

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Departamento de Tecnologia de Alimentos

Efeito da contagem de células somáticas do leite
na fabricação do queijo Prato

Guillaume Mazal
Biólogo

Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Prof. Dr Marcos Veiga dos Santos
Co-orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.

Campinas
Agosto– 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M456 Mazal, Guillaume
Efeito da contagem de células somáticas do leite na
fabricação do queijo prato / Guillaume Mazal. – Campinas, SP:
[s.n.], 2005.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Co-orientador: Marcos Veiga dos Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Contagem de células somáticas. 2. Queijo Prato. 3.
Proteólise. 4. Mastite. 5. Maturação. I. Gigante, Mirna
Lúcia. II. Santos, Marcos Veiga dos. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Effect of the somatic cell count on the manufacture of the
Prato cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords): Somatic cell count, Prato cheese,
Proteolysis, Mastitis, Ripening

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante
Marcos Veiga dos Santos
Eliana Paula Ribeiro
Ana Lúcia Barretto Penna
Salvador Massaguer Roig

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos
Co-orientador

Prof^a. Dr^a. Eliana Paula Ribeiro
Membro da Banca

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
Membro da Banca

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Membro da Banca

A mes proches,

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante pela disponibilidade, orientação deste trabalho, atenção dedicada a minha formação e paciência para me ensinar o português.

Ao Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos pela co-orientação e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca Prof^a. Dr^a. Eliana Paula Ribeiro, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig pelas correções e sugestões na finalização deste trabalho.

Aos funcionários Bete, Ana Lourdes, Ana Maria, Renata, Eliana, José, Nelson, Adaulto e Carlos pela ajuda e apoio técnico.

Às amigas Viviane e Raquel pela amizade e participação neste trabalho.

Aos estagiários Cassandra e Gustavo pela grande contribuição na execução deste trabalho e pelos bons momentos passados no laboratório.

Aos alunos de iniciação científica e Raquel, Janine e Renata pela amizade e ajuda importante na realização deste trabalho.

Aos colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos Deyse, Suzy, Cibele, Luciana, Priscilla, Renata, Florence, Elias, Marc, Eduardo, Francisco, Julio e Cláudio pela amizade, ajuda e por compartilhar a vida acadêmica.

A FAPESP pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
RESUMO	xix
SUMMARY	xxi
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	4
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 A mastite	5
3.2. As células somáticas	7
3.3. Efeito da mastite sobre produção e composição do leite	8
3.3.1 Efeito sobre o teor de sólidos totais	9
3.3.2 Efeito sobre o teor de proteína	10
3.3.3 Efeito sobre o teor de gordura	13
3.3.4 Efeito sobre o teor da lactose	14
3.3.5 Efeito sobre o teor de minerais	14
3.4. Efeito da mastite sobre a atividade enzimática	15
3.4.1 Atividade proteolítica	16
3.4.2 Atividade lipolítica	19

3.5. Efeito da mastite sobre os derivados lácteos	20
3.5.1 Efeito sobre o queijo	20
3.5.2 Efeito sobre os outros produtos lácteos	24
3.6. O queijo Prato	26
3.7. Maturação e proteólise do queijo Prato	27
4. MATERIAL e MÉTODOS	30
4.1 Procedimento geral	30
4.2. Seleção das vacas e coleta do leite	31
4.3. Determinação de quantidade de coalho e do tempo de coagulação ajustado	32
4.4. Processo de fabricação do queijo Prato	35
4.5. Análises realizadas	36
4.5.1 Análises das amostras individuais do leite para separação dos animais	36
4.5.2 Controle do pH durante o processo	36
4.5.3 Análise do leite com CCS alta e baixa	36
4.5.4 Análise do soro obtido	37
4.5.5 Análise do queijo	37
4.5.6 Determinação analítica	38
4.5.7 Avaliação do perfil eletroforético dos queijos	39
4.5.8 Avaliação do perfil de textura dos queijos	40
4.5.9 Determinação da recuperação dos constituintes do leite e do rendimento dos processos	40
4.6 Delineamento experimental	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Contagem de células somáticas	44
5.2 Efeito da CCS sobre a composição do leite	46
5.3 Efeito do tratamento sobre o comportamento do pH e a composição do queijo e do soro	49

5.4 Efeito do tratamento sobre a recuperação dos constituintes do leite para o queijo e para o soro	54
5.5 Efeito do tratamento sobre a maturação do queijo Prato	59
5.6 Análise do perfil eletroforético das amostras dos leites usados e dos soros e queijos obtidos	66
6. Conclusão	71
7. Referências Bibliográficas	73
ANEXO 1	84
ANEXO 2	87
ANEXO 3	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 4: Fluxograma geral do trabalho desenvolvido _____ 30

Figura 5.1: pH do leite e comportamento do pH do queijo Prato durante a fabricação (n=3) _____ 49

Figura 5.2: Recuperação de proteína para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3) _____ 54

Figura 5.3: Recuperação de gordura para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3) _____ 56

Figura 5.4: Recuperação de lactose para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3) _____ 57

Figura 5.5: Efeito dos tratamentos sobre o pH (a), a umidade (b) e os Índices de extensão (c) e profundidade (d) de maturação do queijo Prato (n=3) _____ 60

Figura 5.6: Efeito do tempo de maturação sobre o pH do queijo Prato (n=3) _____ 61

Figura 5.7: Efeito do tempo de maturação sobre os índices de extensão e de profundidade de maturação do queijo Prato (n=3) _____ 61

Figura 5.8: Efeito dos tratamentos sobre a firmeza (a), elasticidade (b) e coesividade (c) do queijo Prato (n=3) _____ 63

Figura 5.9: Efeito do tempo de maturação sobre a firmeza do queijo Prato (n=3) _____ 65

Figura 5.10: Perfil eletroforético de amostras de leites e soros em gel SDS-PAGE. Pistas: (1) leite CCS-B, (2) leite CCS-A, (3) soro CCS-B, (4) soro CCS-A, (5) soro CCS-A,aj, (6) Padrão_____66

Figura 5.11: Perfil eletroforético de amostras de queijo em gel Urea-PAGE. Pistas: (1), (4) e (7) queijo CCS-B; (2), (5), (8) queijo CCS-A; (3), (6) e (9) queijo CCS-A,aj_68

Figura 6.1: Comportamento médio do pH ao longo da maturação para os diferentes tratamentos (n=3)_____88

Figura 6.2: Comportamento médio da umidade ao longo da maturação para os diferentes tratamentos (n=3)_____88

Figura 6.3: Comportamento médio do índice de extensão de maturação ao longo do tempo para os diferentes tratamentos (n=3)_____89

Figura 6.4: Comportamento médio do índice de profundidade de maturação ao longo do tempo para os diferentes tratamentos (n=3)_____89

Figura 6.5: Comportamento médio da firmeza do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3)_____91

Figura 6.6: Comportamento médio da elasticidade do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3)_____91

Figura 6.7: Comportamento médio da coesividade do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3)_____92

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Contagem de células somáticas do leite_____	44
Tabela 5.2 Composição química média (n=3) e desvio padrão dos leites_____	46
Tabela 5.3 Composição química média (n=3) e desvio padrão dos queijos Prato____	51
Tabela 5.4 Composição química média (n=3) e desvio padrão dos soros_____	52
Tabela 5.5 Rendimento queijeiro (n=3) e desvio padrão dos processos_____	58
Tabela 5.6 Resumo de análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamentoXtempo sobre pH, umidade, índice de extensão e de profundidade de maturação dos queijos_____	59
Tabela 5.7 Resumo de análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamentoXtempo sobre o perfil de textura do queijo Prato durante a maturação_____	62
Tabela 5.8 Densidade ótica das proteínas das amostras dos leites e dos soros____	67
Tabela 5.9 Densidade ótica das α_{s1} e β -caseínas das amostras de queijos_____	69
Tabela 1 Avaliação individual da composição e da CCS do leite_____	85
Tabela 2 Seleção da vacas – CCS baixa_____	86
Tabela 3 Seleção da vacas – CCS alta_____	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ANOVA	: análise de variância
CCS	: contagem de célula somáticas
CCS-A	: contagem de células somáticas alta
CCS-A,aj	: contagem de células somáticas alta com tempo de coagulação ajustado
CCS-B	: contagem de células somáticas baixa
cél/mL	: célula por mililitro
Cl ⁻	: íon cloreto
DNA	: ácido desoxirribonucléico
DO	: densidade óptica
Dr	: doutor
Dra	: doutora
ESALQ-USP	: Escola Superior de Agrícola “Luiz Queiroz” – Universidade de São Paulo
FEA-UNICAMP	: Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas
FIL-IDF	: Fédération Internationale de Laiterie - International Dairy Federation
g	: grama
GL	: grau de liberdade
IEM	: índice de extensão de maturação
IN	: instrução normativa
IPM	: índice de profundidade de maturação
ISO	: International Organization for Standardization
Kg	: quilograma
K ⁺	: íon potássio
L	: litro

mg	: miligrama
min	: minuto
mL	: mililitro
n	: número
NaCl	: cloreto de sódio
Na ⁺	: íon sódio
NNC	: nitrogênio não caséico
NNP	: nitrogênio não protéico
NT	: nitrogênio total
p	: probabilidade de erro
pH	: potencial hidrogeniônico
Phe24	: fenilalanina em posição 24
R	: rendimento
Raj	: rendimento ajustado ao teor de umidade e de sal
Rbs	: rendimento em base seca
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	: ácido tricloro acético
Urea-PAGE	: urea – polyacrylamide gel electrophoresis
V	: volt
Val25	: valina em posição 25
1 ^a	: primeira
2 ^a	: segunda
3 ^a	: terceira
4 ^a	: quarta
%	: por cento
°C	: grau Celsius
>	: maior que
<	: menor que
≤	: maior que ou igual
α	: alfa
α _{s1}	: alfa-s-1

α_{s1-1} : alfa-s1-1
 α_{s2} : alfa-s2
 β : beta
 γ : gama
 κ : kapa

RESUMO

A mastite é definida como uma inflamação do úbere e caracteriza-se pelo aumento de número de células somáticas no leite. O processo inflamatório provoca alterações da composição do leite e da atividade enzimática, o que dá origem a produtos lácteos de qualidade inferior.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da contagem de células somáticas (CCS) do leite sobre a sua composição, o efeito do tratamento (CCS e tempo de coagulação do leite) sobre a composição do soro e do queijo, assim como, o rendimento e a maturação do queijo. Inicialmente, selecionaram-se dois grupos de animais para obtenção de leite com concentração de células somáticas baixa (< 200.000 cél/mL) e alta (> 600.000 cél/mL). Os leites foram submetidos a três tratamentos para obtenção de queijo Prato: (1) obtido a partir de leite com CCS baixa e coagulação em 35 minutos; (2) obtido a partir de leite com CCS alta e coagulação em 35 minutos; (3) obtido a partir de leite com CCS alta e tempo de coagulação ajustado. Avaliaram-se as composições dos leites, soros e queijos e calculou-se o rendimento e a recuperação dos constituintes do leite para o queijo. Os queijos foram avaliados após 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias de maturação quanto ao pH, umidade, frações protéicas, perfis de textura e eletroforético. Calculou-se os índices de extensão e profundidade de maturação. O experimento completo foi repetido três vezes e o delineamento experimental utilizado foi em blocos completamente aleatorizados com um único fator: a CCS ou o tratamento (CCS e tempo de coagulação).

O leite com CCS alta apresentou concentração menor de proteína verdadeira e maior de nitrogênio não protéico. Os queijos obtidos com leite de CCS alta apresentaram maior proteólise do que o queijo de CCS baixa. A recuperação de proteínas foi maior para o queijo de CCS baixa e a recuperação

de lactose foi maior para os queijos de CCS alta. Não se observou diferença significativa no rendimento de fabricação para estes níveis de células somáticas. Entretanto, os tratamentos afetaram o pH, a umidade e os índices de extensão e profundidade de maturação dos queijos. O queijo de CCS alta apresentou maior pH, umidade e proteólise mais intensa, seguido do queijo de CCS alta e tempo de coagulação ajustado e queijo de CCS baixa. Os tratamentos afetaram os perfis de textura: o queijo de CCS alta sem ajuste do tempo de coagulação apresentou menor firmeza que os demais, o queijo de CCS baixa apresentou maior elasticidade que o queijo de CCS alta sem ajuste do tempo de coagulação. O queijo de CCS baixa apresentou maior coesividade que os demais. Todos os queijos com CCS alta apresentaram proteólise mais intensa das frações α_{s1} - e β -caseínas ao longo do tempo.

Em conclusão, os queijos com CCS alta, independentemente do tempo de coagulação, apresentaram maior pH e umidade, proteólise mais intensa, e alteração do perfil de textura, o que pode comprometer a qualidade sensorial típica do produto.

SUMMARY

Mastitis is defined as an inflammation of the udder and is characterized by an increased of somatic cell count in the milk. The inflammatory process causes alterations in the milk composition and its enzymatic activity, resulting in milk products of inferior quality.

The objective of this work was to evaluate the effect of somatic cell count (SCC) in milk on its composition, and the effect of the treatment (SCC and clotting time) on the serum and Prato cheese composition, as well as on the cheese yield and ripening. Initially, two groups of animals were selected to obtain milk with low (< 200.000 cell/ml) and with high (> 600.000 cell/ml) SCC. The milk was submitted to three treatments to obtain Prato cheese: (1) from milk with low SCC and clotting time of 35 minutes; (2) from milk with high SCC and clotting time of 35 minutes; and (3) from milk with high SCC and adjusted clotting time. Milk, serum and cheese compositions were evaluated. Cheese yield and recovery of constituents of milk to cheese were calculated. The cheeses were evaluated after 5, 12, 19, 26, 33, and 40 days of ripening according to pH, moisture, nitrogen fraction, texture and eletrophoretic profiles. The ratios of width ($SN_{pH4.6}/TN*100$) and depth ($SN_{12\%TCA}/TN*100$) of ripening were calculated. The complete experiment was repeated three times and a randomized block design was used with a single factor: either SCC or treatments (SCC and clotting time).

The milk with high SCC showed a smaller concentration of true protein, and a higher concentration of non-protein nitrogen. The cheeses obtained from the milk with high SCC presented higher proteolysis than the cheeses with low SCC. The protein recovery was higher for the cheese with low SCC and the lactose recovery was higher for the cheeses with high SCC. For these SCC levels, no significant difference in cheese yield was observed. However, the treatments affected pH,

moisture and the ratios of width and depth of ripening of the cheeses. The cheese with high SCC presented higher pH, moisture and more intense proteolysis, followed by the cheese with high SCC and adjusted coagulation time and the cheese with low SCC. The treatments affected the texture profiles: the cheese with high SCC without adjusted clotting time was less firm than the others; the cheese with low SCC had more elasticity than the cheese with high SCC without adjusted clotting time. The cheese with low SCC had the most cohesiveness. All the cheeses with high SCC presented more intense proteolysis of the α_{s1} - e β -caseins fractions during ripening.

In conclusion, the cheeses with high SCC, regardless of the coagulation time, had higher pH and moisture, more intense proteolysis and an alteration of the texture profile, all of which can compromise the typical sensorial quality of the product.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a norma ISO 9001: 2001 define-se qualidade como sendo a aptidão de um produto ou de um serviço em satisfazer as exigências implícitas e explícitas do cliente (ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION, 2000).

Atualmente, as indústrias agro-alimentares devem adaptar-se à grande concorrência devida a quantidade e variedade de produtos disponíveis no mercado. A qualidade dos produtos comercializados tornou-se a principal preocupação das cadeias agro-alimentares, e as empresas devem ser capazes de disponibilizarem produtos de qualidade para se manterem no mercado. Assim, as indústrias são submetidas a numerosas limitações que têm como objetivo a satisfação do cliente. De fato, o consumidor, cujas necessidades são cada vez mais exigentes, tem o principal papel no mercado. Garantir um produto de alta qualidade tornou-se fundamental para assegurar sua venda e permitir que a indústria permaneça no mercado. A “Qualidade” é sinônimo de competitividade para o conjunto dos atores de uma cadeia constituída pelos produtores, transformadores, transportadores e distribuidores. Portanto, tem sido importante determinar quais são as necessidades e as exigências ao longo da cadeia para, em seguida, definir a composição padrão desejada da matéria-prima. Isto tem permitido atingir a qualidade tecnológica das matérias-primas para garantir a segurança, a qualidade sensorial e dietética do produto final.

Na maioria dos países, as indústrias leiteiras conseguiram melhorar a qualidade dos seus produtos desenvolvendo programas de qualidade. Assim, foram implementadas regras de produção, transporte e armazenamento para fornecer uma matéria-prima de acordo com as exigências dos laticínios. O sucesso dos programas dependeu dos avanços tecnológicos, mas também da sensibilização dos produtores em relação à necessidade da qualidade. Por isso, implementou-se programas de pagamento diferenciado, onde o preço do litro de leite é calculado em função da sua composição e qualidade. Os principais critérios

utilizados para a estimativa da qualidade e pagamento do leite são a qualidade microbiológica, o teor de proteína e de gordura e a contagem de células somáticas (CCS).

Os progressos constatados foram também o resultado dos trabalhos de pesquisa através de inovação científica e de desenvolvimento tecnológico. Assim, a implementação de novas técnicas de produção permitiu um melhor controle da qualidade microbiológica do leite e da sua composição, o que resultou na obtenção de produtos derivados saudáveis e padronizados. Entretanto, nenhuma tecnologia é capaz de eliminar ou inibir as atividades enzimáticas originais, as quais são influenciadas pela CCS (BARBANO, 2004). Assim, a contagem de células somáticas pode ser considerada como o importantíssimo critério de qualidade do leite cru, pois o estado sanitário do úbere da vaca leiteira é um fator significativo de variação da composição do leite e das suas atividades enzimáticas.

Na Austrália, União Européia, Nova Zelândia, Suíça e Noruega o limite máximo de células somáticas admitidas no leite é de 400.000 cél/mL, enquanto o Canadá adota 500.000 cél/mL e os Estados Unidos fixaram em 750.000 cél/mL. Em todos esses países, desenvolvem-se pesquisas e programas constantes para reduzir o limite máximo de CCS, uma vez que a sua elevação diminui significativamente a qualidade do leite, além de estar associada ao aparecimento de defeitos nos produtos processados com essa matéria-prima.

O Brasil também emprega esforços para melhorar a qualidade do leite. Este esforço iniciou-se com o Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite e culminou com a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002). Através desta instrução, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento reformulou os itens utilizados para a avaliação da qualidade do leite, incluindo, pela primeira vez no Brasil, a CCS como um critério para a aceitação do leite. Esta norma estabelece que o limite máximo legal fixado será de

1.000.000 cél/mL a partir de primeiro de julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a partir de primeiro de julho 2007 nas regiões do Norte e Nordeste. De julho de 2008 até julho de 2011, a meta é diminuir a CCS para 750.000 cél/mL, que é similar ao nível encontrado no Estados Unidos. A partir de julho de 2011, o Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite quer prosseguir os esforços através de melhorias significativas dos controles da saúde animal e deseja chegar a um padrão de CCS igual à União Européia, ou seja: 400.000 cél/mL (LERAYER *et al.*, 2002).

Vários trabalhos têm discutido o efeito da qualidade do leite sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos produtos lácteos em geral, e dos queijos em especial. Entretanto, no Brasil, poucos são os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de correlacionar a qualidade do leite à qualidade do produto lácteo processado. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é avaliar o impacto da CCS do leite sobre qualidade do queijo Prato. Esse queijo foi escolhido por ser tipicamente brasileiro e amplamente consumido no País.

2. OBJETIVOS

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Avaliar o efeito da CCS do leite sobre sua composição.

2. Avaliar o efeito da CCS do leite e da condição de processamento sobre:
 - a) a composição do queijo Prato;
 - b) a recuperação dos constituintes do leite para o queijo;
 - c) o rendimento de fabricação;
 - d) o desenvolvimento da proteólise e da textura do queijo durante a maturação.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 A Mastite

Segundo a Fédération Internationale de Laiterie define-se a mastite como uma inflamação da glândula mamária (FIL-IDF, 1987). O estado inflamatório envolve um ou vários quartos do úbere, qualquer que seja a sua origem (traumática, química, física ou biológica); sua gravidade (clínica ou subclínica); sua evolução (crônica, aguda ou subaguda); ou seu resultado final (cura aparente ou real, ou morte do animal).

