2,80	2,57	32	+	1.79	3,40	3,46	33	+
1.20	2,64	2,99	123	+	1.80	2,54	2,93	47	+
1.21	3,05	3,02	247	+	1.81	3,33	3,12	62	+
1.22	4,07	3,57	121	+	1.82	2,44	2,73	42	+
1.23	1,67	2,84	33	+	1.83	3,32	3,11	76	+
1.24	3,13	2,54	59	+	1.84	2,40	2,68	30	+
1.25	3,33	2,97	324	+	1.85	2,81	3,01	223	+
1.26	2,60	3,34	307	+	1.86	2,60	3,24	51	+
1.27	4,53	4,60	281	+	1.87	3,16	3,19	38	+
1.28	3,70	3,10	256	+	1.88	2,50	3,00	397	+
1.29	2,30	2,78	67	+	1.89	2,57	3,10	87	+
1.30	2,29	2,69	355	+	1.90	2,43	3,34	52	+
1.31	3,71	3,38	108	+	1.91	2,97	2,77	45	+
1.32	1,95	2,56	323	+	1.92	2,88	2,91	84	+
1.33	2,73	2,96	75	+	1.93	3,44	3,15	83	+
1.34	3,01	2,92	32	+	1.94	3,41	2,78	82	+
1.35	2,84	3,18	202	+	1.95	2,79	2,96	91	+
1.36	3,08	3,01	35	+	1.96	2,86	2,82	41	+
1.37	3,00	3,24	69	+	1.97	3,16	2,91	23	+
1.38	3,26	2,74	21	+	1.98	2,65	2,79	40	+
1.39	4,95	3,59	127	+	1.99	3,07	3,12	31	+
1.40	2,70	2,84	45	+	1.100	2,17	3,00	61	+
1.41	2,45	2,85	37	+	1.101	2,53	3,20	57	+
1.42	3,56	3,32	98	+	1.102	3,59	3,27	87	+
1.43	3,45	3,10	70	+	1.103	1,73	2,89	41	+

Ident.	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)	Ident.	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)
1.44	3,24	3,36	73	+	1.104	2,90	3,17	20	+
1.45	3,05	2,64	117	+	1.105	2,97	3,02	47	+
1.46	2,89	2,94	179	+	1.106	2,58	2,87	28	+
1.47	2,51	2,89	25	+	1.107	3,16	3,14	22	+
1.48	3,06	2,90	535	+	1.108	3,58	3,10	43	+
1.49	2,84	3,00	84	+	1.109	2,30	2,31	37	+
1.50	2,49	2,82	25	+	1.110	2,13	3,01	87	+
1.51	3,26	3,06	94	+	1.111	3,50	2,87	22	+
1.52	1,92	2,64	47	+	1.112	2,95	3,06	88	+
1.53	2,04	2,64	22	+	1.113	3,36	3,03	28	+
1.54	2,85	2,87	199	+	1.114	3,22	3,40	51	+
1.55	3,24	3,12	86	+	1.115	2,94	2,84	32	+
1.56	3,62	3,09	29	+	1.116	1,98	2,71	50	+
1.57	2,70	3,02	48	+	1.117	3,11	3,40	134	+
1.58	2,81	2,57	55	+	1.118	3,71	3,35	250	+
1.59	4,26	3,90	256	+	1.119	3,84	4,18	82	+
1.60	3,38	3,24	49	+					

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 12: Resultados exploração 2

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
2.1	2,48	2,23	130	+
2.2	3,14	3,00	331	+
2.3	3,86	2,97	284	+
2.4	2,53	2,27	346	+
2.5	2,64	2,96	194	+
2.6	3,83	2,93	38	+
2.7	2,84	2,65	686	+
2.8	2,96	2,84	40	+
2.9	4,09	3,09	110	+
2.10	4,11	3,25	303	+
2.11	4,05	3,34	183	+
2.12	3,80	3,65	75	+
2.13	4,14	3,49	268	+
2.14	3,05	3,23	289	+
2.15	3,98	3,07	171	+
2.16	2,99	3,09	524	+
2.17	3,45	3,00	230	+
2.18	4,21	3,86	307	+
2.19	4,14	3,29	191	+
2.20	3,16	3,04	90	+
2.21	3,79	3,45	82	+
2.22	4,78	3,73	366	+
2.23	4,47	3,38	186	+
2.24	3,48	3,79	445	+
2.25	2,88	3,16	519	+
2.26	4,39	3,73	179	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 13: Resultados exploração 3

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
3.1	4,30	2,89	145	+
3.2	4,25	3,56	155	+
3.3	3,34	3,23	43	+
3.4	4,00	3,32	37	+
3.5	3,07	2,87	348	+
3.6	3,57	3,29	108	+
3.7	4,50	3,19	29	+
3.8	2,93	2,99	152	+
3.9	2,50	2,63	64	+
3.10	2,99	3,03	113	+
3.11	2,86	2,65	110	+
3.12	3,07	2,82	18	+
3.13	4,65	3,49	22	+
3.14	3,52	3,35	260	+
3.15	2,92	2,94	80	+
3.16	4,02	3,55	308	+
3.17	3,71	2,89	210	+
3.18	3,96	3,81	152	+
3.19	3,87	3,27	95	+
3.20	3,78	3,52	173	+
3.21	3,6	3,4	135	+
3.22	3,69	3,14	30	+
3.23	3,39	3,16	22	+
3.24	4,22	4,20	568	+
3.25	2,52	3,06	261	+
3.26	2,99	2,96	164	+
3.27	3,58	3,59	256	+
3.28	4,24	3,37	73	+
3.29	3,64	3,61	87	+
3.30	3,43	3,16	77	+
3.31	3,66	3,66	415	+
3.32	3,36	2,97	137	+
3.33	4,03	3,65	99	+
3.34	3,06	3,20	158	+
3.35	4,26	3,18	42	+
3.36	2,33	2,53	59	+
3.37	3,78	3,39	243	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 14: Resultados exploração 4

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
4.1	4,64	3,77	56	+
4.2	3,26	3,58	153	+
4.3	4,46	3,68	68	+
4.4	2,40	3,14	569	+
4.5	2,84	3,06	92	+
4.6	3,10	3,69	21	+
4.7	2,59	3,19	39	+
4.8	4,56	3,75	65	+
4.9	2,44	3,63	246	+
4.10	3,02	2,81	13	+
4.11	2,82	3,28	20	+
4.12	3,99	3,70	147	+
4.13	3,13	3,68	55	+
4.14	2,77	3,51	596	+
4.15	4,41	3,05	25	+
4.16	4,05	3,39	45	+
4.17	3,20	3,38	7	+
4.18	2,90	2,90	206	+
4.19	2,11	3,18	20	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 15: Resultados exploração 5