A mastite é considerada a principal patologia infecciosa nos rebanhos de bovinos leiteiros no mundo e se caracteriza pelo aumento do número de células somáticas no leite (ANDREWS *et al.*, 1983). Ela é responsável pelos maiores prejuízos econômicos do setor leiteiro. Para o produtor, três tipos de perdas econômicas podem ser consideradas: perda em curto prazo, representadas pelo descarte de leite, custos de medicamentos e serviços veterinários e custo de mão de obra extra; perdas em médio prazo, representadas pela diminuição do preço do leite devido ao aumento da taxa celular ou da concentração de resíduos em antibióticos; e perdas em longo prazo, representadas pela diminuição da produção leiteira, perda do animal e perda do potencial genético. Para o laticínio, as conseqüências econômicas da mastite dependem da qualidade da matéria prima recebida. A alteração da composição do leite afeta negativamente os processos tecnológicos, alterando a qualidade dos produtos obtidos e o rendimento industrial (SANTOS, 2003). Em resumo, a mastite é prejudicial ao setor leiteiro, pois ela representa menor lucro tanto para o produtor quanto ao laticínio.

Distinguem-se dois tipos de mastite em função da forma de apresentação da inflamação (FIL-IDF, 1987). A primeira é a mastite “clínica”, caracterizada por uma inflamação severa. Seu nome se deve aos sintomas clínicos diretamente

perceptíveis (aumento de temperatura, inchaço e dor), que são seguidos, em casos extremos de febre, que se denomina de mastite aguda. Além disso, observa-se significativas alterações na secreção láctea. O leite pode apresentar alguns grumos e anomalias de cor e odor que podem ser observados nos primeiros jatos no início da ordenha. O segundo tipo de mastite denomina-se subclínica, por seus sintomas serem quase imperceptíveis. Caracteriza-se pela inflamação moderada do quarto. Apesar de alteração da secreção láctea, a observação visual do leite e a palpação do quarto não permitem detectar a inflamação e a mastite fica quase imperceptível ao criador.

A inflamação pode ser devida a um traumatismo ou a uma alteração fisiológica, mas é geralmente consequência da reação de defesa da glândula mamária contra as agressões por patógenos (BRAMLEY e DODD, 1984). Os microorganismos penetram via ascendente pelo canal do teto, o que explica que somente um quarto pode estar infetado, visto que os tetos são independentes no úbere. Os fungos, micoplasmas, algas, ou parasitas multicelulares podem ser associados a esta doença, porém a maioria das infecções da glândula mamária é causada por bactérias (BRAMLEY e DODD, 1984; HARMON, 1994). Até hoje, mais de duzentos agentes etiológicos responsáveis de mastites foram identificados. No entanto, constata-se frequentemente a predominância de cinco espécies através de isolamento microbiológico. Distingue-se, de um lado, três microorganismos do ambiente que se distribuem nos locais onde a vaca permanece e são responsáveis pelas infecções mais severas: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Por outro lado, dois microorganismos contagiosos que se localizam no reservatório mamário e são responsáveis por infecção de gravidade moderada: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (BRAMLEY e DODD, 1984; HARDNING, 1999; HARMON, 1994).

3.2 As células somáticas

A mastite é caracterizada pelo aumento do número de células somáticas (ANDREWS *et al.*, 1983) e considera-se sob esse termo geral, o conjunto das células presentes no leite. As células somáticas do leite são compostas basicamente de dois tipos celulares principais: as secretoras, originárias da descamação do epitélio mamário e os leucócitos, que são provenientes da circulação sangüínea.

As células epiteliais resultam da descamação normal e da remoção do epitélio secretor da glândula mamária. Elas representam 80% do total das células somáticas do leite num animal sadio. Numa vaca que não apresenta o quadro de mastite, a contagem total de células somáticas é relativamente baixa, sendo inferior a 200.000 cél/mL (KITCHEN, 1981). A quantidade de células somáticas liberadas aumenta com a mastite devido à danificação do epitélio provocada pelos patógenos. No entanto, a proporção de células epiteliais diminui na contagem total em benefício do outro tipo de células somáticas: os glóbulos brancos.

Na verdade, a inflamação provoca, sobretudo, a mobilização dos meios de defesa humoral (anticorpos) e celulares (leucócitos). Assim, o aumento da CCS observado durante a mastite é principalmente causado pelo afluxo dos leucócitos do sangue para o leite, cuja proporção aumenta segundo a severidade da infecção. Os leucócitos presentes são macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos (KITCHEN, 1981). Os macrófagos e os neutrófilos polimorfonucleares são fagócitos que podem liberar enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais podem alterar a composição do leite. O neutrófilos polimorfonuclear é o tipo celular predominante no leite com CCS alta (HARMON, 1994) e no leite ao final da lactação (KELLY *et al.*, 1998).

Os fatores susceptíveis de modificar o nível de CCS do leite são de natureza patológica ou fisiológica. Os principais fatores conhecidos são: a raça,

genética, idade do animal, estagio de lactação, estação do ano, hormônios da glândula mamária, tamanho do rebanho e o nível de produção de leite. Mas a infecção da glândula mamária é o fator determinante e responsável pelo aumento da CCS no leite (FONSECA e SANTOS, 2000). A determinação da CCS pode ser feita de maneira direta ou indireta. Dentre as técnicas indiretas, destaca-se o teste da catalase, os testes colorimétricos (reação de Feulgen) e os métodos baseados na reação de gelificação induzida pela adição de um detergente ou de uma solução alcalina: teste de Whiteside, CMT (*Californian Mastitis Test*), WMT (*Wisconsin Mastitis Test*) e MCT (*Michigan Mastitis Test*). Os métodos diretos de determinação de CCS envolvem o uso de microscópio ou de aparelho eletrônico automatizado tais como *Coulter Counter* e o *Fossomatic*. Para o primeiro, as partículas do leite passam através de uma sonda entre dois eletrodos e provocam uma modificação da resistência elétrica proporcionalmente a seu diâmetro. O *Coulter* é previamente calibrado com o diâmetro da célula somática para efetuar a contagem. No caso do *Fossomatic*, necessita-se a coloração do DNA das células somáticas com um corante fluorescente (brometo dietílico). Assim, a fluorescência vermelha emitida permite a contagem das células somáticas pelo aparelho. Dentre os métodos descritos, o último é o mais usado, pois consiste num método rápido, fácil de operar e barato (SANTOS, 2001).

3.3 Efeito da mastite sobre produção e composição do leite

A coesão do tecido alveolar devido às junções apertadas entre as células epiteliais impede qualquer trânsito de moléculas por difusão simples. Todos os elementos passam do compartimento sanguíneo do animal ao leite atravessando o citoplasma das células epiteliais, o qual possui uma função regulatória. Desta forma, a integridade da barreira epitelial e o metabolismo direcionado das células epiteliais vão permitir o controle da qualidade nutricional, química e sanitária do leite. A alteração do estado sanitário da glândula mamária é, portanto, um fator significativo de variação da qualidade bioquímica do leite (AULDIST e HUBBLE, 1998; MUNRO *et al.*, 1984). Estas variações são conseqüências das alterações do

funcionamento das células epiteliais mamárias, devidas à alteração da permeabilidade das membranas e redução da síntese dos componentes do leite e do aumento da concentração celular responsável pela modificação das atividades enzimáticas no leite.

De ponto de vista quantitativo, diversos autores mostraram a existência de uma correlação negativa entre a CCS e a produção leiteira. Rajala-Schutz *et al.* (1999) acompanharam a produção leiteira de vacas atingidas por mastite e vacas sadias durante um período de 305 dias de lactação e observaram uma diminuição na produção leiteira, que variou de $-1,8\%$ a $-7,4\%$. Perda de 5% na produção leiteira foi também observada por Klei *et al.* (1998) e Deluyker *et al.* (1993) em rebanhos com mastite. O decréscimo da produção leiteira foi também observado para rebanho de búfala atingida de mastite (CÉRON-MUÑOZ *et al.*, 2002). Essa diminuição é devida, principalmente, à alteração do epitélio secretor pelos patógenos ou pela ação de suas toxinas. Esta não é a única causa, pois a síntese do leite pode ser diretamente inibida pelos hormônios da reação inflamatória (SHUSTER *et al.*, 1991), e, conseqüentemente, os danos sofridos afetam a capacidade de síntese e de secreção da glândula mamária.

Além do efeito quantitativo, pode ser adicionado um efeito qualitativo prejudicial para as indústrias leiteiras. O leite com CCS alta sofre mudança na composição, com alteração na concentração de todos os seus constituintes (AULDIST e HUBBLE, 1998; KITCHEN, 1981; MITCHELL *et al.*, 1986a; MUNRO *et al.*, 1984). Essas modificações são o resultado das alterações da síntese e da perda de permeabilidade do epitélio, que perde seu papel de sistema de controle e regulação.

3.3.1 Efeito sobre o teor de sólidos totais.

De uma maneira geral, a mastite pode influenciar o teor de sólidos totais. O leite com CCS alta sofre diminuição do teor de sólidos totais (LEAVITT *et al.*,

1982, ROGERS *et al.*, 1989b). No entanto, Marques *et al.* (2003) relataram que o teor de sólidos totais de leite com CCS alta não foi alterado, e Fernandes (2003) constatou um aumento dos sólidos totais com a elevação da CCS. Machado *et al.* (2000) estudaram a composição de leite de rebanhos brasileiros, armazenados em tanques, localizados principalmente no Estado de São Paulo e no sul de Minas Gerais, distribuídos segundo sua CCS. O trabalho foi realizado a partir do banco de dados do Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ-USP, e os resultados mostraram que a concentração de sólidos totais, apesar de não significativas, apresentou uma tendência a redução com aumento da CCS. Além disso, os autores observaram que o leite dos tanques com maior CCS apresentou maior variabilidade nas concentrações dos constituintes do leite. As diferentes alterações sofridas por cada componente permite explicar que o teor de sólidos totais pode aumentar, diminuir ou ficar constante. Assim, é mais adequado estudar o efeito da CSS sobre a concentração dos principais constituintes do leite: proteína, gordura, lactose e minerais.

3.3.2 Efeito sobre o teor de proteína

O leite de vaca sadia contém em média 3,5% de proteínas divididas em caseínas e proteínas do soro nas proporções 80/20 (FOX e McSWEENEY, 1998). As caseínas são essenciais à etapa de coagulação para a fabricação dos queijos. Distinguem-se principalmente quatro tipos de caseínas que são as frações α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas (NG-KWAI-HANG e KROEKER, 1984; SWAISGOOD, 1993) nas seguintes proporções: 37%, 10%, 35% e 15% (FOX *et al.*, 2000). As proteínas séricas compreendem α -lactalbumina, β -lactoglobulina, soro-albumina bovina, imunoglobulinas e lactoferrina (NG-KWAI-HANG e KROEKER, 1984).

Os resultados referentes à concentração de proteína total do leite com CCS elevada mostraram que as conclusões dos autores são discordantes. Leavitt *et al.* (1982) demonstraram uma redução na concentração de proteínas totais do leite com CCS elevada. Outros autores (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991;

KLEI *et al.*, 1998; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b; SHUSTER *et al.*, 1991) observaram um aumento da concentração protéica, e alguns resultados não mostraram nenhuma diferença na concentração de proteínas totais entre leite com CCS baixa e alta (ROGERS *et al.*, 1989a; VERDI *et al.*, 1987). No entanto, é possível explicar esse conjunto de resultados aparentemente contraditórios. A mastite provoca uma diminuição da síntese celular, e conseqüentemente uma menor síntese protéica. Por outro lado, a perda de permeabilidade do epitélio permite uma maior passagem direta de proteínas do sangue para o leite. Os elevados níveis de proteínas totais do leite devem-se, particularmente, ao aumento de proteínas não caseícas, enquanto que as caseínas diminuem levemente (POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b). Assim, em função da severidade da infecção e da mastite, a quantidade de proteínas provenientes da circulação sanguínea pode ser superior ou compensar, ou não, as perdas provocadas pelo decréscimo de síntese. Portanto, é mais apropriada a análise das frações protéicas.

O aumento em células somáticas é associado à diminuição da quantidade total de caseínas no leite (LEAVITT *et al.*, 1982; ROGERS e MITCHELL, 1994). Esse fenômeno pode ser explicado pela diminuição da síntese e, sobretudo, pelo aumento da proteólise no leite com CCS alta. Vários autores (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; ROGERS, 1987; ROGERS *et al.*, 1989a; VERDI *et al.*, 1987) observaram que o aumento da CCS foi acompanhado pela diminuição da relação caseínas/proteína total. Esta diminuição foi considerada significativa quando a CCS foi superior a 200.000 cél/mL (COULON *et al.*, 1998).

Barry e Donnelly (1981) e Rogers *et al.* (1989a) associaram a presença de mastite à redução das frações α_{s2} e β -caseína, assim como à diminuição menos pronunciada de α_{s1} -caseína e ao aumento das frações de γ e κ -caseínas. Saeman *et al.* (1988) observaram uma diminuição de 20% das α - e β -caseínas para os leites com CCS alta. VERDI *et al.* (1987) confirmaram que a β - e a α -caseínas são degradadas facilmente e afirmou que a κ -caseína é mais resistente à hidrólise.

Segundo Barry e Donnelly (1981) e Rogers *et al.* (1989a), o aumento aparente da fração κ -caseína no perfil eletroforético da amostra de leite com CCS alta deveu-se principalmente ao enriquecimento da fração de peptídeos de mesmo peso molecular, produzidos a partir da hidrólise de caseínas. O aumento das γ -caseínas resulta da hidrólise, pois elas representam os produtos da clivagem proteolítica da β -caseína (ANDREWS e ALICHANIDIS, 1983).

A distribuição caseíca entre as frações solúvel e micelar é afetada pela CCS. Ali *et al.* (1980) observaram que com o aumento da CCS houve um aumento de 37% da fração solúvel, a qual era constituída basicamente de β -caseínas, enquanto as frações α e κ -caseína praticamente não variaram. Isto pode favorecer a proteólise, uma vez que as caseínas solúveis são mais susceptíveis às degradações enzimáticas.

Vários autores (COONEY *et al.*, 2000; ROGERS, 1987; ROGER *et al.*, 1989a) observaram que com o aumento da CCS houve elevação da relação nitrogênio não-protéico/nitrogênio total, causada pela proteólise e formação de pequenos peptídeos.

Além das alterações observadas sobre as frações caseícas, as concentrações em proteínas séricas do leite foram igualmente influenciadas pela mastite, uma vez que foram observadas ainda numerosas variações em suas concentrações. No que diz respeito às variações das concentrações de α -lactalbumina e de β -lactoglobulina, frente às variações da CCS, os dados da literatura são também conflitantes. Segundo Verdi *et al.* (1987) as concentrações de α -lactalbumina e de β -lactoglobulina não foram influenciadas pelo nível de CCS. Por outro lado, Caffin *et al.* (1985) e Rogers *et al.* (1989a) observaram diminuição das concentrações de α -lactalbumina e β -lactoglobulina quando houve aumento da CCS. Segundo Rogers (1987), somente leite com CCS relativamente elevada apresentou diminuição significativa nas concentrações de α -lactalbumina e β -lactoglobulina.

As proporções em lactoferrina, soro-albumina bovina e imunoglobulina, as quais representaram 1% das proteínas totais do leite, passaram a representar 4% das proteínas totais do leite após a infecção. Quando a infecção e a mastite foram eliminadas e o leite passou a ter um nível baixo de CCS, ocorreu o retorno às taxas iniciais de lactoferrina, soro-albumina bovina e imunoglobulina (SAEMAN *et al.*, 1988). O aumento da concentração de soro-albumina bovina em leite de CCS alta também foi observado por Ali *et al.* (1980); Kitchen *et al.* (1980); Politis *et al.* (1989a); Poutrel *et al.* (1983); Rogers *et al.* (1989a) e Shuster *et al.* (1991), entretanto, esse aumento não foi constatado em leites com nível médio de CCS (VERDI *et al.*, 1987).

Como conclusão geral, observa-se que o aumento da CCS é acompanhado da diminuição das proteínas sintetizadas ao nível da glândula mamária, como as caseínas, a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina, e do aumento das proteínas provenientes da circulação sanguínea, como lactoferrina, soro-albumina bovina e imunoglobulinas.

3.3.3 Efeito sobre o teor de gordura

O leite de vaca sadia contém em média 3,5% de gordura (FOX e McSWEENEY, 1998). A influência da CCS sobre o teor de gordura do leite não tem sido pesquisado como tem a sua influência sobre o teor de proteínas. Entretanto, da mesma forma que para as proteínas, existem relatos na literatura de aumento e de redução da quantidade de gordura do leite proveniente de vacas com mastite.

Vários autores (COONEY *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2000; SHUSTER *et al.*, 1991) observaram que a quantidade de gordura do leite aumentou em vacas com mastite. Entretanto, Auldist *et al.*, 1996c; Leavitt *et al.* (1982); Politis e Ng-Kwai-Hang (1988b) observaram uma diminuição da quantidade de gordura no leite com CCS alta. Segundo os autores, a menor concentração de gordura deveu-se,

provavelmente, à diminuição da sua síntese, pois o epitélio foi danificado durante a mastite. Entretanto, o aumento no teor de gordura não é totalmente compreendido. Ma *et al.* (2000) consideraram que o aumento observado pode ser causado pela diminuição da produção leiteira devido à mastite.

3.3.4 Efeito sobre o teor da lactose

A lactose é o composto sólido mais abundante do leite, com um teor médio de 4,8% (FOX e McSWEENEY, 1998). É o principal carboidrato do leite e tem um papel importante, pois serve como substrato para a obtenção dos produtos fermentados. No leite, ela participa, juntamente com os íons solúveis (Na^+ , K^+ e Cl^-), da manutenção da pressão osmótica do fluido (FOX *et al.*, 2000).

A concentração de lactose diminui no leite com CCS alta (ALI *et al.*, 1980; ROGERS, 1987; ROGERS *et al.*, 1989b; SHUSTER *et al.*, 1991). Céron-Muñoz *et al.* (2002) observaram também um decréscimo do teor de lactose em leite de búfala. Isso se deve, possivelmente, à passagem da lactose do leite para o sangue, o que pode ser comprovado por sua elevada concentração no sangue e na urina das vacas com mastite (SHUSTER *et al.*, 1991). Além disso, pode-se considerar a alteração da síntese de carboidratos pelo epitélio danificado da glândula mamária. Outra explicação possível, é que a diminuição do teor em lactose pode ser correlacionada com o aumento de NaCl no leite com CCS alta. A elevação da concentração de sais durante a mastite desencadeia, provavelmente, a elevação da pressão osmótica do leite. Assim, esse aumento pode ser compensado pela redução da concentração de lactose (FOX *et al.*, 2000).

3.3.5 Efeito sobre o teor de minerais

O leite de uma vaca sadia apresenta em média uma concentração de 0,7% de minerais (FOX e McSWEENEY, 1998). Essa concentração, mesmo inferior a 1%, pode ser significativamente afetada pela mastite. As concentrações de sódio e

cloro aumentaram no leite infectado, no entanto as de cálcio e potássio diminuíram (KITCHEN, 1981; ROGERS *et al.*, 1989b). Segundo Kitchen *et al.* (1980), a concentração de sódio duplicou quando a CCS foi superior a 500.000 cél/mL, entretanto a concentração de manganês diminuiu no leite com CCS alta (KITCHEN, 1981). A redução do cálcio no leite com CCS alta pode ser explicada pelo fato de que a maior parte do cálcio é ligada às micelas de caseínas, cuja concentração diminui durante a mastite (NEVILLE e WATTERS, 1983). As alterações das concentrações em minerais devem-se, principalmente, à ruptura do epitélio, que nesta condição não regula as trocas entre a luz alveolar e a circulação sanguínea, permitindo o livre trânsito dos componentes.

3.4. Efeito da mastite sobre a atividade enzimática

Todos os alimentos contêm numerosas enzimas, que podem ser endógenas ou exógenas ao alimento e podem desempenhar um papel benéfico ou não ao produto, que é dependente da ocorrência de transformações desejáveis ou indesejáveis. O leite contém várias enzimas naturais que exercem suas atividades sobre os constituintes da secreção láctea. Cerca de 60 enzimas endógenas foram descritas no leite normal de vaca (FOX e McSWEENEY, 1998). Todas são provenientes da circulação sanguínea ou são liberadas pelas células somáticas. Isto sugere que a mastite pode alterar a atividade enzimática através do aumento da CCS e/ou a deterioração da permeabilidade do epitélio da glândula mamária.

Segundo Barbano (2004), nenhuma tecnologia atual permite eliminar ou inibir as atividades enzimáticas originais do leite, as quais dependem da qualidade do leite cru e principalmente da contagem de células somáticas. As atividades proteolítica e lipolítica encontradas no leite são as mais relevantes para a indústria láctea e foram as mais estudadas, pois são responsáveis pelas alterações da matéria-prima e pelos conseqüentes defeitos de qualidade dos produtos processados.

3.4.1 Atividade proteolítica

A proteólise é a hidrólise das proteínas, que gera a formação de peptídeos de tamanho menor. Essa degradação enzimática ocorre naturalmente no leite e é resultante da atividade proteolítica da plasmina e das enzimas liberadas pelas células somáticas ou pelos microorganismos. No entanto, a plasmina possui maior importância no que diz respeito à proteólise natural no leite (FOX e McSWEENEY, 1998).

O aumento da intensidade da atividade proteolítica no leite foi associado à mastite e à elevação da CCS (DE RHAM e ANDREWS, 1982; MURPHY *et al.*, 1989; SAEMAN *et al.*, 1988; SENYK *et al.*, 1985; VERDI *et al.*, 1987). Esta correlação positiva foi igualmente observada para o leite armazenado com ou sem pasteurização preliminar, demonstrando que as enzimas envolvidas apresentam certa estabilidade aos tratamentos térmicos (SENIK *et al.*, 1985). Além disso, a atividade proteolítica do leite com CCS alta é parcialmente responsável pela alteração da fração caseíca do leite (SAEMAN *et al.*, 1988).

A plasmina faz parte de um sistema enzimático complexo constituído pela plasmina (forma ativa da enzima), o plasminogênio (zimogênio ou forma inativa da plasmina), o inibidor de plasmina, o ativador de plasminogênio e o inibidor de ativador de plasminogênio (BASTIAN e BROWN, 1996). Plasmina, plasminogênio e seu ativador são associados às micelas de caseínas do leite e são naturalmente incorporados ao queijo durante o processo de fabricação, enquanto os dois inibidores do sistema enzimático estão na fase sérica do leite e são perdidos no soro (FOX *et al.*, 2000).

A plasmina é uma enzima proteolítica alcalina que participa amplamente da hidrólise das caseínas (BASTIAN e BROWN, 1996; FOX e McSWEENEY, 1998). Mais especificamente, a plasmina hidrolisa a α_{s1} -caseína e produz fragmentos de λ -caseína (AIMUTIS e EIGEL, 1982), no entanto, também degrada β -caseína (ALI

et al., 1980; DONNELLY e BARRY, 1983). A quantidade de plasmina e de plasminogênio aumenta no leite com CCS elevada (POLITIS *et al.*, 1989a). Além disso, a atividade da plasmina também é aumentada (ANDREWS, 1983a, b; POLITIS *et al.*, 1989b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b), e segundo Ballou *et al.* (1995) essa atividade foi significativamente maior no leite com CCS alta. Observando-se que o elevado nível de CCS é associado à elevação da atividade proteolítica e ao aumento da concentração em plasmina, considera-se que esta enzima é a principal responsável pela elevação da atividade proteolítica no leite com CCS alta.

Alguns trabalhos relataram que a proteólise não acontecia somente em leite com CCS elevada. Urech *et al.* (1999) relatou que os quartos com mastite subclínica produzem leite com mais plasminogênio e com maior atividade de plasmina. Além disso, O' Brien *et al.* (2001) observaram que essa elevação de atividade é significativa acima de 300.000 cél/mL e, Le Roux *et al.* (1995) demonstrou uma significativa degradação das proteínas a partir de 250.000 cél/mL.

O aumento da quantidade de plasmina e de plasminogênio no leite com CCS alta deve-se à maior transferência destes constituintes do sangue para o leite, devido à degradação do epitélio (SHUSTER *et al.*, 1991). A elevação da atividade de plasmina no leite é provocada pelas células somáticas que contêm um ativador de plasminogênio, que o converte em plasmina na glândula mamária. Verdi e Barbano (1991a) demonstraram que os leucócitos eram capazes de sintetizar o ativador do plasminogênio somente quando eram estimulados pela presença dos patógenos. A atividade do ativador do plasminogênio aumenta durante a inflamação, o que estimula a conversão do plasminogênio em plasmina (ZACHOS *et al.*, 1992). Além disso, o pH do leite com CCS alta aumenta levemente (GRANDISSON e FORD, 1986; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994; ROGERS *et al.*, 1989b), o que sugere um aumento da atividade de plasmina. O período final da lactação é

também caracterizado pela grande quantidade de células somáticas, pelo aumento da ativação do plasminogênio e da concentração de plasmina. A maior parte da proteólise causada pela plasmina acontece na glândula mamária, antes da ordenha do leite, pois a temperatura interna do úbere é ótima para a atuação desta protease (BARRY e DONNELLY 1981).

Além da plasmina, outras enzimas originadas das células somáticas e dos leucócitos contribuem para a atividade proteolítica no leite. Considine *et al.* (2002) estudaram a Catepsina-G que é uma das principais proteases liberadas pelos polimorfonucleares. Os autores demonstraram a capacidade da enzima de hidrolisar as α_{s1} - e β -caseínas com produção de peptídeos similares aos liberados pela plasmina, concluindo que a catepsina-G pode contribuir de maneira significativa para a proteólise que ocorre no leite com CCS alta. Alguns autores (SAEMAN *et al.*, 1988; VERDI e BARBANO, 1988) observaram no leite com CCS alta a presença de produtos de hidrólise de caseínas, diferentes daqueles produzidos pela plasmina, após sua inativação. Segundo Verdi e Barbano (1991b) as proteases envolvidas nesta hidrólise foram fornecidas pelos macrófagos, que apresentaram maior atividade no leite do que no sangue. No entanto, segundo Grieve e Kitchen (1985), as proteases dos leucócitos não participaram de maneira significativa do aumento da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica do leite com CCS alta é muito estável. Após a pasteurização constatou-se uma atividade proteolítica residual que sugeriu que a plasmina e o plasminogênio foram resistentes ao tratamento térmico (ALICHANIDIS *et al.*, 1986). Também, observou-se que uma parte da atividade das proteases fornecida pelos leucócitos resistiu à pasteurização (VERDI e BARBANO, 1988). Além disso, foi percebido que após o tratamento da infecção e retorno a um nível baixo de CCS, uma parte da atividade proteolítica ainda permaneceu (MURPHY *et al.*, 1989). Saeman *et al.* (1988) sugeriram que a plasmina seria o principal responsável desta proteólise residual relativamente elevada.

Em conclusão, a atividade proteolítica é maior no leite com CCS alta e ela é particularmente estável. Na verdade, a pasteurização do leite com CCS alta não elimina totalmente a sua atividade proteolítica. Também, esta atividade permanece quando o leite retorna a um nível baixo de CCS após o tratamento da infecção.

3.4.2 Atividade lipolítica

A lipólise é definida como a hidrólise dos lipídios. No leite, essa degradação enzimática ocorre naturalmente e envolve a hidrólise dos triacilglicerídeos em acilglicerídeos parciais (di- e monoacilglicerídeos ácidos) e ácidos graxos livres. A lipólise é um problema para a indústria leiteira, pois confere sabor e odor de ranço ao leite e aos produtos derivados (DEETH, 2002). A lipólise é resultante da atividade da lipase lipoprotéica e das lipases liberadas pelas células somáticas. Segundo Fox e McSweeney (1998) a lipase lipoprotéica é a lipase de maior importância no que diz respeito a lipólise e a geração de ácidos graxos livres .

Murphy *et al.*, (1989) observaram o aumento da concentração de ácidos graxos livres no leite com CCS alta. Este aumento tem sido atribuído à maior susceptibilidade à lipólise do que ao aumento da atividade lipolítica do leite. Acredita-se que os leucócitos, que invadem a glândula mamária em resposta à infecção, produzem enzimas lipolíticas que danificam a membrana dos glóbulos de gordura e expõem os triacilglicerídeos para futuras degradações pelas lipases naturais do leite (AULDIST e HUBBLE, 1998). De acordo com Deeth (2002), a mastite é responsável pelo aumento de ácidos graxos livres no leite. Ele afirma que a glândula mamária infectada sintetiza a gordura de maneira incompleta e apresenta uma maior concentração inicial de ácido graxos livres no leite. Além disso, admite-se que o leite mastítico apresenta maior tendência à lipólise, entretanto, considera-se que o efeito sobre o nível de ácidos graxos livres é relativamente baixo quando comparado à lipólise espontânea ou a provocada pelas enzimas bacterianas.

3.5 Efeito da mastite sobre os derivados lácteos

A qualidade do leite processado e dos produtos lácteos depende da composição e da qualidade da matéria-prima. O aumento da CCS altera a composição e as características enzimáticas do leite. Portanto, pode afetar significativamente a qualidade e o rendimento dos produtos lácteos processados. Desta forma, estudos têm sido desenvolvidos visando correlacionar a CCS do leite com o rendimento e as características físico-químicas e sensorias do leite e dos produtos lácteos, especialmente os queijos.

3.5.1 Efeito sobre o queijo

No que diz respeito à fabricação de queijos, tanto para os obtidos por coagulação enzimática (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; GRANDISSON e FORD, 1986; LEAVITT *et al.*, 1982; MATIOLI *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a, b, c; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994), como para os obtidos por coagulação ácida (KLEI *et al.*, 1998), a CCS alta tem sido associada ao menor rendimento, à alteração da multiplicação microbiana e à qualidade sensorial inferior dos produtos. Segundo Lucey (1996), leite com CCS alta, produzido por animais em final de lactação ou atingidos por mastite, deve ser identificado e descartado para não ser fornecido às indústrias leiteiras.

As alterações de pH do leite com CCS alta podem comprometer a qualidade dos queijos. O pH é um parâmetro importante, tanto para a coagulação como para a dessoragem do coágulo, e influencia significativamente a sinérese e a textura do produto final. Vários trabalhos mostraram que o leite com CCS alta apresentou pH mais alto (GRANDISSON e FORD, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994), assim como diminuição da acidez titulável (GRANDISSON e FORD, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000). Essas alterações podem inibir a ação da renina e desencadear defeitos de textura no produto

(MUNRO *et al.*, 1984). Além disso, a inibição da ação da renina pode ser responsável pelo tempo mais longo de coagulação, que tem sido observado em leites com CCS alta (ALI *et al.*, 1980; AULDIST *et al.*, 1996c; MATIOLI *et al.*, 2000; OKIGBO *et al.*, 1985; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988c; ROGERS, 1987). O coágulo obtido após a coagulação do leite com CCS alta é notadamente mais fraco, menos firme e mais úmido (ALI *et al.*, 1980; GRANDISSON e FORD, 1986; KLEI *et al.*, 1998; MATIOLI *et al.*, 2000; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988c), o que afeta significativamente as características dos queijos obtidos. Estudos recentes (SRINIVASAN E LUCEY, 2002) demonstraram que a plasmina, enzima que aumenta significativamente no leite com CCS alta (POLITIS *et al.*, 1989a) degrada rapidamente a α_{s1} - e β -caseínas desfavorecendo as interações proteínas-proteínas e enfraquecendo a matriz protéica, conforme demonstrado através de micrografias de géis inoculados com plasmina.

Os diversos autores que compararam a composição e o rendimento de queijos obtidos a partir de leite com CCS alta e baixa, demonstraram que “os ganhos de matéria medidos no soro” foram resultados das “perdas sofridas pelo queijo” durante a fabricação. Quando a fabricação de queijo foi feita a partir de leite com CCS alta, observou-se no soro um aumento da quantidade de proteínas totais (BARBANO *et al.*, 1991; COONEY *et al.*, 2000; GRANDISSON e FORD, 1986; KLEI *et al.*, 1998; MATIOLI *et al.*, 2000; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994), mais especificamente um aumento em caseínas e finos (ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994), um aumento do conteúdo de gordura (ALI *et al.*, 1980; BARBANO *et al.*, 1991; MATIOLI *et al.*, 2000; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994) e um aumento da concentração de lactose (GRANDISSON e FORD, 1986).

Paralelamente, a utilização de leite com CCS alta para a elaboração de queijo foi associada à diminuição do teor de sólidos totais e proteína do queijo (COONEY *et al.*, 2000; GRANDISSON e FORD, 1986; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a). Também observou-se a diminuição do teor de gordura (BARBANO

et al., 1991; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987) e o aumento do conteúdo de umidade (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; GRANDISSON e FORD, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994).

Segundo Lucey e Kelly (1994), os conteúdos de proteína e gordura são os dois componentes mais importantes em termos de rendimento queijeiro e, desta forma, as alterações descritas anteriormente repercutem sobre o rendimento do produto final. Segundo Roupas (2001), a mastite faz parte dos principais fatores que afetam o rendimento queijeiro. Vários autores correlacionaram a diminuição do rendimento queijeiro ao aumento de CCS (ALI *et al.*, 1980; AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; KLEI *et al.*, 1998; LEAVITT *et al.*, 1982; MATIOLI *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). Somente Grandisson e Ford (1986) não observaram diferenças de rendimento entre os queijos fabricados a partir de leite com CCS baixa e alta. Segundo os autores que observaram menor rendimento queijeiro a partir de leite com CCS alta, isto se deve, principalmente, a menor quantidade de caseína recuperada durante o processo de fabricação. A relação caseínas solúveis/caseínas micelares aumenta no leite com CCS alta devido, sobretudo, à passagem da β -caseína da fração micelar para a fração solúvel. Esse trânsito refere-se também às frações κ - e α -caseínas, porém, em menor proporção. A caseína solúvel é mais susceptível à proteólise e, portanto, uma menor quantidade de caseína será incorporada ao retículo durante a formação do coágulo (ALI *et al.*, 1980), prejudicando o rendimento do produto.

Kalit *et al.* (2002) avaliaram o papel da plasmina durante a maturação do queijo Podravec. Após adição de urokinase (ativador de plasminogênio) ao leite de CCS alta e baixa, os autores observaram um aumento dos índices de extensão e profundidade de maturação para o queijo obtido a partir do leite com CCS acima de 500.000 cél/mL. Ao mesmo tempo, foi também observado um aumento da

liberação de γ -caseínas devido, provavelmente, à degradação da β -caseína pela plasmina.

Durante a maturação dos queijos, a análise do perfil eletroforético permite avaliar a evolução da proteólise. Cooney *et al.* (2000) observaram, ao longo de 140 dias de maturação do queijo Suíço, que a degradação da α_{s1} -caseína foi mais rápida nos queijos fabricados a partir de leite com CCS alta, o que resultou numa produção mais rápida de α_{s1} -I-caseína. Segundo os autores, a hidrólise foi acelerada pelo aumento da atividade da catepsina-D. A maior hidrólise da fração α_{s1} -caseína observada por Cooney *et al.* (2000) no queijo obtido a partir de leite com CCS alta pode ser responsável pelos defeitos de textura relatados por alguns autores quando da fabricação de queijos a partir de leite com CCS alta (AULDIST *et al.*, 1996c; GRANDISSON e FORD, 1986; MITCHELL *et al.*, 1986b; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). De um modo geral, os defeitos de textura observados por estes autores através da avaliação sensorial dos queijos revelou que os queijos obtidos a partir de leite com CCS alta apresentaram-se mais moles, mais úmidos, menos elásticos. Todos os autores revelaram uma tendência de diminuição das notas de textura e de sabor dos produtos.

Auldist *et al.* (1996c) observaram que os queijos apresentavam sabor oxidado ou lipolítico, defeito que foi relacionado à concentração de ácidos graxos livres no leite.

Froeder Arcuri *et al.* (1990) avaliaram o efeito de diferentes níveis de células somáticas sobre a qualidade do queijo Prato. Após 22 dias de maturação, os queijos fabricados a partir de leite acima de 500.000 cél/mL apresentaram teor de umidade significativamente maior e depreciação da pontuação sensorial para o sabor.

3.5.2 Efeito sobre os outros produtos lácteos

Rogers e Mitchell (1989) estudaram o efeito da CCS sobre o leite pasteurizado, mas não conseguiram demonstrar um efeito significativo da CCS sobre a sua aceitabilidade sensorial. No entanto, Ma *et al.* (2000) relataram que o leite com CCS alta pasteurizado apresentou defeitos sensoriais (significativos) entre o 14^o e o 21^o dia de armazenamento, sendo que o leite de baixa contagem não apresentou mudanças da sua qualidade sensorial. Os defeitos encontrados foram sabor amargo e rancidez, que resultaram da atividade proteolítica e lipolítica mais intensa no leite com CCS alta. Segundo Santos *et al.* (2003a, b), a elevada CCS do leite resultou em diminuição da vida de prateleira do leite pasteurizado e afetou negativamente sua qualidade sensorial. Harwalkar *et al.* (1993) correlacionou a hidrólise da β -caseína pela plasmina e a liberação de γ -caseínas responsáveis pelo sabor adstringente do leite pasteurizado.

O efeito da CCS sobre a qualidade do leite UHT foi avaliado por Auld *et al.* (1996b) que observaram que o leite com CCS alta apresentou um menor tempo de gelificação, portanto uma diminuição da vida-de-prateleira quando comparado ao leite com CCS baixa.

Outros pesquisadores estudaram o efeito da CCS alta do leite na fabricação de iogurte. Rogers e Mitchell (1994) relataram que o aumento da CCS prejudicou as características sensoriais dos iogurtes desnatados. Munro *et al.* (1984) relataram que o iogurte obtido a partir de leite com CCS alta apresentou alteração de cor, caracterizada como levemente amarelo, mas outras características sensoriais não foram afetadas pela CCS. Entretanto, Oliveira *et al.* (2002) demonstraram um decréscimo na qualidade sensorial do iogurte após 20 dias de armazenamento resfriado, especialmente nos atributos consistência e sabor quanto se utilizou um leite com CCS > 800.000 cél/mL. Fernandes (2003) observou aumento de viscosidade do iogurte batido obtido a partir de leite com CCS > 800.000 cél/mL, após 10 dias de armazenamento. Também observou uma

correlação positiva entre a CCS e a concentração em ácidos graxos livres presentes no produto.

Alguns estudos correlacionaram o aumento da CCS do leite com a qualidade da manteiga. Segundo Munro *et al.* (1984) o leite com CCS alta afetou principalmente as características sensoriais da manteiga como a aroma e o sabor. Auldish e Hubble (1998) relataram que o aumento da CCS alterou a composição da manteiga e afetou o tempo de batidura, o qual foi maior. As propriedades sensoriais foram também prejudicadas e a manteiga sofreu uma deterioração mais rapidamente durante o armazenamento. Segundo Fonseca e Santos (2000), o menor tempo de vida-de-prateleira da manteiga é consequência da maior lipólise da gordura.

O efeito da CCS alta sobre a produção de leite em pó foi também avaliada. Rogers e Mitchell (1989) não observaram um efeito da CCS sobre a estabilidade térmica e a solubilidade do leite em pó, porém observaram alteração da composição e da acidez do produto, assim como, o aumento da reação de Maillard. Por outro lado, Auldish *et al.* (1996a) concluíram que o leite em pó com CCS alta teve uma menor estabilidade ao calor e as suas propriedades se deterioraram mais rapidamente em comparação a um leite em pó com CCS baixa, provavelmente devido à proteólise e lipólise mais intensas. Fonseca e Santos (2000) sugeriram que essa deterioração resulta da maior degradação enzimática da gordura.

Em relação as características de creme de leite com CCS elevada, Needs *et al.* (1988) mostraram que o aumento da CCS afetou negativamente as propriedade de bateção do creme. Além disso, Auldish e Hubble (1998) relataram que as células somáticas afetaram a capacidade do leite em formar espuma no caso do café capuccino.

3.6 O queijo Prato

O queijo Prato não tem sua origem na fabricação caseira como o queijo Minas. Sua obtenção é mais complexa e necessita de um maior controle do processo, notadamente na etapa do cozimento da massa. Seu surgimento relaciona-se, portanto, às primeiras produções em grande escala com finalidade comercial (OLIVEIRA, 1986). Vários queijos europeus foram introduzidos, sobretudo na década de 20, e o queijo Prato apareceu sob a influência dos imigrantes dinamarqueses e holandeses. O Prato é um queijo semelhante aos queijos dinamarqueses: Tybo, Elbo, Fynbo, Havarti e Danbo e ao queijo holandês Gouda. Entretanto, devido as condições climáticas tropicais, o processo de elaboração original foi adaptado considerando as tecnologias holandesas e dinamarquesas usadas para a fabricação do Gouda e do Danbo, respectivamente. Assim, surgiram as variedades de queijo Prato segundo as adaptações locais desenvolvidas (FURTADO e AMORIM, 2000).

Atualmente, o Prato é um queijo padronizado tecnologicamente cujos requisitos mínimos de qualidade são definidos pela legislação brasileira. Segundo a Portaria n° 358 de 4 de setembro de 1997 e o Regulamento técnico de 8 setembro de 1997 (BRASIL, 1997), por queijo Prato entende-se o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. A característica distinta do processo de elaboração é a obtenção de uma massa semicozida com a remoção parcial do soro, lavada com água quente, submetida a pré-prensagem, sob soro moldada, prensada, salgada e maturada. O queijo deve ser maturado por pelo menos 25 dias a uma temperatura não superior a 12°C. Esse tempo é necessário para adquirir suas características específicas.