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
5.1	3,84	3,74	146	+
5.2	3,29	3,14	205	+
5.3	3,20	3,39	145	+
5.4	3,27	3,85	256	+
5.5	3,98	3,46	507	+
5.6	3,44	3,09	136	+
5.7	4,21	3,45	527	+
5.8	3,55	3,69	506	+
5.9	3,58	3,28	140	+
5.10	4,06	3,06	245	+
5.11	3,24	2,89	67	+
5.12	4,38	3,54	224	+
5.13	4,03	3,01	118	+
5.14	3,74	3,59	539	+
5.15	4,47	4,02	185	+
5.16	2,63	2,61	240	+
5.17	3,30	3,47	497	+
5.18	3,95	3,63	120	+
5.19	3,36	2,97	306	+
5.20	2,92	2,99	140	+
5.21	3,56	3,32	264	+
5.22	3,82	3,70	254	+
5.23	2,96	3,19	310	+
5.24	3,20	3,21	184	+
5.25	3,48	3,87	506	+
5.26	3,35	3,34	68	+
5.27	4,11	3,48	267	+

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
5.28	3,36	3,36	412	+
5.29	5,22	4,60	606	+
5.30	4,22	3,66	230	+
5.31	3,32	3,55	220	+
5.32	5,15	4,24	80	+
5.33	2,70	3,45	42	+
5.34	3,48	3,39	469	+
5.35	2,60	2,94	39	+
5.36	3,92	3,78	144	+
5.37	3,14	3,54	104	+
5.38	3,54	3,36	252	+
5.39	3,84	2,96	25	+
5.40	4,03	3,36	311	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 16: Resultados exploração 6

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
6.1	4,11	3,85	373	+
6.2	3,29	2,79	100	+
6.3	3,77	3,18	115	+
6.4	3,01	3,02	70	+
6.5	3,34	3,28	220	+
6.6	3,37	3,09	195	+
6.7	4,36	3,67	65	+
6.8	3,08	2,94	29	+
6.9	4,77	3,88	99	+
6.10	5,14	3,94	255	+
6.11	3,15	2,84	314	+
6.12	4,16	4,14	356	+
6.13	3,44	3,41	459	+
6.14	2,97	3,12	290	+
6.15	2,93	2,85	134	+
6.16	5,82	4,17	140	+
6.17	3,44	2,81	108	+
6.18	3,95	3,11	221	+
6.19	3,07	2,78	267	+
6.20	4,68	3,85	94	+
6.21	3,62	4,08	411	+
6.22	4,06	3,78	158	+
6.23	4,06	3,26	97	+
6.24	4,60	4,51	191	+
6.25	2,83	2,81	136	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 17: Resultados exploração 7

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
7.1	3,09	3,17	541	+
7.2	2,31	3,05	16	+
7.3	3,37	2,81	118	+
7.4	3,98	2,93	105	+
7.5	3,73	2,82	166	+
7.6	3,64	2,87	264	+
7.7	3,98	2,94	33	+
7.8	3,53	3,04	45	+
7.9	2,48	2,46	118	+
7.10	3,26	3,02	267	+
7.11	4,38	3,85	153	+
7.12	2,86	3,02	44	+
7.13	2,33	3,29	289	+
7.14	5,56	3,51	681	+
7.15	3,63	3,07	192	+
7.16	4,25	3,30	53	+
7.17	3,97	2,96	149	+
7.18	3,34	2,87	586	+
7.19	4,93	3,13	186	+
7.20	4,66	3,09	369	+
7.21	4,80	2,97	44	+
7.22	4,16	3,48	68	+
7.23	4,13	3,67	161	+
7.24	3,80	2,93	25	+
7.25	5,86	3,31	78	+
7.26	3,12	2,75	200	+
7.27	4,05	2,55	45	+
7.28	3,46	3,72	317	+
7.29	3,64	3,01	46	+
7.30	3,36	3,03	324	+
7.31	5,01	3,31	348	+
7.32	3,94	2,93	33	+
7.33	4,43	3,68	189	+
7.34	4,29	2,83	203	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 18: Resultados exploração 8

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
8.1	3,19	3,39	182	+
8.2	3,72	4,09	407	+
8.3	3,58	3,29	123	+
8.4	3,48	3,29	89	+
8.5	3,27	3,40	130	+/- (pH 6,5)
8.6	4,62	3,54	51	+
8.7	3,37	3,36	57	+
8.8	3,05	2,84	60	+
8.9	4,16	3,46	235	+
8.10	4,92	3,79	169	+
8.11	2,70	2,82	98	+
8.12	3,21	2,76	258	+
8.13	2,35	2,85	285	+
8.14	3,55	3,31	635	+
8.15	3,11	2,52	32	+
8.16	3,04	3,03	119	+
8.17	3,35	2,97	135	+
8.18	3,88	3,90	353	+
8.19	3,53	3,53	245	+
8.20	3,44	3,46	316	+
8.21	3,43	3,18	295	+
8.22	2,50	2,53	169	+
8.23	4,29	4,23	615	+
8.24	3,85	3,27	259	+
8.25	3,56	3,15	67	+
8.26	4,86	3,60	335	+
8.27	3,25	3,09	195	+
8.28	2,87	2,66	212	+
8.29	3,54	3,38	94	+
8.30	4,00	3,83	156	+
8.31	3,44	3,61	63	+
8.32	2,89	2,71	25	+
8.33	4,60	4,01	226	+
8.34	1,84	2,56	75	+
8.35	2,63	2,85	47	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 19: Resultados exploração 9

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
9.1	3,65	3,07	190	+
9.2	3,00	3,17	367	+
9.3	3,02	2,74	53	+
9.4	3,08	3,02	33	+
9.5	4,57	3,65	203	+
9.6	3,82	3,27	31	+
9.7	3,12	3,22	55	+
9.8	3,00	2,88	62	+
9.9	3,39	3,22	245	+
9.10	4,08	3,27	128	+
9.11	3,86	3,24	138	+
9.12	3,61	3,10	36	+
9.13	3,32	3,01	29	+
9.14	2,80	2,76	26	+
9.15	1,83	2,90	235	+
9.16	3,17	3,31	198	+
9.17	3,30	3,07	58	+
9.18	3,22	2,94	31	+
9.19	3,04	2,80	98	+
9.20	2,98	2,71	19	+
9.21	3,04	2,89	30	+
9.22	2,85	2,90	685	+
9.23	3,03	2,69	26	+
9.24	2,83	2,72	20	+
9.25	4,00	3,05	124	+
9.26	3,07	2,84	577	+
9.27	3,66	2,50	19	+
9.28	3,59	2,62	46	+
9.29	3,41	2,66	18	+
9.30	3,63	3,02	16	+
9.31	3,43	3,26	204	+
9.32	2,99	2,98	32	+
9.33	3,57	2,87	56	+
9.34	3,50	3,50	176	+
9.35	3,52	2,98	478	+
9.36	3,55	2,97	20	+
9.37	3,25	2,99	268	+
9.38	4,16	3,13	56	+
9.39	4,34	3,58	140	+
9.40	3,87	3,64	68	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 20: Resultados exploração 10