O queijo Prato é classificado como um queijo gordo, de média umidade (BRASIL, 1997). Schiffan e Komatsu (1980) estudaram a composição do queijo

Prato consumido na cidade de São Paulo e observaram uma grande variabilidade dos produtos comercializados: 25,1 a 49,2% de umidade; 0,7 a 3,6% de sal; 2,1 a 5,3% de cinzas e 31,4 a 58,4 % de gordura no extrato seco. Segundo Oliveira (1986), o queijo Prato apresenta em media 40 % de umidade; 25,5% de proteína; 29% de gordura; 1,8% de lactose; 1,7% de sal; 2% de cinzas; e pH variando entre 5,3 e 5,5. Furtado e Lourenço Neto (1994) definem a composição média do queijo Prato da seguinte forma: 42-44 % de umidade; 26-29% de gordura; 1,6-1,9% de sal. Após 10 dias de maturação, Spadoti *et al.*(2004) obteve um queijo Prato com 45,11% de umidade; 25,30% de gordura; 18,2 % de proteína total e 1,85% de sal. Cichoscki *et al.* (2002) analisaram a composição mineral do queijo Prato e apresentaram os valores médios em grama por quilo de sólidos: cálcio (14,35, fósforo (8,9), sódio (6,92), potássio (1,12), magnésio (0,55), zinco (36,60), ferro (3,34), cobre (0,64) e manganês (0,36).

Do ponto de vista sensorial, o produto apresenta odor e sabor característico, cor amarela ou amarelo-palha, consistência semi-dura e elástica. Sua textura é compacta, lisa e fechada, mas pode possuir algumas olhaduras pequenas bem distribuídas. O queijo deve se apresentar sem crosta ou com uma crosta fina, lisa sem trincas. Com a denominação “Queijo Prato” poderão ser encontrados os seguintes produtos: “Queijo Prato Lanche ou Sandwich” (paralelepípedo de seção transversal retangular), “Queijo Prato Cobocó” (cilíndrico), “Queijo Prato Esférico ou Bola” (esférico). O peso varia de 0,4 a 5 kg de acordo com a variedade correspondente (BRASIL, 1997). A variedade lanche é a mais comercializada, já que o Prato é geralmente utilizado por sua boa fatiabilidade.

3.7 Maturação e proteólise do queijo Prato

A maturação do queijo é o período durante o qual ocorrem modificações dos seus componentes que se traduz pela melhoria das propriedades sensoriais

características de cada variedades. Os três eventos enzimáticos responsáveis pela maturação são a proteólise, a lipólise e a glicólise (FOX, 1993). As reações primárias dizem respeito a hidrólise das macromoléculas tais como: proteínas, gordura e lactose em compostos menores que são peptídios, ácidos graxos livres e ácido láctico, respectivamente (FOX *et al.*, 2000, WALSTRA *et al.* 2000). As reações secundárias permitem a degradação dos produtos gerados pelas reações primárias em moléculas mais simples. As enzimas envolvidas na maturação são numerosas: coalho residual, enzimas endógenas do leite como a plasmina e as enzimas liberadas pelo fermento láctico e pelos microorganismos contaminantes (FOX, 1993; FOX,1989).

Dentre os três eventos da maturação, a proteólise é a mais importante (FOX, 1989). Ela contribui para o desenvolvimento do aroma e sabor característicos e para a redução da firmeza do produto, que se traduz pelo seu amaciamento. Na verdade, o queijo recentemente fabricado apresenta uma textura borrachenta que é amaciada principalmente durante os quinze primeiros dias de maturação. Segundo Gerrard (2002), as propriedades de textura dos alimentos depende da matriz tridimensional conferida pelo estado das ligações proteína-proteína que sofrem proteólise. Gorostiza *et al.* (2004) observaram que a hidrólise da α_{s1} - e β -caseína foram similares em vários queijos e que a α_{s1} -caseína foi hidrolisada mais extensivamente (65%) que a β -caseína (20%). Essa degradação é o resultado da ação do coalho residual e da plasmina. E o resultado da hidrólise da ligação Phe24 e Val25 da α_{s1} -caseína, tem-se a formação da α_{s1} -I-caseína. Essa quebra específica é responsável pela diminuição da firmeza que ocorre no estágio inicial da maturação dos queijos (CREAMER e OLSON, 1982).

Durante a maturação, Schultz (2003) e Spadoti (2003) observaram a diminuição da firmeza do queijo Prato. Schultz (2003) correlacionou esta redução de firmeza com a degradação progressivas da matriz protéica pela hidrólise da α_{s1} -caseína com a conseqüente formação da α_{s1} -I-caseína através do perfil eletroforético do queijo Prato durante 42 dias de maturação.

Para os queijos, a proteólise é amplamente usada para avaliar a evolução da maturação. Dois índices são calculados a partir da quantificação das frações nitrogenadas pelo método de Kjeldahl. O primeiro é o índice de extensão de maturação (IEM), que reflete a proporção de grandes peptídeos produzidos pela proteólise primária. A sua determinação analítica é feita após a precipitação isoelétrica da caseína em pH 4,6. O índice de extensão de maturação é calculado a partir da porcentagem do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 em relação ao nitrogênio total. O segundo é o índice de profundidade de maturação (IPM), definido segundo a proporção de moléculas menores geradas pela proteólise secundária. Após a precipitação das proteínas em TCA 12%, o índice de profundidade de maturação é calculado a partir da porcentagem do teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% em relação ao nitrogênio total (WALSTRA *et al.*, 2000).

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Procedimento geral

A Figura 4 apresenta o fluxograma geral do procedimento utilizado neste trabalho.

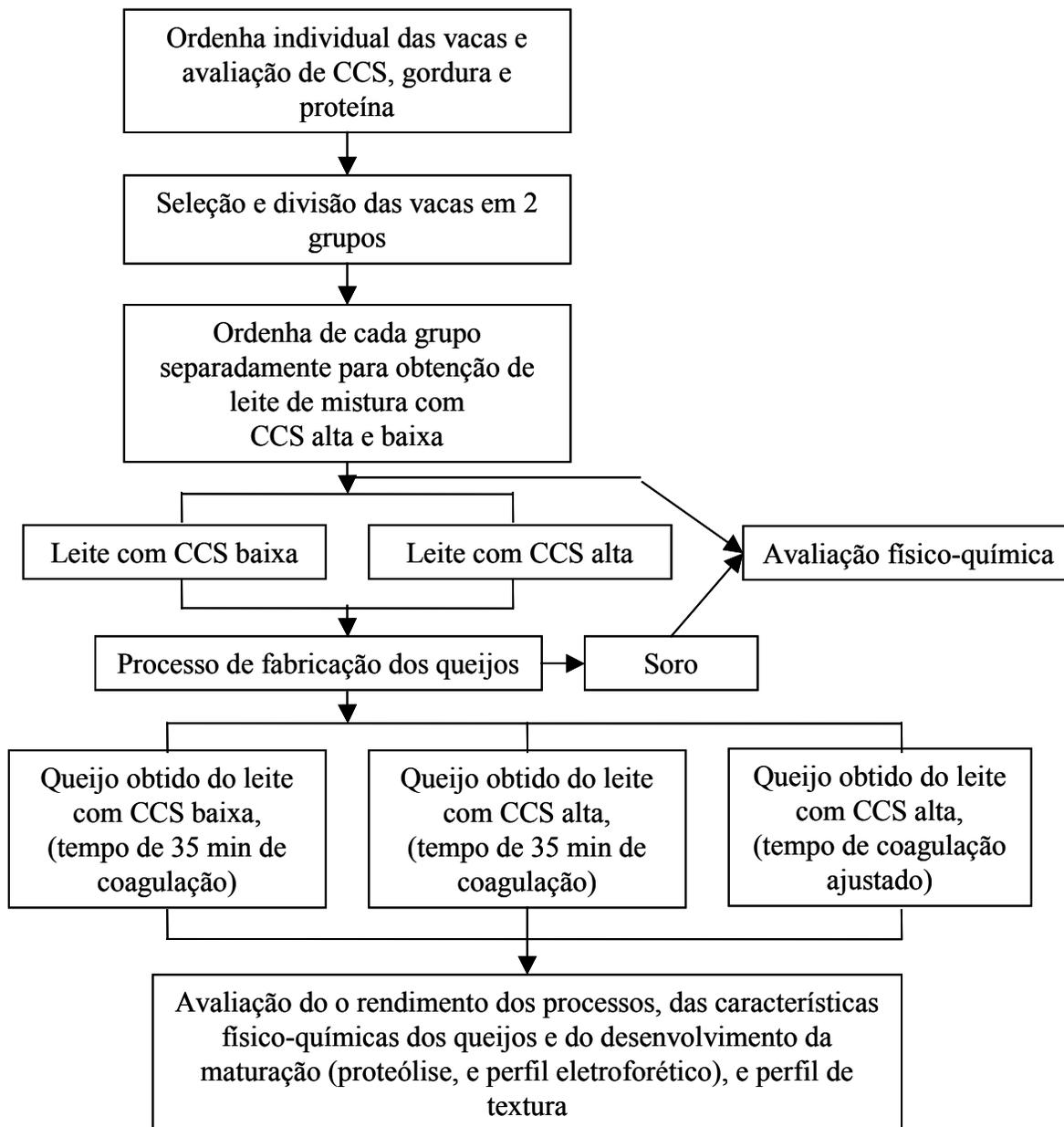


Figura 4: Fluxograma geral do trabalho desenvolvido.

O trabalho desenvolvido constituiu-se, resumidamente, na obtenção de leite com CCS alta e baixa, fabricação do queijo Prato e controle do processo, assim como as determinações analíticas dos leites, soros e dos queijos. A avaliação da maturação dos queijos foi conduzida após 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias de armazenamento a 12°C. O experimento completo foi repetido três vezes com um intervalo de 45 dias entre cada repetição.

4.2 Seleção das vacas e coleta do leite

O leite utilizado foi fornecido pela Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga – Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ USP. O rebanho é constituído atualmente por 45 vacas leiteiras de raça holandesa com uma produção diária média de 900 litros de leite.

Foram inicialmente selecionadas aproximadamente 40 vacas que apresentavam-se em estágio intermediário de lactação e que não tinham sido submetidas ao tratamento com antibióticos nos últimos sete dias. Os animais foram ordenhados individualmente de forma a verificar a produção leiteira e coletar amostra para a determinação da contagem de células somáticas e da composição físico-química do leite de cada animal. As amostras foram analisadas no Laboratório de Fisiologia da Lactação / Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), em Piracicaba/SP. A contagem de células somáticas foi efetuada por espectrofotometria infravermelha através do contador eletrônico de células somáticas (Bentley®).

Com base nos resultados de CCS, gordura, proteína determinadas por espectrofotometria infravermelha, e produção leiteira, formou-se dois grupos de aproximadamente 10 animais, com teores de gordura e proteínas similares entre si. O primeiro grupo foi constituído de vacas que forneceram leite com CCS baixa (< 200.000 cél./mL) e o segundo de vacas com leite de alta contagem (> 600.000

cél./mL). O anexo 1 apresenta um exemplo de dados completos para a seleção das vacas e a constituição dos grupos.

Para obtenção dos leites necessários ao experimento, cada grupo foi ordenhado separadamente. Os leites de CCS baixa e alta foram obtidos através da mistura dos leites dos animais do mesmo grupo, de acordo com os volumes produzidos, CCS, teores de gordura e proteína de cada leite. Após a ordenha, os leites foram imediatamente resfriados em banho de gelo sob agitação contínua e armazenados em câmara fria a 4°C. A temperatura de resfriamento era atingida após 30 minutos da ordenha. Uma amostra de cada leite de mistura foi coletada para a determinação da CCS e da composição físico-química do leite a ser processado.

O leite resfriado foi transportado para planta piloto da Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp. Para cada dia de processamento utilizou-se 50 litros de leite com CCS baixa e 100 litros de leite com CCS alta. Após a recepção, os leites foram pasteurizados (68°C/2 minutos), resfriados (4°C) em tanque de pasteurização, em batelada, com sistema de aquecimento e resfriamento, e foram armazenados em câmara de resfriamento na mesma temperatura para serem processados no dia seguinte.

4.3 Determinação de quantidade de coalho e do tempo de coagulação ajustado

Utilizou-se uma amostra do leite com CCS baixa para calcular a quantidade de coalho necessária para sua coagulação em 35 minutos. Simultaneamente, determinou-se a força do coalho para a amostra de leite com CCS alta. A partir da quantidade de coalho pré-determinada para o leite com CCS baixa e a força do coalho com leite com CCS alta, determinou-se o tempo de coagulação ajustado do leite com CCS alta para atingir o ponto de corte. Como mostram as etapas 1 e 2 a seguir, para cada dia de experimento fabricou-se três lotes de queijos, com os

seguintes tratamentos: (1) queijo Prato a partir de leite com CCS baixa e quantidade de coalho para se obter a coagulação em 35 minutos (queijo CCS-B), (2) queijo Prato a partir de leite com CCS alta, utilizando-se a mesma quantidade de coalho e corte após 35 minutos de coagulação (Queijo CCS-A) e (3) queijo Prato a partir de leite com CCS alta, utilizando-se a mesma quantidade de coalho e tempo de corte ajustado para leite com CCS alta (Queijo CCS-A,aj). O ajuste do tempo de coagulação foi feito para permitir a comparação do rendimento e características dos produtos utilizando-se uma prática comum na indústria, que é o ajuste do tempo de coagulação às características do leite recebido diariamente, baseado na prática do queijeiro.

O exemplo seguinte apresenta o cálculo da quantidade de coalho para coagulação do leite com CCS baixa em 35 minutos e do tempo ajustado a ser aplicado no terceiro tratamento:

Etapa 1: Determinação da quantidade de coalho para coagular o leite com CCS baixa (leite CCS-B) em 35 minutos (= 2100 segundos):

- Em uma vasilha de inox em banho Maria (35°C) colocou-se 1 litro de leite CCS-B e 1 grama de coalho.
- Determinou-se o tempo de coagulação que foi de 6 minutos e 14 segundos (= 374 segundos).

Coalho (gramas)	Leite CCS-B (litro)	Tempo (segundos)
1	1	374
1	Y	2100
X	50	2100

Onde **Y** = quantidade de leite (L) coagulado por 1 grama de coalho em 35 minutos, **X** = quantidade de coalho (g) necessária para coagular 50 litros de leite CCS-B em 35 minutos.

$$Y = 2100 \times 1 / 374 = 5,6 \text{ L}$$

1 grama de coalho permite a coagulação de 5,6 litros de leite CCS-B em 2100 segundos.

$$X = 1 \times 50 / Y = 50 / 5,6 = 8,9 \text{ g}$$

8,9 gramas de coalho são necessários para coagular 50 litros de leite com CCS baixa em 35 minutos.

Etapa 2: Determinação do tempo de coagulação ajustado: tempo necessário para a mesma quantidade de coalho coagular o leite com CCS alta (leite CCS-A) :

- Em uma vasilha de inox em banho Maria (35°C) colocou-se 1 litro de leite CCS-A e 1 grama de coalho.
- Determinou-se o tempo de coagulação que foi de 7 minutos e 50 segundos (= 470 segundos).

Coalho (gramas)	Leite CCS-A (litro)	Tempo (segundos)
1	1	470
1	Y	T
X = 8,9	50	T

Onde **Y** = quantidade de leite (L) coagulado por 1 grama de coalho, **X** = quantidade de coalho (g) utilizada para coagular 50 litros de leite CCS-A, **T** = tempo de coagulação ajustado (segundos) ou seja tempo necessário para a mesma quantidade de coalho coagular 50 litros de leite CCS-A.

Para a coagulação de 50 litros de leite CCS-A utiliza-se a mesma quantidade de coalho que para 50 litros de leite CCS-B. Considerando que **X** = 8,9 gramas:

$$Y = 50 \times 1 / 8,9 = 5,6$$

1 grama de coalho é utilizado para coagular 5,6 litros de leite CCS-A.

$T = Y \times 470 / 1 = 5,6 \times 470 = 2632$ segundos = 43 minutos e 52 segundos.

1 grama de coalho permite a coagulação de 5,6 litros de leite CCS-A em 43 minutos e 52 segundos.

Portando, 8,9 gramas de coalho permitem a coagulação de 50 litros de leites CCS-A em 43 minutos e 52 segundos o que é definido como o tempo ajustado de coagulação para a obtenção do queijo CCS-A,aj.

4.4 Processo de fabricação do queijo Prato

Os queijos foram fabricados em tanque de aço inox tipo queijomatic com aquecimento indireto de acordo com processo tradicional conforme descrito por OLIVEIRA (1986). O leite pasteurizado foi aquecido a 35°C e adicionado de cloreto de cálcio (250ppm), corante urucum (80ppm), fermento láctico mesofílico tipo O (1%) (Wisby-Visbyvac® LC-MIX F0 2 01, composto de *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, Danisco Brasil Ltda) e coalho (em pó HA-LA GIN:612619, composto de quimosina e pepsina bovina, Christian Hansen) na quantidade calculada. Após 35 minutos para o queijos CCS-B e o queijo CCS-A e após o tempo de coagulação ajustado para queijo CCS-A,aj, o gel formado foi cortado e a mistura soro/coágulo passou pelo procedimento usual de fabricação envolvendo as etapas de agitação (20 minutos), dessoragem parcial, que consistiu em retirar 30% do soro, em relação ao volume inicial de leite, lavagem e cozimento da massa através da reposição de cerca de 30% de água a 80°C de modo a aumentar a temperatura da mistura coágulo/soro de 1°C a cada 3 minutos, até que se atingisse 42°C. Após se atingir o ponto de massa, foi feita a dessoragem, seguida de pré-prensagem da massa no tanque. A massa foi colocada em formas de 0,5kg e prensada. A prensagem se deu em quatro etapas, da seguinte forma: 1ª prensagem - 9kg durante 30 minutos; 2ª prensagem - 12kg durante 30 minutos; 3ª prensagem - 15kg por 2 horas; 4ª prensagem - 15 kg durante 2 horas. Após a prensagem, os queijos foram salgados por imersão em salmoura com 20% de sal durante 12 horas. Em seguida, os queijos foram secos

por 24 horas a 10°C, embalados em plástico termo-encolhível e armazenados a 12°C durante 40 dias.

4.5 Análises realizadas

4.5.1 Análises das amostras individuais do leite para separação dos animais

Imediatamente após a ordenha, amostras de leite de cada animal foram coletadas para determinação da CCS e a composição físico-química. Estes resultados serviram de base para a separação de dois grupos de animais que foram ordenhados para fornecerem leite com CCS baixa e alta.

4.5.2 Controle do pH durante o processo

O pH foi avaliado durante o processo de fabricação dos queijos nas seguintes etapas: corte, primeira dessora, final do aquecimento e segunda dessora.

4.5.3 Análise do leite com CCS alta e baixa

O leite recepcionado no Departamento de Tecnologia de Alimentos/FEA-UNICAMP foi pesado e coletou-se amostras em frasco de vidro para as determinações analíticas. Foram efetuadas as seguintes análises do leite: pH, acidez, gordura, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%, lactose, cinzas e cálcio. Avaliou-se também o perfil eletroforético dos leites, assim como a análise quantitativa da suas bandas por densitometria.

4.5.4 Análise do soro obtido

Durante os processos, o soro obtido foi pesado e foram coletadas amostras em frascos de vidro que foram resfriados para as determinações analíticas futuras. Foram efetuadas as seguintes análises do soro: pH, acidez, gordura, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%, lactose, cinzas e cálcio. Avaliou-se também o perfil eletroforético dos soros, assim como a análise quantitativa da suas bandas por densitometria.

4.5.5 Análise do queijo

Após a fabricação, amostras de queijo foram aleatoriamente escolhidas para a realização das análises tanto para obtenção da composição após 5 dias de fabricação, quanto a avaliação da maturação.

As determinações analíticas do queijo após o processo foram: pH, acidez, gorduras, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%, cinzas, sal e cálcio.

O acompanhamento da maturação foi conduzido após 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias armazenamento a 12°C. A proteólise foi avaliada através dos índices de extensão e de profundidade de maturação a partir da quantificação das frações nitrogenadas (nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%) e do perfil eletroforético. A avaliação do perfil de textura foi utilizada para a determinação da firmeza, elasticidade e coesividade dos queijos. Durante esse período foi também avaliado o pH e o extrato seco total dos queijos.

4.5.6 Determinação analítica

As determinações analíticas foram feitas em triplicata, de acordo com as seguintes metodologias:

pH: foi determinado utilizando-se potenciômetro calibrado e eletrodo introduzido diretamente nas amostras.

Acidez titulável: foi determinada através da titulação com hidróxido de sódio N/9 e solução indicadora fenolftaleína, de acordo com AOAC (1995).

Extrato seco total (EST): foi determinado por secagem em estufa a 105°C de acordo com AOAC (1995).

Gordura: foi determinada pelo método de Gerber para leite e queijo, de acordo com British Standart Institution (1989) e pelo método de Mojonnier para o soro, de acordo com AOAC (1995).

Nitrogênio total (NT): foi determinado através do método semi-micro-Kjeldahl para o leite e soro, e através do método macro-Kjeldahl para o queijo, de acordo com AOAC (1995). O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38.

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC): foi determinado através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação ao ponto isoelétrico, pelo método micro-Kjeldahl para leite e soro e macro-Kjeldahl para queijo, de acordo com AOAC (1995).

Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP): foi determinado através do nitrogênio solúvel no sobrenadante após a precipitação com TCA 12%, pelo método micro-Kjeldahl para leite e soro e macro-Kjeldahl para queijo, de acordo com AOAC (1995).

Lactose: foi determinado segundo LANARA (1981)

Índice de extensão de maturação (IEM): foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{IEM} = (\text{Nitrogênio solúvel em pH 4,6} / \text{Nitrogênio total}) \times 100$$

Índice de profundidade de maturação (IPM): foi calculado pela fórmula seguinte:

IPM = (Nitrogênio solúvel em TCA12% / Nitrogênio total) x 100

Cinzas: foi determinada por incineração em mufla a 550°C, de acordo com AOAC (1995).

Teor de sal do queijo: foi determinado pelo método Volhard de acordo com Richardson (1985).

Cálcio: Esta determinação foi terceirizada e realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos. Amostras foram preparados após incineração do queijo e do leite, segundo o método adaptado de Horwitz (2000), e hidrólise ácida do soro de acordo com o método adaptado de Slavin *et al.* (1975). Para a quantificação do cálcio foi utilizado um espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado. O equipamento foi um ICP-OES modelo ICP BAIRD 2000.

4.5.7 Avaliação do perfil eletroforético dos leites, dos soros e dos queijos

Amostras com 0,4% de proteína foram preparadas a partir de leite, soro e queijo liofilizados e após a quantificação do nitrogênio total através do método macro-Kjeldahl.

As amostras de leite e soro foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970) e Svati e Panijpan (1977). O gel de concentração e de separação foram constituídos de 4% e 15% de poliacrilamida, respectivamente. O padrão utilizado foi o Sigma M3913-1VL.

As amostras de queijos com 5, 26 e 40 dias de armazenamento a 12°C foram analisadas por eletroforese Urea-PAGE de acordo com o método de Andrews (1983a) com 4% e 9% de poliacrilamida no gel de concentração e de separação, respectivamente.

A migração foi efetuada em uma unidade vertical Mini Protean III xi (Bio-Rad) sob tensão elétrica de 120V. A revelações das bandas foram feita por

imersão do gel SDS-PAGE em Comassie brilhante G-250, e por imersão do gel Urea-PAGE em Brilliant Blue Coloidal G, seguindo metodologia descrita por Blakesley e Boezi (1977).

A análise de densidade foi realizada por um densitômetro BIO-RAD Model GS-700 que utiliza o programa de análise de imagem Molecular Analyst/PC Densitometrie (version 1.5) para a determinação da densidade ótica (DO).

A avaliação do perfil eletroforético dos leites, dos soros e dos queijos foi feita apenas para o primeiro processo.

4.5.8 Avaliação do perfil de textura dos queijos

A avaliação do perfil de textura foi feita para os queijos com 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias de armazenamento a 12°C.

Para a avaliação da textura, 10 replicações de amostras foram preparadas na forma de cilindros de queijos de 2 cm de diâmetro e 2,4 cm de altura, que foram embalados em filmes de plástico e deixados em banho-maria a 10°C por aproximadamente 4 horas para estabilizar a temperatura. A determinação do perfil de textura foi realizada utilizando-se texturômetro Universal TAXT2 SMS-Stable Micro Systems e uma sonda cilíndrica P35 de alumínio com 35 mm de diâmetro. Foram feitas duas compressões sucessivas até atingir 50% da altura original da amostra com velocidade de 1 mm/s. Determinou-se firmeza, elasticidade e coesividade segundo Bourne (1978).

4.5.9 Determinação da recuperação dos constituintes do leite e do rendimento dos processos

Realizado conforme descrito por Furtado e Wolfschoon Pombo (1978, 1979) a recuperação dos constituintes foi baseada na composição físico-química

do leite, soro e queijo. A recuperação representa a porcentagem de constituintes, tal como gordura, proteína ou lactose, presente inicialmente no leite e repartido entre o queijo e o soro.

Por exemplo: 50 kg de leite com 3,0% de proteína foram processados. 5 kg de queijo com 22,5% de proteína e 60 kg de soro (incluindo a água adicionada) com 0,6% de proteína foram obtidos.

Proteína presente no leite: $50 \times 3,0\% = 1,5 \text{ kg}$

Proteína presente no queijo: $5 \times 22,5\% = 1,125 \text{ kg}$

Proteína presente no soro: $60 \times 0,6\% = 0,36 \text{ kg}$

Calculo da recuperação da proteína do leite para:

O queijo: $1,125 \times 100 / 1,50 = 75\%$

O soro: $0,36 \times 100 / 1,50 = 24\%$

No presente estudo, a recuperação foi calculada para a gordura e proteína do leite para o queijo e para o soro. A recuperação da lactose do leite para o soro foi calculada e a sua recuperação para o queijo foi obtida por diferença.

A avaliação do rendimento foi realizado conforme Lucey e Kelly (1994) . O rendimento foi determinado considerando o peso de leite processado e o peso de queijo obtido depois a secagem. O rendimento foi calculado e expresso da seguinte forma:

- Rendimento (R) com base peso do queijo obtido por peso de leite:

$$R = \frac{\text{peso de queijo}}{\text{peso de leite}} \times 100$$

- Rendimento ajustado (Raj) ao teor de umidade e de sal conforme descrito por Spadoti (2003):

$$Raj = R \times \frac{100 - (\% \text{ umidade real} + \% \text{ sal real})}{100 - (\% \text{ umidade desejada} + \% \text{ sal desejada})}$$

onde:

% umidade real = % umidade do queijo

% de sal = % de sal do queijo

% umidade desejada= 42 %

% sal desejada= 1,6 %

- Rendimento em base seca (Rbs) conforme descrito por Gigante (1991):

$$Rbs = \frac{\text{Peso de queijo} \times \% \text{ solidos do queijo}}{\text{Peso de leite} \times \% \text{ solidos do leite}} \times 100$$

4.6 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito da CCS sobre a composição do leite, o delineamento experimental utilizado foi em blocos completamente aleatorizados com um único fator. Onde o fator principal foi a CCS possuindo dois níveis (baixa e alta) e os processos foram considerados como blocos (processo 1, 2 e 3). Tal delineamento teve o propósito de averiguar, independentemente do processo, o efeito da CCS sobre as características analisadas.

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a composição do queijo e do soro, a recuperação e o rendimento o delineamento experimental utilizado foi em blocos completamente aleatorizados com um único fator. O fator principal foi o

tratamento possuindo três níveis de variação (queijo CCS-B, queijo CCS-A e queijo CCS-A,aj). Os processos foram considerados como blocos (processo 1, 2 e 3). Tal delineamento teve o propósito de averiguar, independentemente do processo, o efeito do tratamento sobre as características analisadas.

Para avaliar o efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamentoXtempo ao longo da maturação, o delineamento experimental utilizado foi em blocos completamente aleatorizados com dois fatores. Os fatores principais foram o tratamento, com três níveis de variação (queijo CCS-B, queijo CCS-A e queijo CCS-A,aj) e o tempo, com seis níveis de variação (5, 12, 19, 26, 33, 40 dias após a fabricação). Tal delineamento teve o propósito de averiguar, independentemente do processo, o efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamentoXtempo sobre as características analisadas.

A partir dos delineamentos, as respostas foram analisadas por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de comparação entre médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. Foram realizadas três repetições completas do experimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de células somáticas

A Tabela 5.1 apresenta os resultados das análises de contagem de células somáticas do leite de mistura utilizado para a fabricação do queijo Prato em cada processo, assim como a média e o desvio padrão das repetições para o leite com CCS baixa e alta.

Tabela 5.1 Contagem de células somáticas do leite.

Processo	Leite CCS-B (cél/mL)	Leite CCS-A (cél/mL)
Processo 1	153.000	779.000
Processo 2	186.000	976.000
Processo 3	170.000	631.000
Media	169.667	795.333
Desvio padrão	16.503	173.079

O leite referido como de baixa contagem de células somáticas apresentou em média 169.667 cél/mL, o que permitiu trabalhar numa faixa variando de 150.000 até 200.000 cél/mL. Segundo Hardning (1999) e Harmon (1994), esses níveis inferiores à 200.000 cél/mL são representativos de leite obtido a partir de vacas sadias, cujas células são, sobretudo, provenientes da descamação natural do epitélio da glândula mamária (KITCHEN, 1981). Considerando-se o bom estado sanitário dos úberes e a utilização de boas práticas para o manejo do rebanho durante o período do experimento, observa-se que essas contagens apresentaram pouca variabilidade entre si (> 16.500 cél/mL).

O leite com alta contagem de células somáticas apresentou em média 795.333 cél/mL, o que permitiu trabalhar numa faixa variando de 600.000 até 1.000.000 cél/mL. Esses níveis são representativos de leite obtido a partir de vacas com mastite subclínica cujas células representaram principalmente os glóbulos brancos, assim como as células provenientes da destruição do epitélio da glândula mamária pelos patógenos (KITCHEN, 1981). É importante notar que os leites de CCS alta apresentaram uma grande variabilidade entre si (> 173.000 cél/mL).

O procedimento de obtenção dos leites utilizados nos experimentos é o mesmo para CCS baixa e alta. O procedimento leva aproximadamente 10 dias, incluindo a coleta individual, o envio de amostra para análise, o recebimento do resultado, a separação dos animais, a ordenha e o transporte. Esse tempo é relativamente longo, mas necessário. Este período pode permitir a evolução ou a retração do quadro de mastite do quarto especialmente por se tratar de um quadro de mastite subclínica, o que justifica portando uma variação da contagem celular entre o dia da seleção de animais até o dia do processo. Além disso, a mastite não é um evento natural e ela depende de vários fatores como tipo de infecção, estação do ano, período de lactação, genética (FONSECA e SANTOS, 2000). Conseqüentemente é difícil controlar uma mastite e portanto, é impossível manter uma pequena variabilidade da contagem entre os processos para a obtenção de leite com CCS alta. Isto explica a grande diferença entre os leites com CCS alta para cada repetição realizada no experimento.

A despeito da variabilidade apresentada foram obtidos dois grupos de matérias-primas com valores distintos para a CCS que podem, em média, caracterizar leites com menos de 200 000 cél/mL e com mais de 600 000 cél/mL. Além disso, todos os níveis utilizados respeitaram os limites definidos pela nova legislação brasileira a ser aplicada a partir de 2005 através da IN 51/2002 (BRASIL, 2002).

5.2 Efeito da CCS sobre a composição do leite

A Tabela 5.2 apresenta a composição química média e o desvio padrão dos leites destinados à fabricação do queijo Prato.

Tabela 5.2 Composição química média e desvio padrão dos leites (n=3).

Composição química	Leite CCS-B ⁽¹⁾	Leite CCS-A ⁽²⁾
PH	6,8 ^a ± 0,1	6,99 ^a ± 0,09
Extrato seco total (%)	11,6 ^a ± 0,8	12,1 ^a ± 0,3
Gordura (%)	3,5 ^a ± 0,5	3,8 ^a ± 0,2
Proteína total (%)	2,8 ^a ± 0,2	3,3 ^a ± 0,2
- Proteína verdadeira*	95,2 ^a ± 0,2	93,7 ^b ± 0,2
- Caseína*	77,2 ^a ± 0,6	69 ^a ± 4
- Proteína de soro*	18 ^a ± 0,4	24 ^a ± 4
- Nitrogênio não protéico*	4,8 ^b ± 0,2	6,3 ^a ± 0,2
Lactose (%)	4,4 ^a ± 0,1	4,3 ^a ± 0,1
Cinza (%)	0,70 ^a ± 0,04	0,72 ^a ± 0,02
Cálcio (mg/ 100mL)	106 ^a ± 3	100 ^a ± 7

Valores com mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

⁽¹⁾ Leite com CCS baixa (< 200.000 cél/mL)

⁽²⁾ Leite com CCS alta (> 600 000 cél/mL)

* como porcentagem da proteína total: proteína verdadeira = (NT-NNP)x6,38; caseína = (NT-NNC)x6,38; proteína de soro= proteína verdadeira - caseína.

Observa-se que a CCS não afetou significativamente a maioria dos constituintes do leite, exceto para os teores de proteína verdadeira ($p=0,0157$) e o nitrogênio não protéico (NNP) ($p=0,0157$), o que foram significativamente afetados pela CCS, sendo que o leite com CCS alta apresentou menor teor de proteína verdadeira e maior teor de NNP. Para estes níveis de células somáticas, um aumento da relação nitrogênio não caseíco/nitrogênio total foi também observado

por Cooney *et al.* (2000), Rogers (1987), Rogers *et al.* (1989a), o que pode refletir uma elevação da taxa em nitrogênio não protéico. Segundo Barry e Donnelly (1981) esse aumento se deve a proteólise inicial, dentro do úbere, a qual resulta da elevada concentração da plasmina, assim como da sua atividade, no leite mastítico o que foi constatado por Urech *et al.* (1999) no caso de mastite subclínica, e que já foi descrito por O'Brien *et al.* (2001) e Le Roux *et al.* (1995) para níveis de 300.000 cél/mL e 250.000 cél/mL, respectivamente. Segundo Verdi e Barbano (1991a), a ação proteolítica da plasmina é favorecida pelos ativadores liberados pelos glóbulos brancos e segundo Bastian e Brown (1996) pelo aumento do pH.

Embora a CCS não tenha afetado significativamente o pH ($p=0,3234$) e os teores de caseína ($p=0,0637$), proteínas do soro ($p=0,0920$), de gordura ($p=0,3559$), de cinzas ($p=0,4415$), de lactose ($p=0,4188$) e de cálcio ($p=0,4230$) do leite, os resultados apresentam variações características que devem ser consideradas. O leite com CCS alta apresentou maior variabilidade para as porcentagens de caseína e proteínas do soro quando comparado ao leite com CCS baixa. A maior variabilidade nas concentrações dos constituintes do leite com CCS alta foi também observada por Machado *et al.* (2000) que avaliou a composição do leite de rebanhos brasileiros, armazenados em tanques, distribuídos segundo sua contagem de células somáticas, no período de dezembro de 1996 a julho de 1998. Vários trabalhos mostraram também uma tendência à diminuição da relação caseínas/proteína total (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; ROGERS, 1987; ROGERS *et al.*, 1989a; VERDI *et al.*, 1987) e um aumento das proteínas séricas (ALI *et al.*, 1980; KITCHEN *et al.*, 1980; POLITIS *et al.*, 1989a; POUTREL *et al.*, 1983; ROGERS *et al.*, 1989a; SHUSTER *et al.*, 1991).

O leite com CCS maior apresentou tendência à elevação de pH, o que está de acordo com a literatura (GRANDISSON e FORD, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). Este aumento de pH pode favorecer a ação proteolítica (BASTIAN e BROWN, 1996) o que colaborou,

possivelmente, com o aumento significativo do teor de NNP observado neste trabalho e também por outros autores (COONEY *et al.*, 2000; ROGERS, 1987; ROGERS *et al.*, 1989a).

Além disso, o leite com CCS maior apresentou tendência ao aumento das concentrações de gordura, proteína total e cinzas, e à diminuição das concentrações de lactose e cálcio. Isto se traduziu pela tendência de aumento do teor de sólidos totais, principalmente ao aumento dos teores de gordura e proteína total o que foi também observado por Fernandes (2003).

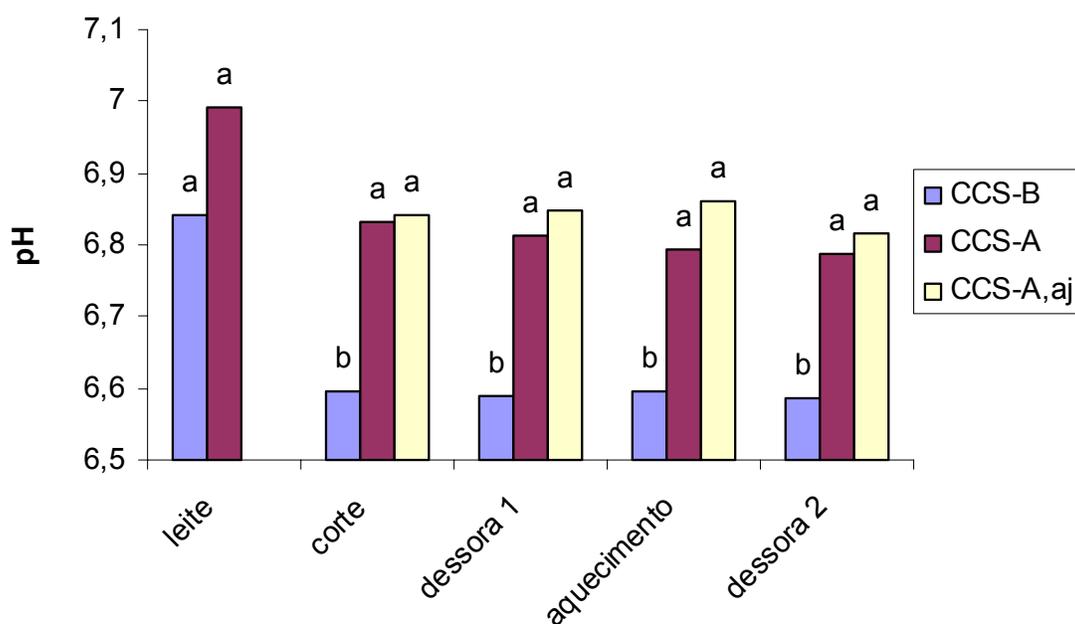
O aumento do teor de gordura, também observado por vários autores (COONEY *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2000; SHUSTER *et al.*, 1991), não é claramente explicado na literatura, entretanto, a análise de 4785 amostras de leite brasileiro realizado por Machado *et al.* (2000), classificado em 4 categorias de células somáticas (CCS < 500.000 cél/mL; 500.000 < CCS < 1.000.000 cél/mL; 1.000.000 < CCS < 1.500.000 cél/mL, CCS > 1.500.000 cél/mL) também verificou que o leite de tanques com CCS mais alta apresentou maiores porcentagens de gordura, sendo que este aumento foi significativo para tanques com contagem acima de 1.000.000 cél/mL.

As demais tendências de alterações (aumento de proteína total e redução de lactose e cálcio) são, possivelmente, devidas à alteração da permeabilidade da membrana da glândula mamária, o que permitiu a passagem de proteínas do sangue para o leite, o retorno da lactose para a circulação sanguínea (SHUSTER *et al.*, 1991) e a livre passagem dos minerais entre a luz alveolar e o sangue.

A tendência de diminuição do teor de cálcio se justifica, segundo Neville e Watters (1983), pela diminuição das micelas de caseína, às quais grande proporção do cálcio está ligado. Desta forma, assim como para os teores de caseína e proteína do soro, observa-se a maior variabilidade no teor de cálcio do leite com CCS alta quando comparado ao leite com CCS baixa.

5.3 Efeito do tratamento sobre o comportamento do pH e a composição do queijo e do soro

Os pH dos leites foram comparados entre si, assim como o pH dos queijos em cada etapa. A Figura 5.1 apresenta o pH do leite e o comportamento do pH durante a fabricação do queijo Prato para os diferentes tratamentos.



* Valores com mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa.

Figura 5.1 pH do leite e comportamento do pH do queijo Prato durante a fabricação (n=3).

Embora a CCS não tenha afetado significativamente o pH do leite, a tendência do maior pH com CCS alta foi mantida ao longo do processamento dos queijos. Observa-se na Figura 5.1 que o pH do queijo obtido com leite de CCS baixa diferiu significativamente do pH dos queijos obtidos com leite de CCS alta, os quais não diferiram entre si.

O comportamento do pH é um fator determinante no processo de fabricação de queijos, sendo que seu abaixamento reduz o tempo de coagulação e favorece a sinérese e a desmineralização da massa (FOX *et al.*, 2000).

Nestes experimentos o tempo de coagulação foi previamente determinado, entretanto, observa-se na Tabela 5.3, que apresenta a composição físico-química média (n=3) dos queijos, que os queijos obtidos a partir de leite com CCS alta (>pH), apresentaram uma tendência de serem mais úmido. A maior umidade dos queijos obtidos a partir de leite com CCS alta foi também observada por outros autores (AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; GRANDISSON e FORD, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). Paralelamente, os queijos de CCS alta apresentaram tendência de maior teor de sal, pois a umidade inicial facilitou, possivelmente, sua incorporação. No que diz respeito à desmineralização da massa, também é possível observar a tendência de menor teor de cinzas para o queijo de CCS baixa (<pH) quando comparado aos com CCS alta (>pH), especialmente sem o ajuste do tempo de coagulação, neste caso, refletindo a maior desmineralização da massa.