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
10.1	3,72	3,60	251	+
10.2	3,68	2,83	51	+
10.3	2,84	3,06	61	+
10.4	3,80	2,66	49	+
10.5	3,43	2,80	59	+
10.6	3,31	2,88	43	+
10.7	3,82	3,09	29	+
10.8	3,48	2,94	50	+
10.9	3,35	2,82	43	+
10.10	2,94	3,33	111	+
10.11	2,53	2,84	458	+
10.12	3,55	3,21	79	+
10.13	3,20	2,73	12	+
10.14	3,13	3,12	19	+
10.15	3,01	2,68	47	+
10.16	3,59	3,24	36	+
10.17	3,07	2,97	92	+
10.18	3,54	2,78	169	+
10.19	3,10	3,08	37	+
10.20	3,26	2,71	96	+
10.21	4,70	3,46	116	+
10.22	4,89	3,64	39	+
10.23	2,62	2,92	30	+
10.24	2,97	2,52	92	+
10.25	3,49	3,00	47	+
10.26	4,16	3,43	77	+
10.27	2,68	3,11	13	+
10.28	3,77	3,07	25	+
10.29	5,38	4,63	129	+
10.30	3,84	3,20	138	+
10.31	3,55	3,27	40	+
10.32	2,88	2,97	23	+
10.33	2,87	3,29	29	+
10.34	3,03	2,63	362	+
10.35	3,52	3,22	29	+
10.36	3,85	3,18	64	+
10.37	2,11	2,60	49	+
10.38	5,19	3,16	22	+
10.39	5,07	3,45	33	+
10.40	3,29	3,58	76	+
10.41	1,81	3,05	40	+
10.42	3,38	3,04	130	+
10.43	4,85	3,34	39	+
10.44	4,48	3,42	53	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 21: Resultados exploração 11

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
11.1	3,49	3,21	79	+
11.2	2,99	2,61	47	+
11.3	2,56	2,99	51	+
11.4	3,18	2,99	401	+
11.5	3,66	3,08	193	+
11.6	3,93	3,23	27	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 22: Resultados exploração 12

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
12.1	3,27	2,83	47	+
12.2	5,24	3,87	471	+
12.3	3,24	3,51	33	+
12.4	4,29	4,00	214	+
12.5	2,59	2,98	106	+
12.6	2,38	3,17	23	+
12.7	1,73	2,90	44	+
12.8	3,39	3,22	45	+
12.9	2,48	2,65	145	+
12.10	3,50	2,92	67	+
12.11	3,49	3,45	224	+
12.12	2,62	2,87	20	+
12.13	3,67	3,27	61	+
12.14	3,01	3,33	13	+
12.15	3,12	3,24	101	+
12.16	2,08	2,89	16	+
12.17	2,45	2,95	29	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 23: Resultados exploração 13

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
13.1	1,90	3,38	98	+
13.2	3,76	3,14	13	+
13.3	2,86	2,66	35	+
13.4	3,57	3,28	176	+
13.5	4,51	3,71	198	+
13.6	4,58	3,36	24	+
13.7	3,95	3,12	112	+
13.8	4,39	3,72	100	+
13.9	4,18	3,57	39	+
13.10	3,53	3,11	38	+
13.11	3,26	2,96	22	+
13.12	3,23	3,01	81	+
13.13	3,40	3,18	26	+
13.14	3,29	3,24	76	+
13.15	5,11	4,35	209	+
13.16	3,71	3,46	22	+
13.17	3,81	3,41	31	+
13.18	4,94	4,17	64	+
13.19	2,92	2,87	81	+
13.20	3,06	3,01	79	+
13.21	4,02	4,78	551	+
13.22	5,22	5,51	308	+
13.23	3,44	3,25	124	+
13.24	3,62	2,61	32	+
13.25	2,85	2,51	59	+
13.26	3,57	2,59	26	+
13.27	3,75	3,81	128	+
13.28	3,16	2,96	100	+
13.29	4,75	3,62	101	+
13.30	4,04	3,22	24	+
13.31	3,37	3,49	69	+
13.32	3,05	3,05	65	+
13.33	2,79	2,99	689	+
13.34	3,49	2,94	66	+
13.35	4,08	3,82	448	+
13.36	3,54	3,10	68	+
13.37	3,78	3,67	592	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 24: Resultados exploração 14

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
14.1	2,56	2,77	513	+
14.2	3,42	3,11	200	+
14.3	3,09	3,89	380	+
14.4	3,95	3,06	528	+
14.5	2,95	3,02	56	+
14.6	3,17	2,70	474	+
14.7	3,02	2,87	34	+
14.8	3,77	2,66	84	+
14.9	2,20	2,89	669	+
14.10	2,88	2,86	91	+
14.11	3,64	3,24	119	+
14.12	4,17	3,54	248	+
14.13	2,50	2,70	29	+
14.14	3,05	2,84	21	+
14.15	2,90	3,10	53	+
14.16	2,58	2,64	30	+
14.17	2,71	2,76	58	+
14.18	2,58	2,62	33	+
14.19	2,78	2,87	67	+
14.20	2,93	2,96	28	+
14.21	3,52	3,45	179	+
14.22	3,47	3,13	92	+
14.23	3,81	3,43	382	+
14.24	2,92	3,19	359	+
14.25	3,20	3,10	439	+
14.26	3,26	2,95	464	+
14.27	3,74	3,45	104	+
14.28	3,40	2,94	217	+
14.29	2,57	2,80	19	+
14.30	3,88	3,48	108	+
14.31	5,01	4,03	688	+
14.32	3,18	2,82	77	+
14.33	5,02	3,36	61	+
14.34	3,95	3,18	34	+
14.35	3,66	3,00	42	+
14.36	2,94	3,09	181	+
14.37	3,56	2,62	45	+
14.38	4,02	2,89	27	+
14.39	3,17	2,76	54	+
14.40	4,07	3,36	59	+
14.41	3,66	3,13	28	+
14.42	4,03	2,91	42	+
14.43	4,38	3,17	73	+
14.44	3,82	3,30	32	+
14.45	2,68	3,07	114	+
14.46	4,36	3,06	229	+
14.47	2,49	2,75	34	+
14.48	3,16	2,78	84	+
14.49	3,86	2,80	40	+
14.50	2,50	2,80	40	+
14.51	3,16	3,30	41	+