Cabe ressaltar que estas tendências discutidas têm um comportamento comum. Por exemplo, maior sinérese e conseqüentemente menor umidade do queijo foram observadas na seguinte ordem: queijo CCS-B < CCS-A,aj < CCS-A. O mesmo foi observado em relação ao teor de cinzas, proteína total e gordura. Isto corrobora com os resultados descrevendo que o aumento da CCS do leite é acompanhado de uma diminuição de sólidos totais e de proteínas no queijo (COONEY *et al.*, 2000; GRANDISSON e FORD, 1986; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a) e de gordura (BARBANO *et al.*, 1991; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987).

Tabela 5.3 Composição química média e desvio padrão dos queijos Prato (n=3).

Composição química	Queijo CCS-B	Queijo CCS-A	Queijo CCS-A,aj
PH	5,3 ^a ± 0,1	5,41 ^a ± 0,04	5,34 ^a ± 0,09
Umidade (%)	42,9 ^a ± 0,9	46 ^a ± 1	44,9 ^a ± 0,4
Gordura (%)	30 ^a ± 3	28,7 ^a ± 0,9	30 ^a ± 1
Proteína total (%)	23 ^a ± 1	21,4 ^a ± 0,8	22 ^a ± 1
Nitrogênio solúvel em pH 4,6	0,182 ^b ± 0,007	0,31 ^a ± 0,03	0,28 ^a ± 0,03
Nitrogênio solúvel em TCA 12%	0,069 ^b ± 0,008	0,113 ^a ± 0,007	0,10 ^a ± 0,02
Cinza (%)	3,8 ^a ± 0,3	4,03 ^a ± 0,06	3,9 ^a ± 0,1
Cálcio (mg/g)	750 ^a ± 69	751 ^a ± 36	752 ^a ± 55
Sal (%)	1,59 ^a ± 0,07	1,78 ^a ± 0,09	1,77 ^a ± 0,08
Sal na umidade	3,7 ^a ± 0,2	3,9 ^a ± 0,1	3,9 ^a ± 0,1

Valores com mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

No que diz respeito às frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6 e em TCA 12%, observou-se que suas porcentagens foram significativamente maiores nos queijos de CCS alta, e apresentaram a mesma tendência de serem maiores no queijo de CCS alta sem ajuste do tempo de coagulação. Este resultado pode refletir a maior quantidade de plasmina no leite CCS-A e sua maior atividade no mais alto pH (BASTIAN e BROWN, 1996) já que a plasmina e seus ativadores são incorporados no coágulo (FOX *et al.*, 2000) e participam da proteólise no queijo durante a maturação (KALIT *et al.*, 2002).

Em resumo, comparando-se o queijo CCS-A com o queijo CCS-A,aj, observou-se que o ajuste do tempo de coagulação permite a obtenção de um queijo que tende a ter composição mais próxima do queijo CCS-B, considerado como padrão. Estes dados sugerem que a prática utilizada pela indústria de ajustar o tempo de coagulação com base na qualidade do leite e experiência do

queijeiro, embora seja uma medida paliativa, pode, de fato, influenciar positivamente as características dos queijos obtidos.

A composição química média dos soros obtidos em cada processamento é apresentada na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Composição química média e desvio padrão dos soros (n=3).

Composição química	Soro CCS-B	Soro CCS-A	Soro CCS-A,aj
Extrato seco total (%)	5,6 ^a ± 0,2	5,5 ^a ± 0,2	5,6 ^a ± 0,1
Gordura (%)	0,6 ^a ± 0,1	0,8 ^a ± 0,3	0,7 ^a ± 0,2
Proteína total (%)	0,66 ^b ± 0,09	1,01 ^a ± 0,07	0,92 ^a ± 0,06
Nitrogênio solúvel em TCA 12%	0,13 ^c ± 0,02	0,20 ^a ± 0,02	0,19 ^b ± 0,02
Nitrogênio solúvel em pH 4,6	0,50 ^b ± 0,06	0,65 ^a ± 0,05	0,63 ^a ± 0,06
Lactose (%)	3,68 ^a ± 0,06	3,571 ^a ± 0,008	3,58 ^a ± 0,03
Cinza (%)	0,43 ^a ± 0,05	0,43 ^a ± 0,03	0,43 ^a ± 0,04
Cálcio (mg/ 100ml)	31 ^a ± 3	25 ^a ± 3	23 ^a ± 2

Valores com mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si (p ≤ 0,05).

Observa-se que a porcentagem de proteína total dos soros CCS-A é significativamente maior do que o soro do queijo CCS-B como mostrado por vários autores (BARBANO *et al.*, 1991; COONEY *et al.*, 2000; GRANDISSON e FORD, 1986; KLEI *et al.*, 1998; ; MATIOLI *et al.*, 2000; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). No que diz respeito ao nitrogênio solúvel em TCA 12%, observou-se que sua quantidade foi significativamente maior nos soros CCS-A com e sem ajuste do tempo de coagulação, do que no soro CCS-B. Além do mais, no que diz respeito ao nitrogênio solúvel em pH 4,6, observou-se que suas porcentagens foram significativamente maiores nos soros CCS-A do que no soro CCS-B, o que foi também observado por Rogers e Mitchell (1994) no soro quando usou-se leite com mais de 250.000 cél/mL. Estes valores refletem a maior recuperação para o soro

de NNP, que foi significativamente maior no leite CCS-A, e de proteínas séricas, que também apresentaram-se numa maior proporção no leite CCS-A. Esse conjunto de resultados pode justificar o aumento de proteínas totais nos soros CCS-A. No entanto, segundo Rogers (1987) e Rogers e Mitchell (1994) essa elevação pode também incluir as perdas em caseína e finos devidas à alteração da etapa de coagulação quando usa-se leite CCS-A caracterizado pelo maior pH .

Além disso, no mais alto pH pode ter havido a formação de uma matriz protéica mais frágil que propiciou a perda de finos para o soro (ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994). Esta maior fragilidade do gel pode ser também responsável pela tendência de maior perda de gordura observada para o soro dos queijos CCS-A,aj e queijos CCS-A, respectivamente (Tabela 5.4), como mostrado por Ali *et al.* (1980); Barbano *et al.* (1991); Matioli *et al.* (2000); Rogers (1987); Rogers e Mitchell (1994).

Os tratamentos não afetaram significativamente os teores de lactose ($p=0,0662$), cinzas ($p=0,6651$) e cálcio ($p=0,0585$) dos soros, entretanto, os resultados apresentam tendência de maior teor de lactose, cinzas e cálcio no soro do queijo com CCS baixa. Quanto à lactose, ela é solúvel na água e foi, possivelmente, incorporada mais facilmente aos queijos com maior teor de umidade (CCS-A,aj e CCS-A). Isto explicaria sua menor presença nos soros com CCS-A,aj e CCS-A. Quanto ao cálcio, sua maior concentração no soro do queijo de CCS-B, deveu-se, possivelmente, a maior desmineralização deste queijo, o qual apresentou pH significativamente menor (Figura 5.1) durante todo o processo de fabricação. Quanto ao teor de cinzas, os soros apresentaram concentração muito semelhante. Já que não há diferenças significativas entre o teor de cinzas dos queijos, conseqüentemente também não se observam diferenças significativas entre o teor de cinzas dos soros. Além disso, os queijos apresentaram teor de cinzas na seguinte ordem : queijo CCS-B < queijo CCS-A,aj < queijo CCS-A. Portanto, a tendência esperada para o teor de cinzas dos soros seria: soro CCS-B > soro CCS-A,aj > soro CCS-A. Essa tendência pode ter sido

mascarada pela diluição do soro com a água de lavagem da massa, assim pequenas diferenças entre componentes, presentes em pequenas concentrações, não puderam ser percebidas com o método usado.

5.4 Efeito do tratamento sobre a recuperação dos constituintes do leite para o queijo e para o soro

A Figura 5.2 apresenta a recuperação de proteína para o queijo e para o soro em cada tratamento.

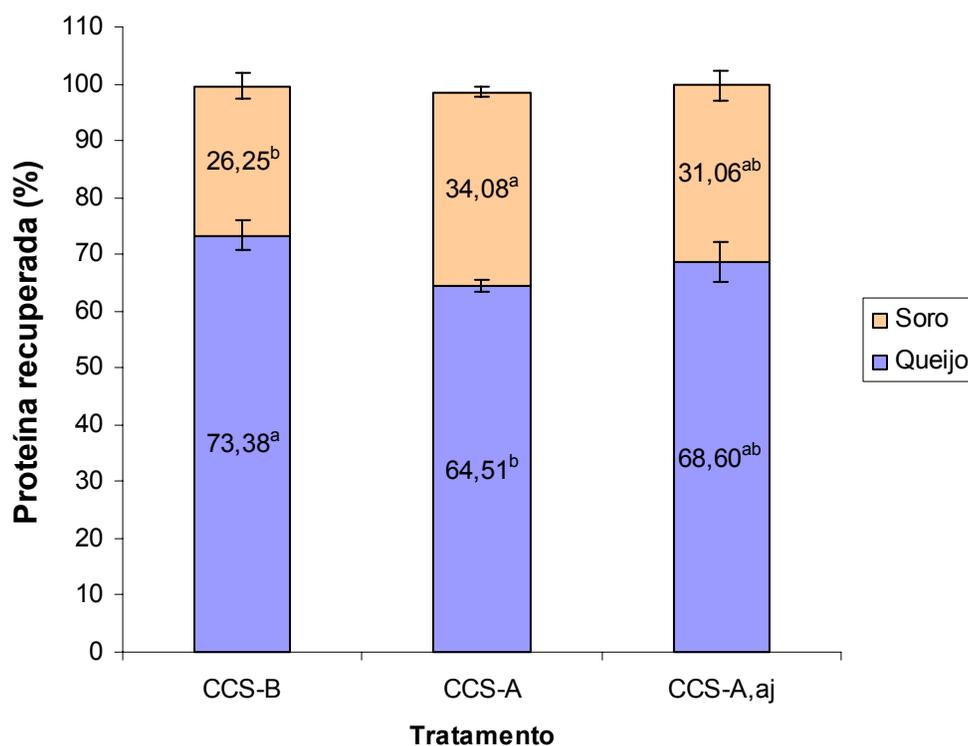


Figura 5.2: Recuperação de proteína para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).

A recuperação de proteína do leite para o queijo e para o soro foi significativamente afetada pelos tratamentos, sendo que foi maior para o queijo

CCS-B quando comparada ao queijo CCS-A sem ajuste do tempo de coagulação. Embora não exista diferença significativa entre os queijos CCS-A e CCS-A,aj, e entre o queijo CCS-B e queijo CCS-A,aj observa-se uma clara tendência de maior recuperação de proteína quando o tempo de coagulação foi ajustado. Estes resultados sugerem que no queijo com CCS alta e o mesmo tempo de coagulação que o queijo de CCS baixa, houve a formação de um coágulo mais frágil, favorecendo a perda de mais proteínas para o soro. Estes resultados são possivelmente decorrentes do maior pH e da proteólise mais intensa do leite CCS-A, o que dificulta a coagulação (POLITIS *et al.*, 1988b). Através da análise da microestrutura de géis obtidos com a adição de plasmina, Srinivasan e Lucey (2002) demonstraram que com o aumento do teor de plasmina resultou na obtenção de géis mais frágeis, com menos interações protéicas. Outros pesquisadores também observaram a maior recuperação de proteína para o queijo CCS-B quanto comparado ao queijo CCS-A (AULDIST *et al.*, 1996c ; BARBANO *et al.*, 1991).

No que diz respeito à gordura, observa-se na Figura 5.3 que não existiu diferença significativa na sua recuperação para o queijo e para o soro entre os tratamentos. Neste caso, o ajuste do tempo de coagulação para o leite CCS-A apresentou uma tendência de maior retenção de gordura. A gordura é o componente de maior variação no leite, mesmo em animais sadios (FOX e McSWEENEY, 1998). No caso do leite com CCS alta, alguns autores observaram aumento no teor de gordura (COONEY *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2000; SHUSTER *et al.*, 1991) e outros observaram sua redução (AULDIST *et al.*, 1996c; LEAVITT *et al.*, 1982; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b), indicando mais uma grande variabilidade deste componente que pode ser, segundo Ma *et al.* (2000), decorrente da redução do volume do leite produzido por vacas com mastite.

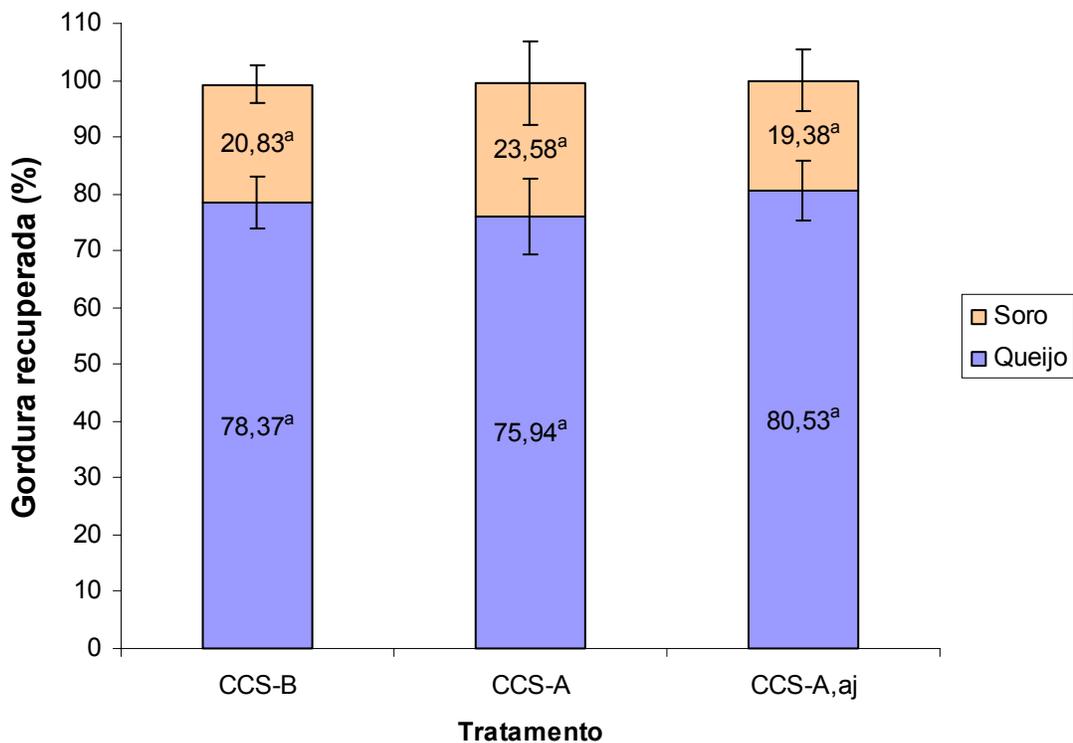


Figura 5.3: Recuperação de gordura para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).

Nestes experimentos, o leite CCS-A apresentou, em média $3,8 \pm 0,2\%$ de gordura, teor maior que o leite CCS-B que apresentou em média $3,5 \pm 0,5\%$ de gordura. O aumento do teor de gordura do leite se dá não pelo aumento do número de glóbulos, mas pelo aumento do tamanho dos glóbulos de gordura (KING JOL, 1957; WIKING *et al.*, 2004), os quais podem ser mais facilmente retidos pela matriz protéica. Desta forma, comparando o queijo CCS-B e CCS-A (Figura 5.3), apesar de não haver diferença significativa observa-se uma tendência de maior perda no soro CCS-A. Entretanto, quando se compara o queijo CCS-B com CCS-A,aj existe uma tendência de menor perda de gordura para o soro CCS-A,aj, possivelmente porque as interações protéicas aumentaram com o aumento do tempo de coagulação, favorecendo a retenção dos glóbulos de gordura maiores.

A Figura 5.4 apresenta a recuperação de lactose para o queijo e para o soro, para cada tratamento.

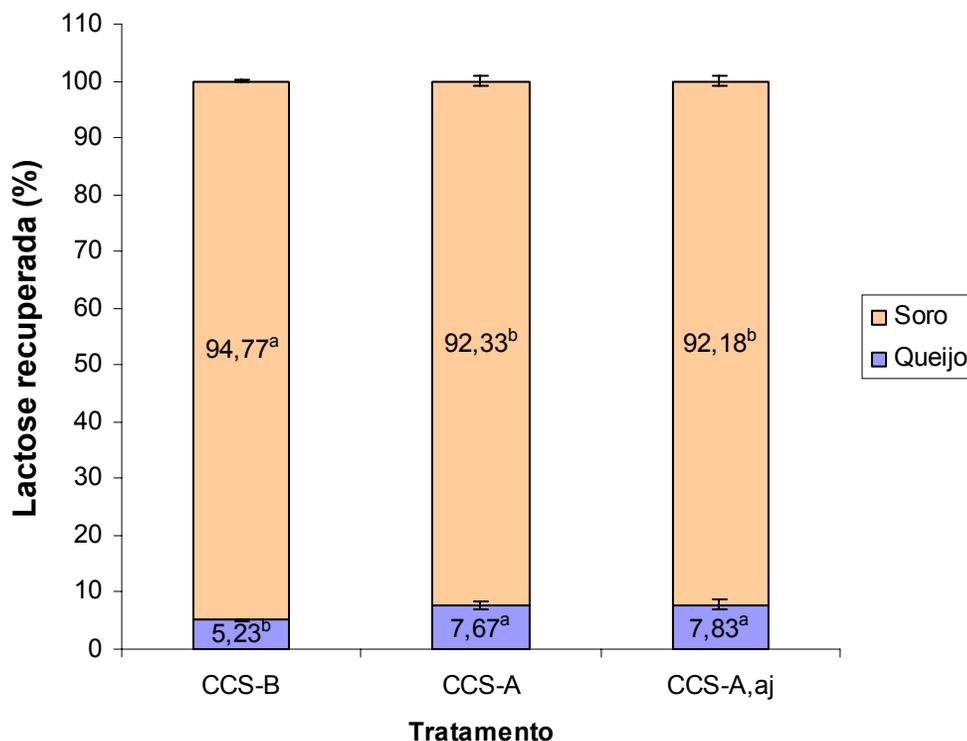


Figura 5.4: Recuperação de lactose para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).

Quanto à lactose, os tratamentos afetaram significativamente sua recuperação para o queijo e para o soro, sendo que a recuperação foi maior para os queijos de CCS alta. Este resultado acompanhou a tendência observada de maior retenção de umidade nos queijos com CCS alta (Tabela 5.3). A lactose é um componente solúvel (FOX e McSWEENEY, 1998) e seu teor no queijo depende da quantidade de água retida pelo coágulo. Segundo Furtado e Wolfschoon Pombo (1979), a recuperação da lactose pelo queijo Prato aumentou com a elevação do teor de umidade dos queijos.

Tabela 5.5 Rendimento queijeiro e desvio padrão dos processos (n=3).

Características	Queijo CCS-B	Queijo CCS-A	Queijo CCS-A,aj
Rendimento (%)	9,2 ^a ± 0,8	10 ^a ± 0,1	10,4 ^a ± 0,6
Rendimento ajustado (%)	9 ^a ± 1	9,5 ^a ± 0,4	10,1 ^a ± 0,6
Rendimento em base seca (%)	45 ^a ± 2	45 ^a ± 2	47 ^a ± 3

Valores com mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si (p ≤ 0,05).

A despeito da maior recuperação de proteína para o queijo CCS-B, observa-se na Tabela 5.5 que isto não se traduziu em maior rendimento queijeiro, uma vez que não se obteve diferença significativa de rendimento entre os tratamentos. Na verdade, observou-se uma tendência de maior rendimento para o queijo de CCS alta e tempo de coagulação ajustado. Este resultado difere do apresentado em diversos estudos (ALI *et al.*, 1980; AULDIST *et al.*, 1996c; BARBANO *et al.*, 1991; KLEI *et al.*, 1998; LEAVITT *et al.*, 1982; MATIOLI *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1986b; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988b; ROGERS, 1987; ROGERS e MITCHELL, 1994) que demonstraram a diminuição do rendimento queijeiro quando se utilizou leite CCS-A. O rendimento depende da transição dos componentes sólidos do leite para o queijo, especialmente, proteína e gordura (LUCEY e KELLY, 1994). Os resultados deste trabalho sugerem que a alteração da composição do leite, neste caso maior teor de gordura do leite CCS-A e o comportamento durante o processo de fabricação, neste caso a menor sinérese do coágulo com CCS alta podem compensar a menor recuperação de proteína do leite CCS-A para o queijo, não comprometendo o rendimento. Cabe ressaltar que os queijos CCS-A e CCS-A,aj apresentaram 46% e 44,9% de umidade (Tabela 5.3), respectivamente, valores que estão dentro da legislação que estabelece entre 36 e 45,9% na portaria 146/96 (LERAYER *et al.*, 2002.), mas que são superiores a 42%, indicado por Furtado e Lourenço neto (1994) para o queijo Prato.