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
14.52	2,93	2,70	39	+
14.53	3,72	2,59	47	+
14.54	3,32	2,73	292	+
14.55	3,36	2,91	36	+
14.56	2,59	2,82	27	+
14.57	2,84	2,66	90	+
14.58	2,93	2,76	32	+
14.59	2,87	2,92	38	+
14.60	2,70	2,85	33	+
14.61	2,62	2,81	37	+
14.62	2,96	3,08	551	+
14.63	3,49	3,07	240	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 25: Resultados exploração 15

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
15.1	2,56	2,53	55	+
15.2	3,00	3,14	46	+
15.3	3,27	2,89	21	+
15.4	4,41	4,16	413	+
15.5	3,93	3,65	128	+
15.6	4,03	3,04	273	+
15.7	3,64	2,88	33	+
15.8	4,48	3,26	39	+
15.9	3,08	2,94	113	+
15.10	4,55	3,96	85	+
15.11	3,04	3,01	24	+
15.12	3,53	3,81	48	+
15.13	4,08	3,24	19	+
15.14	4,20	3,28	112	+
15.15	3,78	3,18	53	+
15.16	4,82	3,80	197	+
15.17	3,53	3,19	59	+
15.18	3,37	3,25	41	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 26: Resultados exploração 16

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
16.1	3,61	3,06	195	+
16.2	4,30	3,22	147	+
16.3	3,62	2,95	295	+
16.4	5,48	3,76	110	+
16.5	2,89	2,52	235	+
16.6	3,95	2,92	35	+
16.7	4,69	3,47	173	+
16.8	5,16	3,51	161	+
16.9	3,61	3,77	325	+
16.10	3,84	3,19	180	+
16.11	3,36	3,25	32	+
16.12	2,62	2,85	116	+
16.13	4,11	4,17	215	+
16.14	3,54	3,54	161	+
16.15	4,73	3,91	635	+
16.16	3,75	3,04	154	+
16.17	3,57	3,06	99	+
16.18	3,34	2,90	184	+
16.19	3,51	2,88	82	+
16.20	4,42	3,44	230	+
16.21	3,34	2,91	269	+
16.22	2,70	2,32	326	+
16.23	3,81	3,11	274	+
16.24	3,59	3,47	458	+
16.25	3,65	3,57	155	+
16.26	3,59	3,57	172	+
16.27	3,61	3,11	150	+
16.28	4,30	3,38	186	+
16.29	3,76	2,90	217	+
16.30	3,58	2,70	143	+
16.31	3,83	3,22	306	+
16.32	4,36	4,67	400	+
16.33	4,42	3,66	438	+
16.34	3,90	3,22	111	+
16.35	4,00	3,26	447	+
16.36	4,59	3,91	65	+
16.37	3,81	2,95	249	- (pH 6,48)
16.38	4,23	3,22	187	+
16.39	3,28	2,71	111	+
16.40	3,24	3,05	62	+
16.41	4,09	3,25	141	+
16.42	4,60	3,20	234	+
16.43	4,04	3,25	138	+
16.44	3,69	3,42	125	+
16.45	3,63	3,01	157	+
16.46	2,97	2,62	20	+
16.47	4,12	3,89	404	+
16.48	2,69	2,49	34	+
16.49	2,53	2,67	247	+
16.50	3,25	3,08	92	+
16.51	3,48	3,30	156	+
16.52	3,88	2,93	123	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 27: Resultados exploração 17

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
17.1	4,94	3,73	115	+
17.2	3,76	3,55	107	+
17.3	3,44	3,18	346	+
17.4	1,72	2,60	317	+
17.5	3,82	3,34	210	+
17.6	3,39	3,14	246	+
17.7	3,21	3,09	222	- (pH 6,5)
17.8	2,56	3,27	35	+
17.9	2,68	2,93	76	+
17.10	2,40	2,90	359	+
17.11	3,19	3,48	468	+
17.12	2,52	3,05	288	+
17.13	3,69	3,57	364	+
17.14	2,13	2,96	34	+
17.15	3,47	3,20	74	+
17.16	2,84	3,30	182	+
17.17	4,11	3,30	59	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 28: Resultados exploração 18

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
18.1	3,15	3,22	239	+
18.2	3,34	3,22	111	+
18.3	3,90	3,30	26	+
18.4	4,14	3,89	277	+
18.5	2,95	3,19	137	+
18.6	4,41	3,11	61	+
18.7	4,33	3,11	202	+
18.8	4,15	2,80	37	+
18.9	3,84	3,14	46	+
18.10	3,29	3,11	178	+
18.11	3,44	2,97	60	+
18.12	3,01	2,88	185	+
18.13	4,09	3,42	54	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 29: Resultados exploração 19

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
19.1	2,71	3,11	26	+
19.2	2,74	2,77	34	+
19.3	3,32	2,79	29	+
19.4	2,35	2,74	391	+
19.5	3,03	2,81	167	+
19.6	4,05	3,16	146	+
19.7	3,01	2,73	611	+
19.8	2,42	2,91	30	+
19.9	2,76	2,88	355	+
19.10	2,64	2,83	227	+
19.11	2,74	2,65	324	+
19.12	3,23	3,06	61	+
19.13	3,47	3,10	170	+
19.14	3,67	3,48	98	+/- (pH 6,46)
19.15	3,62	3,05	139	+
19.16	2,71	2,94	161	+
19.17	3,67	2,86	70	+
19.18	2,86	2,92	153	+
19.19	4,29	3,24	38	+
19.20	3,89	3,23	174	+
19.21	2,90	2,90	43	+
19.22	3,47	2,91	354	+
19.23	2,70	3,51	246	+/- (pH 6,57)
19.24	3,02	3,07	92	+
19.25	3,83	2,95	54	- (pH 6,52)
19.26	2,93	3,00	29	+/- (pH 6,40)
19.27	3,53	3,15	198	+
19.28	3,24	2,87	230	+
19.29	3,16	2,92	102	+
19.30	3,20	3,01	56	+
19.31	3,87	3,00	181	+
19.32	3,61	3,12	251	+
19.33	3,18	3,13	435	+
19.34	2,98	2,82	123	+
19.35	3,76	3,06	59	+
19.36	3,55	3,48	154	+
19.37	3,80	2,89	149	+
19.38	3,05	2,79	101	+
19.39	4,04	2,97	28	+
19.40	4,14	3,40	448	+
19.41	4,27	3,47	35	+
19.42	3,54	3,12	10	+
19.43	4,46	3,48	51	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 30: Resultados exploração 20

Identificação	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
20.1	2,83	2,44	43	+
20.2	4,78	3,29	141	+
20.3	3,56	2,67	177	+
20.4	4,01	3,25	199	+
20.5	4,29	3,23	25	+
20.6	6,02	2,83	140	+
20.7	1,89	2,82	164	+
20.8	2,03	2,80	42	+
20.9	4,86	4,26	86	+
20.10	2,88	2,57	37	+
20.11	3,27	2,88	45	+
20.12	3,55	2,61	25	+
20.13	2,12	2,95	65	+
20.14	3,15	2,81	241	+
20.15	3,67	2,90	73	+
20.16	3,58	3,02	33	+
20.17	2,95	3,27	29	+
20.18	3,31	2,97	28	+
20.19	3,80	3,16	20	+
20.20	3,25	2,45	33	+
20.21	4,32	3,63	200	+
20.22	3,02	2,89	176	+
20.23	3,59	3,49	151	+
20.24	2,30	2,57	29	+
20.25	2,92	3,03	119	+
20.26	2,80	2,75	75	+
20.27	3,32	2,75	26	+
20.28	3,21	3,21	117	+
20.29	3,81	3,97	427	+
20.30	4,04	3,13	140	+
20.31	3,24	3,04	99	+
20.32	3,54	3,51	259	+
20.33	2,38	3,01	334	+
20.34	4,22	3,67	56	+
20.35	3,77	3,32	63	+
20.36	5,72	3,68	129	+
20.37	3,21	2,85	103	+
20.38	2,82	2,87	145	+
20.39	5,07	3,27	167	+
20.40	3,28	2,71	27	+
20.41	2,95	2,49	113	+
20.42	2,73	2,69	346	+
20.43	3,20	3,12	181	+
20.44	2,18	3,57	29	+
20.45	3,26	2,91	228	+
20.46	3,07	2,93	170	+
20.47	4,71	3,62	91	+
20.48	3,96	2,91	132	+
20.49	2,98	2,96	516	+
20.50	4,24	3,23	139	+
20.51	3,16	3,18	127	+

Identificação	Gordura	Proteína	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
20.52	3,26	3,03	238	+
20.53	3,44	2,75	42	+
20.54	2,85	2,66	34	+
20.55	3,88	2,86	23	+
20.56	4,93	3,70	138	+
20.57	3,33	3,14	55	+
20.58	2,87	3,25	101	+
20.59	3,24	2,80	57	+
20.60	3,83	2,96	127	+
20.61	3,96	3,15	255	+
20.62	3,54	3,18	191	+
20.63	2,75	3,04	270	+
20.64	3,81	3,42	67	+
20.65	2,96	2,64	33	+
20.66	4,66	3,20	146	+
20.67	3,17	2,76	127	+
20.68	3,96	2,72	36	+
20.69	2,51	2,45	165	+
20.70	4,34	3,67	169	+
20.71	4,25	3,72	306	+
20.72	3,71	2,43	41	+
20.73	3,22	3,21	78	+
20.74	4,77	2,71	67	+
20.75	3,36	3,02	483	+
20.76	5,45	2,95	72	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 31: Resultados exploração 21

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
21.1	3,20	3,04	41	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 32: Resultados exploração 22

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
22.1	4,05	3,43	252	+
22.2	4,14	3,22	287	+
22.3	3,50	3,12	162	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 33: Resultados exploração 23

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
23.1	4,45	3,38	124	+
23.2	2,52	2,67	210	+
23.3	2,94	2,92	33	+
23.4	3,09	3,20	243	+
23.5	2,81	2,78	64	+
23.6	3,11	3,09	80	+
23.7	4,03	3,07	323	+
23.8	4,17	3,57	303	+
23.9	3,92	2,89	258	+
23.10	3,40	3,25	81	+
23.11	4,38	3,52	97	+
23.12	3,32	3,05	286	+
23.13	3,34	2,81	80	+
23.14	4,11	3,59	239	+
23.15	2,76	2,97	24	+
23.16	2,91	3,53	308	+
23.17	4,80	3,90	224	+
23.18	4,07	3,70	316	+
23.19	4,28	3,80	205	+
23.20	4,05	3,50	39	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 34: Resultados exploração 24

Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag.	Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)
24.1	2,81	2,73	68	+	24.61	3,83	3,21	127	+
24.2	3,17	2,96	54	+	24.62	2,23	2,56	53	+
24.3	2,30	2,72	88	+	24.63	3,98	3,01	99	+
24.4	2,56	2,92	45	+	24.64	3,05	2,49	456	+
24.5	3,07	3,38	90	+	24.65	3,43	3,03	132	+
24.6	2,15	2,69	20	+	24.66	2,68	3,24	30	+
24.7	4,07	3,65	277	+	24.67	3,78	3,40	117	+
24.8	4,23	3,40	207	+	24.68	3,93	3,41	42	+
24.9	3,46	3,33	477	+	24.69	3,36	3,41	36	+
24.10	3,72	3,13	106	+	24.70	2,61	2,90	29	+
24.11	3,34	3,29	402	+	24.71	3,57	3,78	56	+
24.12	3,10	3,23	51	+	24.72	3,08	2,99	40	+
24.13	2,80	2,87	39	+	24.73	4,10	3,97	159	+
24.14	4,48	3,53	317	+	24.74	3,27	2,93	40	+
24.15	2,11	2,82	16	+	24.75	3,34	3,03	116	+
24.16	3,29	3,42	219	+	24.76	2,70	2,98	30	+
24.17	4,28	3,75	627	+	24.77	2,69	2,96	171	+
24.18	3,67	3,41	40	+	24.78	3,62	3,46	226	+
24.19	3,05	2,59	53	+	24.79	3,67	3,71	153	+
24.20	3,32	4,02	408	+	24.80	2,40	2,83	28	+
24.21	2,97	2,73	112	+	24.81	3,07	3,14	54	+
24.22	3,80	3,10	297	+	24.82	3,52	3,37	67	+
24.23	5,62	4,50	243	+	24.83	3,24	3,24	222	+
24.24	2,95	3,25	29	+	24.84	2,90	2,76	22	+
24.25	3,29	3,56	115	+	24.85	2,70	3,06	348	+
24.26	2,81	2,69	208	+	24.86	3,03	3,14	79	+
24.27	2,37	2,85	19	+	24.87	4,03	3,45	247	+
24.28	3,65	2,99	203	+	24.88	2,76	2,82	65	+
24.29	2,85	2,86	30	+	24.89	3,08	3,06	44	+

Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag.	Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)
24.30	3,99	3,83	138	+	24.90	3,37	3,55	391	+
24.31	3,27	2,84	264	+	24.91	3,45	3,35	451	+
24.32	4,57	3,45	520	+	24.92	3,21	3,30	194	+
24.33	3,69	3,45	26	+	24.93	3,27	3,21	282	+
24.34	3,36	3,10	40	+	24.94	2,72	3,42	252	+
24.35	2,74	2,79	42	- (pH 6,48)	24.95	3,25	3,12	140	+
24.36	2,22	2,53	72	+	24.96	4,39	3,68	58	+
24.37	3,84	3,36	15	+	24.97	3,52	2,85	52	+
24.38	5,19	3,79	113	+	24.98	3,11	2,95	82	+
24.39	3,25	3,03	24	+	24.99	3,19	3,19	50	+
24.40	4,06	3,61	179	+	24.100	3,56	3,21	27	+
24.41	2,57	2,60	286	+	24.101	1,93	2,88	35	+
24.42	3,69	3,65	57	+	24.102	4,18	3,40	228	+
24.43	3,32	2,93	90	+	24.103	3,76	3,07	117	+
24.44	2,44	2,86	52	+	24.104	3,61	3,08	144	+
24.45	2,96	2,71	21	+	24.105	3,97	3,35	65	+
24.46	2,42	2,98	35	+	24.106	2,21	3,04	88	+
24.47	3,08	2,93	56	+	24.107	3,21	3,37	66	+
24.48	3,49	3,54	290	+	24.108	3,03	3,16	45	+
24.49	3,30	2,95	194	+	24.109	2,47	3,02	20	+
24.50	4,08	3,44	165	+	24.110	1,82	2,92	42	+
24.51	3,06	3,38	172	+	24.111	2,35	3,04	25	+
24.52	2,09	2,79	74	+	24.112	2,81	3,07	31	+
24.53	1,91	3,03	137	+	24.113	2,70	2,80	27	+
24.54	2,93	3,38	145	+	24.114	3,86	3,12	75	+
24.55	2,98	3,18	76	+	24.115	3,25	3,81	106	+
24.56	3,20	2,92	92	+					
24.57	3,15	3,22	176	+					
24.58	3,08	3,41	97	+					
24.59	3,42	2,78	93	+					
24.60	3,81	3,28	115	+					

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 35: Resultados exploração 25

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
25.1	2,89	2,80	19	+
25.2	3,83	3,38	25	+
25.3	4,74	3,33	76	+
25.4	2,56	3,32	63	+
25.5	2,93	3,1	8,67	+
25.6	3,53	2,98	509	+
25.7	3,35	2,93	89	+
25.8	3,37	2,92	21	+
25.9	4,03	3,43	163	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 36: Resultados exploração 26

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
26.1	3,75	2,97	87	+
26.2	1,95	2,99	106	+
26.3	4,16	3,28	87	+
26.4	3,81	3,19	126	+
26.5	3,55	3,11	111	+
26.6	3,04	2,73	150	+
26.7	3,35	3,55	132	+
26.8	3,62	3,38	45	+
26.9	4,13	3,35	141	+
26.10	3,43	3,44	51	+
26.11	4,06	3,63	275	+
26.12	4,14	3,57	268	+
26.13	4,30	3,43	117	+
26.14	4,16	3,46	202	+
26.15	3,99	3,24	80	+
26.16	3,79	3,23	80	+
26.17	3,04	3,29	68	+
26.18	3,44	3,18	39	+
26.19	3,32	2,86	67	+
26.20	3,50	3,49	438	+
26.21	3,70	3,30	122	+
26.22	4,76	4,27	365	+
26.23	5,33	3,24	632	+
26.24	4,53	3,28	383	+
26.25	3,72	3,69	86	+
26.26	3,61	3,22	133	+
26.27	2,80	3,02	93	+
26.28	3,58	3,28	333	+
26.29	3,73	3,30	56	+
26.30	3,44	3,24	442	+
26.31	4,16	3,72	96	+
26.32	4,97	4,36	329	+
26.33	2,87	3,24	46	+
26.34	4,44	3,37	183	+
26.35	4,43	4,23	663	+
26.36	4,,02	3,10	44	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 37: Resultados exploração 27

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
27.1	3,01	3,12	51	+
27.2	3,28	3,07	219	+
27.3	3,28	2,53	330	+
27.4	2,41	2,60	51	+
27.5	2,97	3,22	232	+
27.6	3,26	3,09	160	+
27.7	3,40	3,31	412	+
27.8	3,67	3,44	289	+
27.9	3,61	3,13	367	+
27.10	3,05	3,02	294	+
27.11	3,13	2,74	82	+
27.12	3,40	3,13	97	+
27.13	3,45	2,50	115	+
27.14	3,56	2,85	128	+
27.15	3,03	2,78	21	+
27.16	3,47	2,95	85	+/- (pH 6,54)
27.17	3,70	3,37	454	+
27.18	3,94	3,20	310	+
27.19	3,10	3,24	478	+
27.20	2,71	2,93	160	+
27.21	3,69	3,18	224	+
27.22	3,75	3,26	448	+
27.23	3,93	3,15	130	+
27.24	4,38	2,81	66	+
27.25	3,25	3,03	50	+
27.26	2,58	2,67	54	+
27.27	3,37	2,86	119	+
27.28	3,37	3,39	108	+
27.29	4,48	3,60	428	+
27.30	3,50	2,89	405	+
27.31	2,87	2,69	279	+
27.32	3,37	2,96	125	+
27.33	4,59	3,27	239	+
27.34	4,04	3,04	618	+
27.35	2,61	2,78	37	+
27.36	3,98	2,77	422	+
27.37	4,26	3,95	109	+
27.38	3,46	3,06	36	+
27.39	3,26	3,07	309	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 38: Resultados exploração 28

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
28.1	3,73	3,23	149	+
28.2	3,94	3,63	64	+
28.3	2,01	2,96	71	+
28.4	3,28	3,50	254	+
28.5	3,23	3,28	86	+/- (pH 6,47)
28.6	3,69	3,15	54	+
28.7	2,64	3,06	323	+
28.8	4,42	4,16	435	+
28.9	4,63	3,67	128	+
28.10	4,00	3,63	486	+
28.11	3,44	3,23	66	+
28.12	3,41	3,39	240	+
28.13	2,91	3,34	72	+
28.14	2,73	3,39	246	+
28.15	3,41	3,52	52	+
28.16	2,75	3,39	167	+
28.17	4,05	4,08	529	+
28.18	4,46	3,17	257	+
28.19	3,92	3,83	487	+
28.20	3,58	3,95	217	+
28.21	3,09	3,17	46	+
28.22	2,57	3,05	152	+
28.23	4,80	5,62	565	+
28.24	4,41	3,91	107	+
28.25	2,89	3,31	185	+
28.26	3,74	3,26	257	+
28.27	3,20	3,10	76	+
28.28	2,77	3,01	50	+
28.29	2,41	3,04	145	+
28.30	3,62	4,12	318	+
28.31	2,74	2,92	50	+
28.32	2,75	3,11	189	+
28.33	2,90	3,03	40	+
28.34	3,54	3,08	110	+
28.35	3,79	4,11	649	+
28.36	3,00	3,39	312	+
28.37	3,55	3,18	254	+
28.38	2,55	3,51	30	+
28.39	3,50	3,60	507	+
28.40	3,91	3,83	135	+
28.41	2,60	3,20	113	+
28.42	3,16	2,91	45	+
28.43	3,97	4,04	350	+
28.44	2,79	3,25	178	+
28.45	4,15	3,87	158	+
28.46	2,92	2,81	96	+
28.47	3,70	2,99	31	+
28.48	3,75	3,44	680	+
28.49	3,93	2,84	68	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 39: Resultados exploração 29