5.5 Efeito do tratamento sobre a maturação do queijo Prato

Os dados completos para o comportamento do pH, da umidade e os índices de extensão e profundidade de maturação ao longo do tempo, para a média dos 3 processamentos são apresentados no anexo 2.

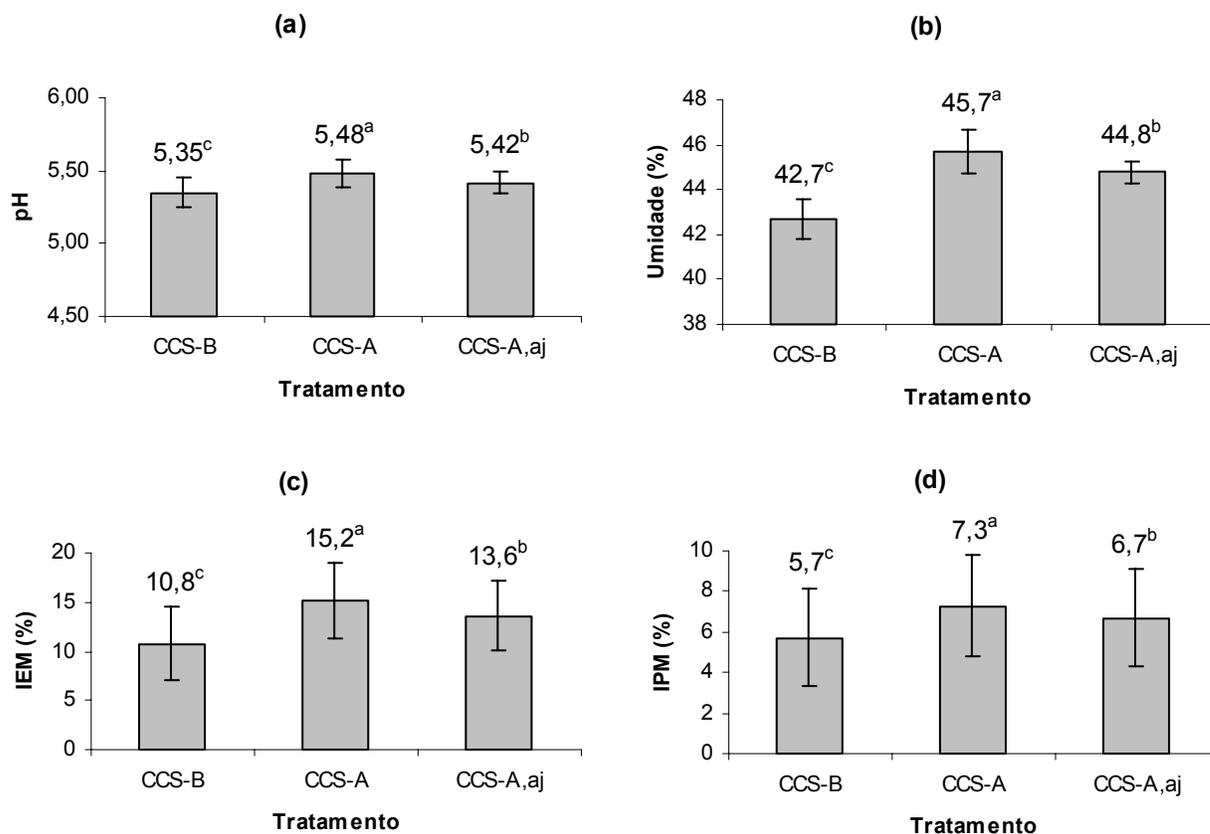
A Tabela 5.6 apresenta o efeito do tratamento, do tempo, bem como a interação destes fatores sobre o pH, a umidade e os índices de extensão e de profundidade de maturação dos queijos.

Tabela 5.6 Resumo de análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamentoXtempo sobre pH, umidade, índice de extensão e de profundidade de maturação dos queijos (n=3).

Fatores	GL	Valores de p			
		pH	Umidade	IEM	IPM
Tratamento	2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tempo	5	<0,0001	0,9973	<0,0001	<0,0001
TratamentoXTempo	10	0,9559	1	0,9669	0,8875

p ≤ 0,05.

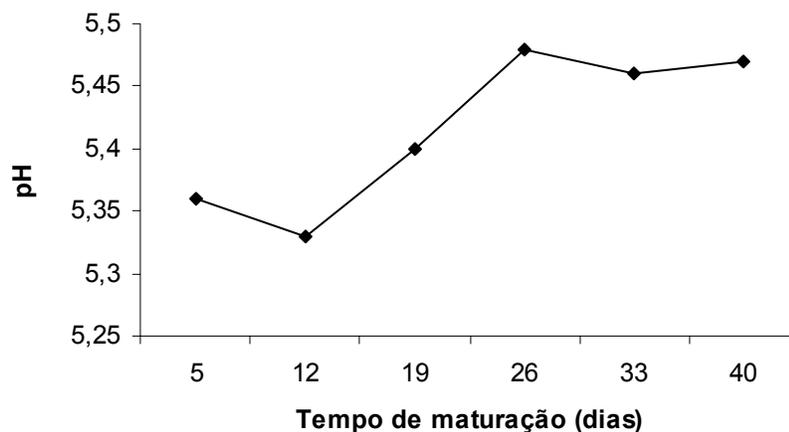
Observa-se nesta tabela que os tratamentos afetaram significativamente o pH, a umidade, os índices de extensão e de profundidade dos queijos. Observa-se na figura 5.5, que apresenta o efeito do tratamento para cada parâmetro avaliado, que o queijo CCS-B apresentou, em média, valores menores de pH, umidade, IEM e IPM, enquanto o queijo CCS-A apresentou, em média, os maiores valores para as mesmas características. Para estes mesmos parâmetros, o queijo CCS-A,aj apresentou valores intermediários.



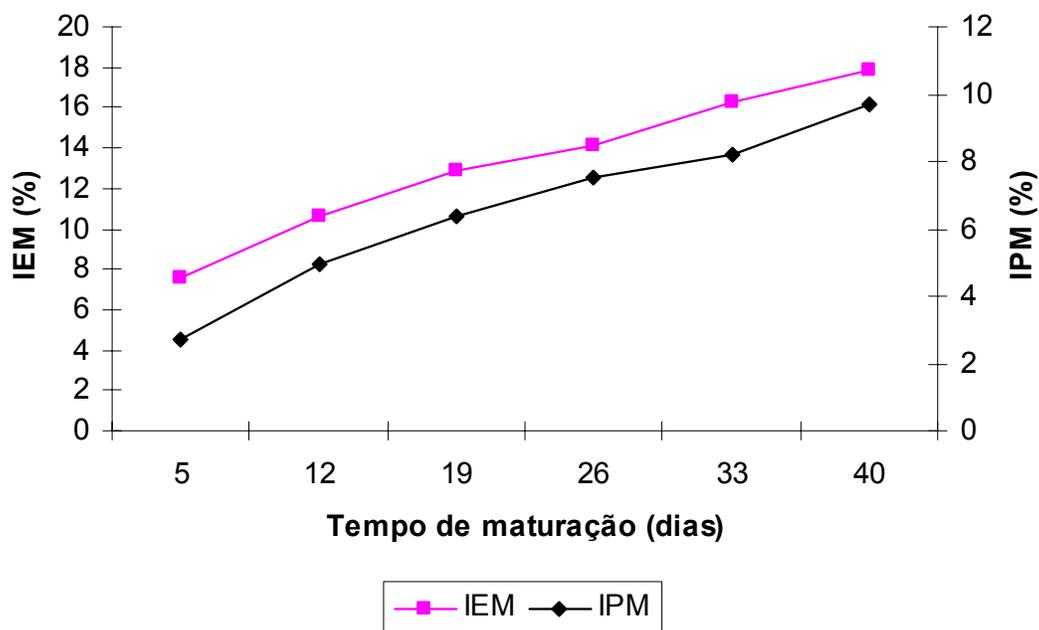
Figuras 5.5: Efeito dos tratamentos sobre o pH (a), a umidade (b) e os Índices de extensão (c) e profundidade (d) de maturação do queijo Prato (n=3).

Observa-se na Tabela 5.6, que o tempo de maturação afetou significativamente o pH, o IEM e o IPM, os quais aumentaram ao longo do tempo, conforme pode se observar nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente. Segundo Fox (1993) a proteólise participa da maturação dos queijos e caracteriza-se pelas reações primárias e secundárias o que se reflete no aumento do IEM e IPM, respectivamente. Conseqüentemente, a degradação dos pequenos peptídeos libera compostos aminos mais simples e se traduz pelo aumento do pH. Após ativação do sistema plasmina, Kalit *et al.*, (2002) mostraram um aumento dos índices de extensão e profundidade de maturação para o queijo Podravec obtido a partir do leite com CCS acima de 500.000cél/mL. Cooney *et al.* (2000) afirmaram que a proteólise aumentou ao longo do tempo e foi sempre maior para os queijos CCS-A, resultados estes que estão de acordo com os obtidos neste trabalho

indicando maior proteólise. O teor de umidade dos queijos não foi afetado pelo tempo para todos os tratamentos, o que significa que cada queijo apresentou um teor de sólidos constante ao longo do tempo de maturação.



Figuras 5.6: Efeito do tempo de maturação sobre o pH do queijo Prato (n=3).



Figuras 5.7: Efeito do tempo de maturação sobre os índices de extensão e de profundidade de maturação do queijo Prato (n=3).

É importante observar que a interação entre os tratamentos e o tempo de maturação não afetou significativamente o pH, a umidade e os índices de extensão e de profundidade de maturação. Isto equivale a dizer que a maturação evoluiu de forma semelhante para todos os queijos, independentemente do tratamento.

Os dados completos para o comportamento da firmeza, elasticidade e coesividade ao longo do tempo, para a média dos 3 experimentos são apresentados no anexo 3.

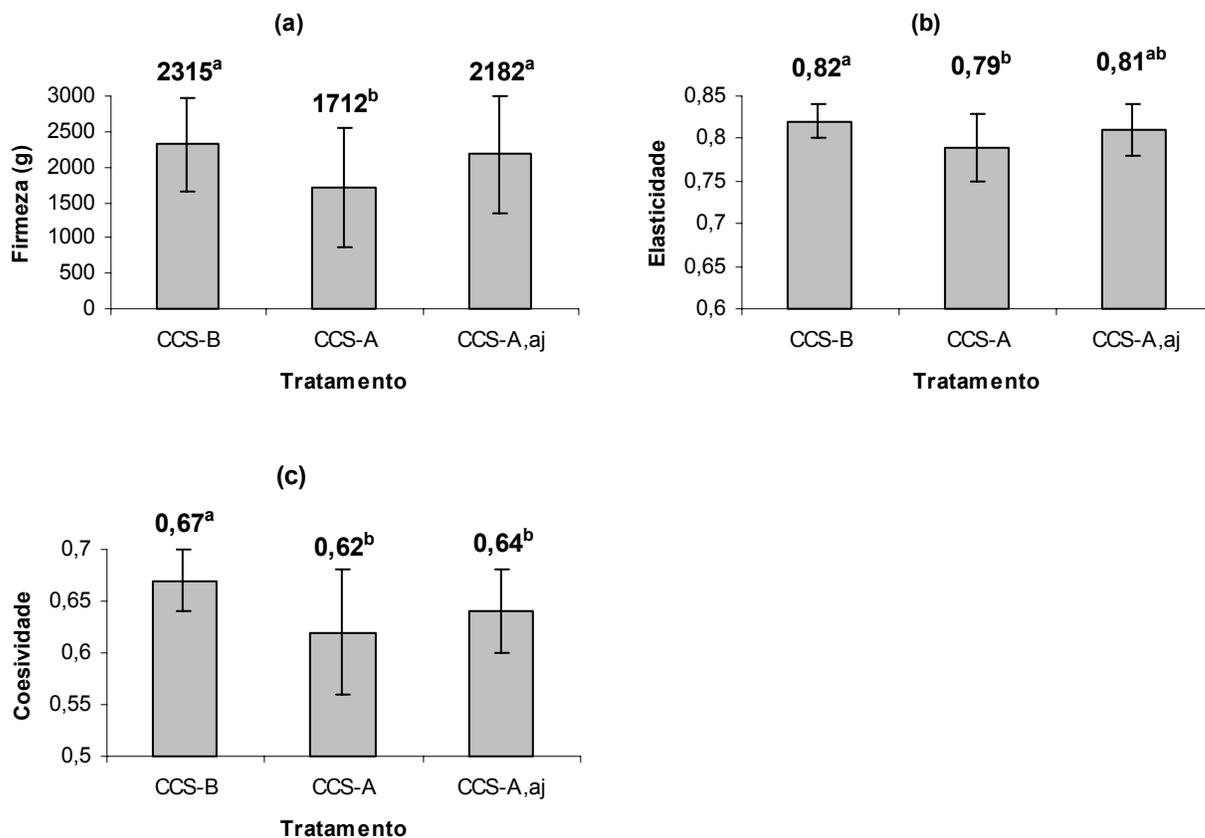
Tabela 5.7 Resumo de análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamentoXtempo sobre o perfil de textura do queijo Prato durante a maturação (n=3).

Fatores	GL	Valores de p		
		Firmeza	Elasticidade	Coesividade
Tratamento	2	0,0007	0,0022	0,0001
Tempo	5	<0,0001	0,0864	0,4958
TratamentoXTempo	10	0,9991	0,9946	0,9549

p ≤ 0,05.

Observa-se na Tabela 5.7 que apresenta o efeito do tratamento, do tempo, bem como a interação destes fatores sobre o perfil de textura dos queijos, que a firmeza, a elasticidade e a coesividade foram significativamente afetadas pelos tratamentos. Estes resultados estão em concordância com os apresentados por Rogers (1987) que afirmou que os queijos com CCS alta apresentaram defeito físico e sensorial de textura.

A Figura 5.8 apresenta os valores médios da firmeza, da elasticidade e da coesividade para cada tratamento.



Figuras 5.8: Efeito dos tratamentos sobre a firmeza (a), elasticidade (b) e coesividade (c) do queijo Prato (n=3).

No que diz respeito à firmeza, observa-se na Figura 5.8 que os queijos CCS-B e CCS-A,aj não diferiram significativamente entre si, enquanto o queijo de CCS-A apresentou a menor firmeza. Comparando-se com os dados da Figura 5.5, observa-se que este queijo foi o que apresentou também maior umidade e maior proteólise, fatores que são, possivelmente, responsáveis pela menor firmeza do produto. Este comportamento foi também observado por Mitchell *et al.* (1986b) que analisaram o perfil de textura de queijo Cheddar e observaram uma diminuição da firmeza do queijo com o aumento da CCS do leite. Além disso, Grandisson e Ford (1986) também demonstraram uma correlação negativa entre a CCS e a firmeza do queijo. Quando a firmeza foi avaliada sensorialmente, Rogers e Mitchell (1994) descreveram uma depreciação das notas de firmeza com o aumento de CCS. Froeder Arcuri *et al.* (1990) observaram a mesma tendência

para as notas de corpo e textura para o queijo Prato fabricados a partir de leite com mais de 500.000 cél/mL.

Quanto à elasticidade, ou seja, a capacidade do queijo de voltar a sua forma original após ter sido comprimido, observou-se que o queijo CCS-B diferiu significativamente do queijo CCS-A, porém não diferiu do queijo CCS-A,aj. Os queijos com CCS alta não diferem significativamente entre si. Observa-se na Figura 5.8 que o queijo CCS-B apresentou, em média, o maior valor de elasticidade, enquanto o queijo CCS-A apresentou o menor. Através da análise instrumental, Grandisson e Ford (1986) demonstraram uma correlação negativa entre a CCS e a elasticidade do queijo, o qual foi comprovado sensorialmente por Rogers e Mitchell (1994) com a depreciação das notas de elasticidade para queijos com CCS alta.

Em relação à coesividade, ou seja a capacidade do queijo ser deformado antes da ruptura, observa-se na Figura 5.8, que o queijo de CCS baixa diferiu significativamente dos queijos CCS-A e CCS-A,aj, os quais não diferiram entre si. O queijo CCS-B apresentou, em média, valor maior de coesividade enquanto o queijo CCS-A apresentou o menor valor.

Estes diferentes comportamentos de firmeza, elasticidade e coesividade encontrados nos queijos obtidos a partir de leite CCS-A podem ser devidos às alterações da composição dos queijos CCS-A. Na verdade, observou-se que os queijos com CCS alta apresentam tendência de maior umidade. Segundo Fox e McSweeney (1998), o aumento do teor de umidade no queijo é responsável pela diminuição da firmeza, da elasticidade e pelo aumento da plasticidade do produto. Também, os queijos obtidos a partir de leite CCS-A apresentaram índices de proteólises maiores do que o queijo CCS-B. A degradação das ligações inter- e intra-moleculares se traduz pela diminuição da elasticidade do queijo. Assim, as alterações encontradas anteriormente que afetaram a matriz protéica e a

composição do produto foram provavelmente responsáveis pelos diferentes perfis de textura observados.

Além do efeito dos tratamentos sobre o perfil de textura, observa-se na Tabela 5.7 que o tempo de maturação afetou significativamente a firmeza dos queijos, a qual diminuiu ao longo do tempo. A diminuição da firmeza do queijo Prato durante a maturação é usual e foi também observada por Spadoti (2003) e Schultz (2003)

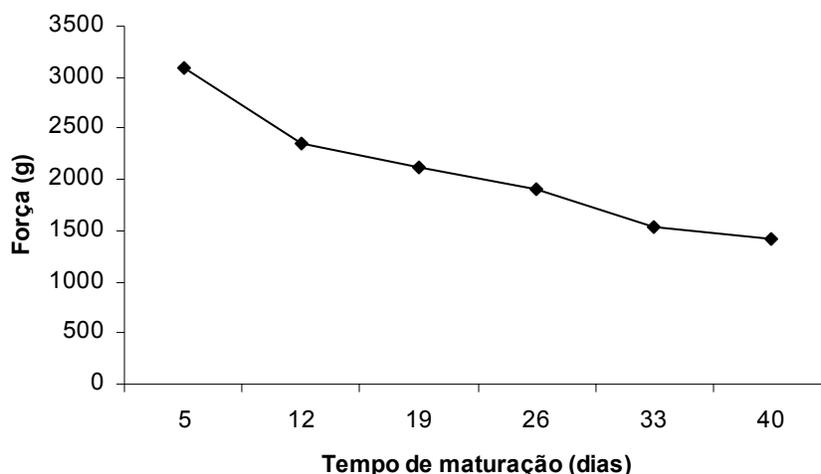


Figura. 5.9: Efeito do tempo de maturação sobre a firmeza do queijo Prato (n=3).

O tempo de maturação não afetou a elasticidade e a coesividade dos queijos. Além do mais, a interação entre tratamento e tempo não afetou significativamente nenhum parâmetro de textura do produto, ou seja, os resultados mostraram que a firmeza, a elasticidade e a coesividade evoluíram de maneira semelhante durante a maturação, independentemente do tratamento.

5.6 Análise do perfil eletroforético das amostras dos leites usados e dos soros e queijos obtidos

A Figura 5.10 apresenta o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das amostras dos leites usados nos processos e dos soros obtidos para cada tratamento.

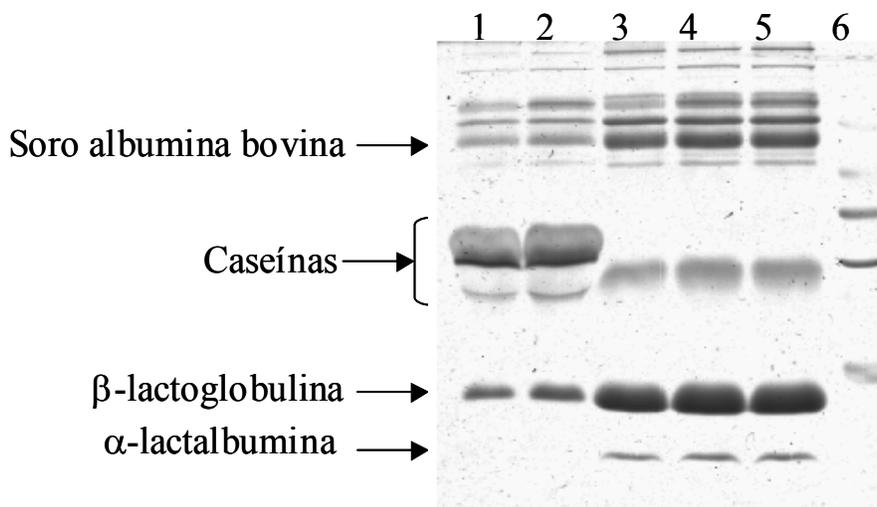


Figura. 5.10: Perfil eletroforético de amostras de leites e soros em gel SDS-PAGE. Amostras: (1) leite CCS-B, (2) leite CCS-A, (3) soro CCS-B, (4) soro CCS-A, (5) soro CCS-A,aj, (6) Padrão.