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
29.1	3,45	2,91	556	+
29.2	3,68	3,20	161	+
29.3	3,66	3,59	314	+
29.4	3,33	3,24	262	+
29.5	2,76	2,76	291	+
29.6	4,82	4,38	381	+
29.7	3,44	2,88	291	+
29.8	3,62	2,84	108	+
29.9	3,80	3,33	54	+
29.10	2,69	2,64	34	+
29.11	4,13	3,60	304	+
29.12	3,22	2,96	608	+
29.13	2,99	2,76	87	+
29.14	3,16	2,84	159	+
29.15	3,06	2,99	166	+
29.16	2,66	2,80	142	+
29.17	3,87	3,16	70	+
29.18	4,46	3,42	90	+
29.19	4,57	4,00	125	+
29.20	3,03	2,95	508	+
29.21	3,20	2,80	19	+
29.22	2,83	2,81	41	+
29.23	3,19	3,91	525	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 40: Resultados exploração 30

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
30.1	3,10	2,70	108	+
30.2	3,21	2,77	60	+
30.3	3,26	2,67	92	+
30.4	2,98	2,72	165	+
30.5	3,75	2,79	60	+
30.6	3,87	3,37	212	+
30.7	3,34	2,82	38	+
30.8	3,93	3,42	57	+
30.9	4,09	3,54	114	+
30.10	4,64	3,18	71	+
30.11	4,35	2,91	140	+
30.12	4,00	3,21	48	+
30.13	3,31	3,44	126	+
30.14	3,26	2,62	53	+
30.15	3,59	3,31	105	+
30.16	3,98	3,04	27	+
30.17	4,01	2,85	111	+
30.18	4,33	3,40	77	+
30.19	2,85	2,44	39	+
30.20	3,79	3,22	36	+
30.21	3,53	3,11	116	+
30.22	3,26	3,72	266	+

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
30.23	3,16	2,59	58	+
30.24	3,70	3,27	266	+
30.25	3,16	2,73	41	+
30.26	4,33	3,76	197	+
30.27	3,54	2,67	58	+
30.28	3,41	2,83	97	+
30.29	4,30	3,39	70	+
30.30	3,67	2,65	245	+
30.31	3,81	2,97	112	+
30.32	4,54	3,84	241	+
30.33	4,44	3,92	246	+
30.34	1,78	3,21	191	+
30.35	2,77	3,10	33	+
30.36	3,17	2,50	75	+
30.37	3,34	3,06	222	+
30.38	3,69	2,84	108	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 41: Resultados exploração 31

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
31.1	4,85	3,79	86	+
31.2	3,35	2,54	96	+
31.3	3,13	2,91	27	+/- (pH 6,48)
31.4	4,67	3,34	212	+
31.5	3,35	2,85	164	+
31.6	3,66	3,28	69	+
31.7	3,80	2,65	68	+
31.8	4,02	3,15	131	+
31.9	3,49	3,01	71	+
31.10	3,69	3,04	160	+
31.11	2,05	2,51	129	+
31.12	3,93	3,22	41	+
31.13	4,00	3,76	75	+
31.14	5,21	3,88	400	+
31.15	4,00	3,18	80	+
31.16	3,98	3,05	155	+
31.17	3,60	2,93	166	+
31.18	3,47	2,78	59	+
31.19	5,13	3,13	134	+
31.20	3,42	3,41	106	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 42: Resultados exploração 32

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
32.1	3,04	2,94	218	+
32.2	3,51	2,33	360	+
32.3	3,51	2,92	224	+
32.4	2,80	2,87	100	+
32.5	4,24	3,59	245	+
32.6	3,17	2,77	79	+
32.7	3,90	3,06	65	+
32.8	3,22	2,66	73	+
32.9	4,12	3,38	131	+
32.10	2,59	2,72	179	+
32.11	3,16	2,96	429	+
32.12	3,90	3,60	171	+
32.13	3,79	3,01	35	+
32.14	2,90	3,23	593	+
32.15	3,22	2,70	49	+
32.16	3,79	3,03	100	+
32.17	2,56	2,45	19	+
32.18	3,96	3,03	156	+
32.19	2,82	2,76	82	+
32.20	3,23	2,97	169	+
32.21	2,81	2,69	68	+
32.22	2,96	2,82	110	+
32.23	4,06	3,31	169	+
32.24	3,84	3,43	137	+
32.25	3,74	3,09	46	+
32.26	3,85	3,40	148	+
32.27	3,83	3,26	269	+
32.28	3,71	2,98	580	+
32.29	3,99	3,08	69	+
32.30	3,06	2,90	277	+
32.31	2,97	3,01	46	+
32.32	3,05	2,88	50	+
32.33	2,67	2,62	105	+
32.34	3,17	2,84	94	+
32.35	3,55	2,92	166	+
32.36	4,34	3,71	586	+
32.37	3,20	2,97	105	+
32.38	3,22	3,09	63	+
32.39	3,41	2,89	161	+
32.40	4,58	3,14	488	+
32.41	3,54	2,85	75	+
32.42	3,41	2,90	111	+
32.43	2,72	2,71	56	+
32.44	3,51	3,30	187	+
32.45	4,79	3,53	316	+
32.46	4,10	2,96	52	+
32.47	3,79	3,15	422	+
32.48	4,36	2,97	161	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 43: Resultados exploração 33

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
33.1	3,39	2,92	249	+
33.2	3,51	2,85	66	+
33.3	2,94	3,09	80	+
33.4	2,14	3,08	90	+
33.5	3,61	2,94	343	+
33.6	4,04	3,84	579	+
33.7	3,14	2,74	70	+
33.8	3,00	3,12	67	+
33.9	4,75	3,00	307	+
33.10	2,54	2,95	91	+
33.11	4,52	3,66	315	+
33.12	4,30	3,86	125	+
33.13	3,44	3,29	133	+
33.14	3,33	3,27	461	+
33.15	3,25	2,98	47	+
33.16	3,45	3,04	244	+
33.17	4,61	3,74	291	+
33.18	3,14	3,26	92	+
33.19	4,11	3,26	312	+
33.20	3,33	3,16	129	+
33.21	2,88	2,89	88	- (pH 6,48)
33.22	2,87	2,77	386	+
33.23	3,58	3,22	161	+
33.24	4,61	3,44	129	+
33.25	3,40	3,51	595	+
33.26	3,39	2,82	599	+
33.27	4,14	3,70	435	+
33.28	2,73	2,97	62	+
33.29	2,69	2,66	102	+
33.30	5,35	3,88	423	+
33.31	3,17	2,90	62	+
33.32	3,24	2,76	151	+
33.33	3,11	2,81	98	+
33.34	3,07	2,89	150	+
33.35	2,25	2,86	119	+
33.36	4,71	3,37	88	+
33.37	2,86	2,72	66	+
33.38	3,33	2,82	300	+
33.39	2,01	2,67	366	+
33.40	3,82	3,15	204	+
33.41	4,29	3,52	89	+
33.42	3,37	2,76	84	+
33.43	3,24	2,93	59	+
33.44	3,54	2,95	117	+
33.45	3,05	2,84	65	+
33.46	3,27	2,97	51	+
33.47	3,23	2,73	465	+
33.48	5,08	3,81	369	+
33.49	3,96	3,06	204	+
33.50	3,19	2,90	67	+
33.51	3,78	3,06	48	+

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
33.52	3,13	3,00	114	+
33.53	3,63	3,17	304	+
33.54	2,81	2,89	60	+
33.55	3,39	3,12	102	+
33.56	3,36	2,85	76	+
33.57	3,63	3,10	53	+
33.58	3,44	2,95	75	+
33.59	3,53	2,81	53	+
33.60	4,01	3,46	227	+
33.61	2,92	2,93	67	+
33.62	3,90	3,24	98	+
33.63	4,46	3,08	38	+
3364	4,01	3,35	362	+
33.65	2,64	3,04	44	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 44: Resultados exploração 34

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
34.1	2,76	2,77	90	+
34.2	3,09	2,78	565	+
34.3	4,32	3,67	197	+
34.4	3,26	3,27	52	+
34.5	4,04	3,27	217	+
34.6	3,39	2,63	228	+
34.7	2,94	2,96	157	+
34.8	3,04	3,21	463	+/- (pH 6,47)
34.9	2,59	2,73	286	+
34.10	5,44	4,37	289	+
34.11	3,86	3,10	36	+
34.12	4,08	3,95	429	+
34.13	3,60	3,24	196	+
34.14	3,36	2,97	84	+
34.15	5,18	3,81	51	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 45: Resultados exploração 35

Identificação	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coagulação (*)
35.1	3,40	3,21	135	+

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.

Quadro 46: Resultados exploração 36

Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)	Ident.	Gordura (m/m%)	Proteína (m/m%)	CCS (ufc/ml)	Teste coag. (*)
36.1	3,77	3,66	101	+	36.51	4,74	4,31	64	+
36.2	3,55	2,98	61	+	36.52	4,17	3,96	653	+
36.3	3,76	2,92	15	+	36.53	2,97	3,17	124	+
36.4	2,52	3,06	62	+	36.54	3,56	3,55	383	+
36.5	4,2	3,51	63	+	36.55	3,87	2,92	390	+
36.6	4,75	3,97	70	+	36.56	4,17	4,00	313	+
36.7	4,14	3,29	111	+	36.57	4,75	3,81	552	+
36.8	2,17	2,96	21	+	36.58	4,16	3,66	209	+
36.9	4,48	3,47	83	+	36.59	2,89	3,17	203	+
36.10	4,69	3,77	96	+	36.60	3,27	2,96	555	+
36.11	3,16	3,31	35	+	36.61	2,41	2,79	53	+
36.12	4,35	3,58	107	+	36.62	2,97	2,82	616	+
36.13	4,77	4,38	66	+	36.63	2,04	2,94	21	+
36.14	5,89	4,54	135	+	36.64	4,54	4,40	667	+
36.15	4,08	3,73	73	+	36.65	5,16	3,79	676	+
36.16	3,86	3,49	164	+	36.66	5,20	3,59	34	+
36.17	5,85	4,17	189	+	36.67	4,27	4,03	96	+
36.18	3,78	3,48	48	+	36.68	5,34	4,06	110	+
36.19	4,66	3,93	71	+	36.69	4,90	3,91	302	+
36.20	5,37	4,21	218	+	36.70	3,71	3,53	26	+
36.21	4,11	3,67	122	+	36.71	4,19	3,91	475	+
36.22	2,83	3,03	33	+	36.72	4,69	3,69	32	+
36.23	5,32	4,34	136	+	36.73	3,19	3,65	69	+
36.24	3,48	3,08	283	+	36.74	3,98	3,27	67	+
36.25	3,60	3,83	259	+	36.75	4,90	4,06	71	+
36.26	4,06	3,73	272	+	36.76	3,21	2,97	49	+
36.27	3,84	3,90	303	+	36.77	4,82	4,03	78	+
36.28	4,35	4,89	644	+	36.78	4,16	3,14	30	+
36.29	3,03	3,15	216	+	36.79	4,87	3,83	48	+
36.30	3,74	3,74	566	+	36.80	3,40	3,18	68	+
36.31	4,03	3,99	111	+	36.81	4,74	3,72	94	+
36.32	4,23	3,22	29	+	36.82	3,19	2,92	24	+
36.33	3,96	3,98	375	+	36.83	2,76	2,88	30	+
36.34	3,92	4,08	368	+	36.84	3,10	3,36	67	+
36.35	4,87	3,49	34	+	36.85	4,24	3,21	30	+
36.36	4,36	3,53	88	+	36.86	2,90	2,99	118	+
36.37	3,74	3,49	47	+	36.87	2,93	2,93	27	+
36.38	3,39	3,33	88	+	36.88	4,41	3,17	31	+
36.39	3,69	3,75	160	+	36.89	4,07	3,08	105	+
36.40	2,71	2,73	25	+	36.90	4,27	3,47	33	+
36.41	4,88	4,13	515	+	36.91	4,14	3,86	134	+
36.42	3,83	3,08	94	+	36.92	3,80	3,35	29	+
36.43	4,22	3,47	16	+	36.93	4,05	3,31	66	+
36.44	2,78	3,12	36	+	36.94	3,45	3,34	78	+
36.45	2,97	3,16	92	+	36.95	4,21	3,57	127	+
36.46	3,59	2,78	41	+	36.96	4,62	3,45	37	+
36.47	4,59	3,60	258	+	36.97	3,94	3,37	63	+
36.48	2,88	2,76	212	+	36.98	2,69	3,56	59	+
36.49	4,11	3,49	265	+	36.99	2,83	2,62	34	+
36.50	3,13	3,41	145	+					

(*) + coagulou bem; +/- coagulou mal; - não coagulou.