A migração em gel SDS-PAGE permitiu a separação das proteínas das amostras dos leites e dos soros em função do peso molecular. As bandas correspondentes à soro-albumina bovina, às caseínas, e à β-lactoglobulina foram identificadas para as amostras dos leites e dos soros. A banda característica da α-lactalbumina foi somente detectada para as amostras dos soros. As análises por densitometria das bandas de mesmo peso molecular permitiu comparar quantitativamente as proteínas de amostras de mesmo tipo. A Tabela 5.8 apresenta os valores de densidade óptica obtidos para as bandas correspondentes às proteínas identificadas de cada amostra: soro-albumina bovina, caseínas, β-lactoglobulina e α-lactalbumina para as amostras dos leites e dos soros.

Tabela 5.8 Densidade óptica das proteínas das amostras dos leites e dos soros.

Proteínas	Leite		Soro		
	CCS-B	CCS-A	CCS-B	CCS-A	CCS-A,aj
Soro-albumina bovina	0,018	0,026	0,055	0,077	0,073
Caseínas	0,105	0,091	0,020	0,028	0,026
β -lactoglobulina	0,053	0,057	0,118	0,122	0,120
α -lactalbumina	-	-	0,029	0,033	0,032

DO: counts/pixel.

A DO indica a intensidade do sinal emitido pela fração protéica, quanto maior a DO, maior a concentração. O leite CCS-A apresenta concentração maior para a soro-albumina bovina, menor para as caseínas e levemente maior para a β -lactoglobulina. A maior concentração de soro-albumina bovina no leite CCS-A deve-se possivelmente à mastite, que provoca a alteração da permeabilidade vascular e a destruição do epitélio mamário e propicia maior passagem das proteínas do sangue para o leite, como já foi observado por Ali *et al.* (1980); Kitchen *et al.* (1980); Politis *et al.* (1989a); Poutrel *et al.* (1983); Rogers *et al.*; (1989a); Shuster *et al.* (1991). A diminuição da concentração de caseínas é associado ao aumento de CCS (LEAVITT *et al.*, 1982; ROGERS e MITCHELL, 1994), pois há decréscimo da síntese protéica pela glândula mamária e aumento da proteólise no leite CCS-A. Em relação à β -lactoglobulina, os leites CCS-A e CCS-B apresentaram concentrações similares. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Verdi *et al.* (1987), em que as concentrações de β -lactoglobulina não foram influenciadas pelo nível de CCS. Segundo Rogers (1987) a concentração de β -lactoglobulina apresenta diminuição significativa somente em leite com mais de 1.000.000 cél/mL.

Os soros com CCS alta apresentaram maiores concentrações de soro-albumina bovina e de caseínas, enquanto as concentrações de β -lactoglobulina e de α -lactalbumina permaneceram similares. O leite CCS-A apresentou maior

contração de soro-albumina bovina, a qual não é incorporada no queijo, e conseqüentemente encontra-se maior no soro CCS-A. No que diz respeito às caseínas, o aumento da sua concentração nos soros CCS-A deve-se possivelmente, à sua menor incorporação no queijo. O leite CCS-A apresentou maior pH durante o processo de fabricação o que dificultou a etapa de coagulação provocando maior perda das caseínas para o soro. Quanto às β -lactoglobulina e α -lactalbumina, os soros apresentaram concentrações semelhantes. Da mesma forma que foi discutido para a soro-albumina bovina, a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina não são recuperadas no queijo e portanto apresentaram valores constantes no soro, já que não houve diferença entre os leite CCS-B e CCS-A.

A Figura 5.11 apresenta o perfil eletroforético em gel Urea-PAGE das amostras dos queijos CCS-B, CCS-A, CCS-A,aj após 5, 26 e 40 dias de maturação.

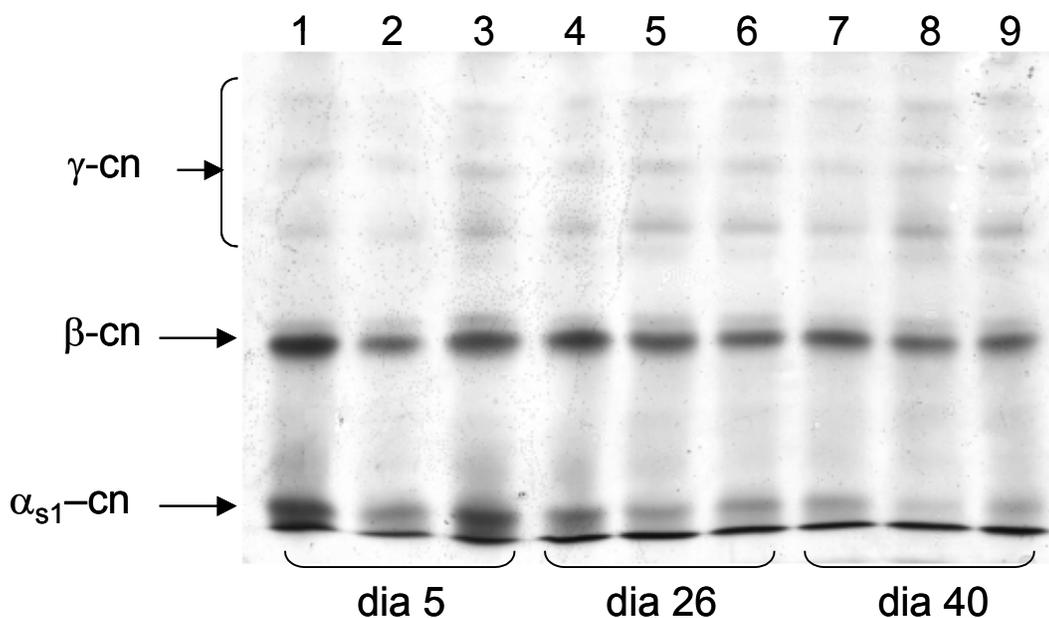


Figura. 5.11: Perfil eletroforético de amostras de queijo em gel Urea-PAGE. Amostras: (1), (4) e (7) queijo CCS-B; (2), (5), (8) queijo CCS-A; (3), (6) e (9) queijo CCS-A,aj.

A migração em gel Urea-PAGE permitiu a separação das caseínas em função das suas cargas. As bandas correspondentes às α_{s1} - e β -caseínas foram identificadas para todas as amostras dos queijos. As análises por densitometria ótica das bandas permitiram comparar quantitativamente as proteínas de mesmo peso molecular. A Tabela 5.9 apresenta os valores de densidade ótica obtidos para as bandas correspondentes às α_{s1} - e β -caseínas das amostras dos queijos após 5, 26 e 40 dias de fabricação.

Tabela 5.9 Densidade ótica das α_{s1} - e β -caseínas das amostras de queijos.

	α_{s1} -caseínas			β -caseínas		
	5 dias	26 dias	40 dias	5 dias	26 dias	40 dias
CCS-B	0,426	0,249	0,134	0,471	0,369	0,298
CCS-A	0,182	0,153	0,065	0,284	0,233	0,223
CCS-A,aj	0,409	0,157	0,113	0,348	0,276	0,233

DO: counts/pixel.

Todos os queijos apresentaram diminuição da concentração de α_{s1} - e β -caseínas ao longo do tempo. O queijo CCS-B apresenta sempre maior concentração de α_{s1} - e β -caseínas do que o queijo CCS-A,aj, seguido pelo CCS-A. Estes resultados sugerem que os queijos com CCS alta apresentaram proteólise mais intensa do que o queijo CCS-B. Isto pode ser devido à maior quantidade de plasmina no leite CCS-A e da sua maior atividade, já que estes queijos apresentaram maior pH. A comparação dos queijos obtidos a partir de leite CCS-A indica que o queijo CCS-A apresenta menor concentração de α_{s1} - e β -caseínas do que o queijo CCS-A,aj. O queijo CCS-A possui possivelmente uma matriz protéica menos compacta pois foi obtido sem ajustar o tempo de coagulação. Isto facilita o acesso das enzimas proteolítica aos sítios de hidrólise, o que se traduz por uma degradação maior das proteínas e se reflete pelas menores concentrações de α_{s1} - e β -caseínas do queijo CCS-A.

Quando se compara os índices de extensão e profundidade de maturação, a degradação protéica, medida pela eletroforese, e a firmeza dos queijos, observa-se a interdependência dos resultados. O queijo que apresentou mais intensa proteólise, maior degradação α_{s1} - e β -caseínas e menor firmeza foi o produzido com CCS alta, sem ajuste do tempo de coagulação, seguido do queijo com CCS alta e tempo de coagulação ajustado e do queijo de CCS baixa.

6. Conclusões

Com o aumento da contagem de CCS do leite verificou-se a redução do teor de proteína verdadeira e o aumento do teor de nitrogênio não protéico;

O tratamento afetou o comportamento do pH durante o processo de fabricação do queijo Prato. Os queijos fabricados com leite de CCS alta, com e sem ajuste do tempo de coagulação, apresentaram maior pH durante todo o processo de fabricação;

Os queijos com CCS alta, com e sem ajuste do tempo de coagulação, apresentaram proteólise mais intensa do que o queijo com CCS baixa;

A recuperação de proteínas foi maior para o queijo com CCS baixa quando comparado ao queijo com CCS alta, sem ajuste do tempo de coagulação;

A recuperação da lactose foi maior para os queijos com CCS alta, independente do tempo de coagulação;

A contagem de CCS e o tempo de coagulação não afetaram significativamente o rendimento dos queijos;

Os tratamentos afetaram o pH, a umidade, os índices de extensão e profundidade de maturação dos queijos. O queijo com CCS baixa apresentou menores pH, umidade, e índices de extensão e profundidade de maturação, seguido do queijo com CCS alta e tempo de coagulação ajustado e do queijo de CCS alta.

Os tratamentos afetaram a firmeza, a elasticidade e a coesividade dos queijos. O queijo de CCS alta sem ajuste do tempo de coagulação apresentou menor firmeza que os demais. O queijo de CCS baixa apresentou maior elasticidade que o queijo

de CCS alta sem ajuste do tempo de coagulação. O queijo de CCS baixa apresentou maior coesividade que os demais;

Para todos os queijos, a firmeza diminuiu significativamente durante a maturação;

Os queijos com CCS alta com e sem ajuste do tempo de coagulação apresentaram proteólise mais intensa das frações α_{s1} - e β -caseínas ao longo do tempo.

7. Referências Bibliográficas

AIMUTIS, W.R.; EIGEL, W.N. Identification of λ -casein as plasmin-derived fragments of bovine α_{s1} -casein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 175-181, 1982.

ALI, A.E.; ANDREWS, A.T.; CHEESEMAN, G.C. Influence of elevated somatic cell count on casein distribution and cheese-making. **Journal of Dairy Research**, London, v. 47, n. 3, p. 393-400, 1980

ALICHANIDIS, E.; WRATHALL, J.H.M.; ANDREWS, A.T. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. **Journal of Dairy Research**, London, v. 53, n. 3, p. 259-269, 1986.

ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n. 1, p. 45-55, 1983a.

ANDREWS, A.T. Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n. 1, p. 57-66, 1983b.

ANDREWS, A.T.; ALICHANIDIS, E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n. 3, p. 275-290, 1983.

ANDREWS, R.J.; KITCHEN, B.J.; KWEE, W.S; DUNCALFE, F. Relationship between individual cow somatic cell counts and the mastitis infection status of the udder. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 38, n. 2, p. 71-74, 1983.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION **Systèmes de management de la qualité**. Paris, 2000, 24 p. AFNOR X542, NF EN ISO 9001:2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16^{Ed}. Washington, 1995. v.1-2.

AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

AULDIST, M.J.; COATS, S.T.; SUTHERLAND, B.J.; CLARK, P.T.; MCDOWELL, G.H; ROGERS, G.L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality of full cream milk powder. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 51, n. 2, p. 94-98, 1996a.

AULDIST, M.J.; COATS, S.J.; SUTHERLAND, B.J.; HARDHAM, J.F.; MCDOWELL, G.H.; GRAHAM, H.M.; ROGERS, G.L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, London, v. 63, n. 3, p. 377-386, 1996b.

AULDIST, M.J.; COATS, S.; SUTHERLAND, B.J.; MAYES, J.J.; MCDOWELL, G.H.; ROGERS, G.L. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 63, n. 2, p. 269-280, 1996c.

BALLOU, L.U.; PASQUINI, M.; BREMEL, R.D.; EVERSON, T.; SOMMER, D. Factors affecting herd milk composition and milk plasmina at four levels of somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 10, p. 2186-2195, 1995.

BARBANO, D. The role of milk quality and mastitis control in addressing future dairy food marketing opportunities in a global economy. **NMC Regional meeting Proceedings**. Bloomington, p. 1-5, 2004.

BARBANO, D.M.; RAMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 369-388, 1991.

BARRY, J.G.; DONNELLY W.J. Casein compositional studies II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 3, p. 437-446, 1981.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R.J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, London, v. 6. n. 5, p. 435-457, 1996.

BLAKESLEY, R.W.; BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 82, n.2, p. 580-582, 1977.

BOURNE, M.C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 7, p. 62-68, 1978.

BRAMLEY, J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control-progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, London, v. 51, n. 3, p. 481-512, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Balde Branco, São Paulo, ano XXXVIII, n. 456, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 358 de 4 de setembro de 1997 e Regulamento técnico de 8 setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. Disponível em <<http://www.agridata.mg.gov.br>> acesso em março 2005.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods.** London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CAFFIN, J.P.; POULTREL, B.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin concentrations in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 5, p. 1087-1094, 1985.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUNÓZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 2885-2889, 2002.

CICHOSCKI, A.J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A.T.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 4-5, p. 329-336, 2002.

CONSIDINE, T; GEARY, S.; KELLY, A.L. MCSWEENEY, P.L.H.; Proteolytic specificity of cathepsin G on bovine alphas1- and beta-caseins. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 1, p. 59-67, 2002.

COONEY, S.; TIERNAN, D.; JOYCE, P.; KELLY, A.L. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type-cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 67, n. 2, p. 301-307, 2000.

COULON, J.C.; HURTAUD, C.; REMOND, B.; VERITE, R. Factors contributing to variation in the proportion of casein in cow's milk true protein: a review of recent INRA experiments. **Journal of Dairy Research**, London, v. 65, n. 3, p. 375-387, 1998.

CREAMER, L.K.; OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 631-646, 1982.

DE RHAM, O; ANDREWS, A.T. Qualitative and quantitative determination of proteolysis in mastitic milks. **Journal of Dairy Research**, London, v. 49, n. 4, p. 587-596, 1982.

DEETH H.C. Lipolysis in milk and dairy products – A research journey. **Food Australia**, Waterloo, v. 54, n. 10, p. 433-436, 2002.

DELUYKER, H.A.; GAY, J.M.; WEAVER, L.D. Interrelationships of somatic cell count, mastitis, and milk yield in a low cell count herd. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 11, p. 3445-3452, 1993.

DONNELLY, W.J.; BARRY, J.G. Casein compositional studies. III. Changes in Irish milk for manufacturing and role of milk proteinase. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n. 4, p. 433-441, 1983.

FERNANDES, A.M. **Avaliação do iogurte produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. 2003. 87 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

FIL-IDF. Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Bruxelas, n. 211, p. 3-8, 1987.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. 478 p.

FOX, P.F, GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: An Aspen Publication, 2000. 587 p.

FOX, P. F.; LAW, J.; McSWEENEY, P. L. H.; WALLCE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F., ed. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. General aspects. Gaithersburg: An Aspen Publication, 1999, v.1, p. 389-438.

FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-400, 1989.

FROEDER ARCURI, E.; LOPEZ VARGAS, O.; DE SOUZA, H. M.; DOS SANTOS, E.C.; CARVALHO, A.F. Conseqüências de diferentes níveis de células somáticas no leite sobre a qualidade do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 45, n. 267-272, p. 68-76, 1990.

FURTADO, M.M.; AMORIM, A.C.B. Os pioneiros laticinistas dinamarqueses e a história do queijo Prato – Parte 2. **Indústria de laticínios**, São Paulo, v. 4, n. 25, p.18-22, 2000.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON POMB, A. F. Étude de quelques aspects de la fabrication des fromages brésiliens Prato et Minas. **Le Lait**, Paris, v. 58, n. 578, p. 510-530, 1978.

FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON POMB, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: Estudo do rendimento. Parte I – Determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-19, 1979.

GERRARD, J.A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 13, n. 12, p. 391-399, 2002.

GIGANTE, M.L. **Contribuição ao estudo do uso de gordura vegetal na fabricação de queijo minas frescal**. 1991. 161 p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

GOROSTIZA, A.; CICHOSKI, A.J.; VALDUGA, A.T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J.M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 3, p. 407-414, 2004.

GRANDISSON, A.S.; FORD, G.D. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield, composition and quality of cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 53, n. 4, p. 645-655, 1986.

GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. **Journal of Dairy Research**, London, v. 52, n. 1, p. 101-112, 1985.

HARDNING, F. (Ed.) **Milk quality**. Gaithersburg: Aspen, 1999. 166p.

HARMON, R.J. Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HARWALKAR, V.R.; CHOLETTE, H.; MCKELLAR, R.C.; EMMONS, D.B. Relation between proteolysis and Adstringent off-flavor in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 2521-2527, 1993.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2000. v. 2, cap. 50, met 985.35 e 984.27, p. 15-18. 2000.

KALIT, S.; LUKAC HAVRANEC, J.; KAPS, M. Plasminogen activation and somatic cell count (SCC) in cheese milk: influence on Podravec cheese ripening. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 57, n. 7, p. 380-382, 2002.

KELLY, A.L.; REID, S.; JOYCE, P.; MEANEY, W.J.; FOLEY, J. Effect of decreased milking frequency of cows in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte numbers, composition and proteolytic activity. **Journal of Dairy Research**, London, v. 65, n. 3, p. 365-375, 1998.

KING J.O.L. The association between the fat percentage of cows milk and the size and number of the fat globules. **Journal of Dairy Research**, London, v. 24, n. 2, p. 198-200, 1998.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

KITCHEN, B.J.; MIDLETON, G.; DURWARD, I.G.; ANDREWS, R.J.; SALMON, M.C. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 6, p. 978-983, 1980.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.

LANARA-Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II-Metodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 15, p. 685-689, 1970.

LEAVITT, B.E.; O'LEARY, J.; HARMON, R.J.; HICKS, C.L. Effect of mastitis on cheese yield, milk production, milk composition and starter culture activity. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 12, p. 1176, 1982.

LERAYER, A.L.S.; DE OLIVEIRA, A.M.R.M.; GUEDES, A.L.^a; De CARVALHO, A.F.; HAJDENWURCEL, J.R.; DA FONSECA, L.M.; MOSQUIM, M.C.A.; **Nova legislação de produtos lácteos**. São Paulo: João Antônio Dos Santos, 2002. 327 p.

LE ROUX, Y.; COLIN, O.; LAURENT, F. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1289-1297, 1995.

LUCEY, J. Cheesemaking from grass based seasonal milk and problems associated with late-lactation milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon Cambs, v. 49, n. 2, p. 59-64, 1996.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon Cambs, v. 47, n. 1, p. 1-14, 1994.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M.A.; BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p.1883-1886, 2000.

MARQUES, L.T.; BALBINOTI, M.; FISCHER, V. Variations in the milk chemical composition according to somatic cell count. Panamerican congress on milk quality and mastitis control, 2 , 2002, Ribeirão Preto, Brazil.

MATIOLI, G.P.; PINTO, S.M.; DE ABREU, L.R.; XAVIER, L.; TEIXEIRA, L.A.M. Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo Minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 313, p. 38-45, 2000.

MITCHELL, G.E.; ROGERS, S.A.; HOULIHAN, D.B.; TUCKER, V.C.; KITCHEN, B.J. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 1. composition of farm bulk milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 41, n. 1, p. 9-12, 1986a.

MITCHELL, G.E.; FREDRICK, I.A.; ROGERS, S.A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 2. Cheddar cheese from farm bulk milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 41, n. 1, p. 12-14, 1986b.

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 39, n. 1, p. 7-16, 1984.

MURPHY, S.C.; CRANKER, K.; SENYK, G.F.; BARBANO, D.M.; SAEMAN, A.I.; GALTON, D.M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 3, p. 620-626, 1989.

NEEDS, E.; ANDERSON, M.; KIRBY, S. Influence of somatic cell count on the whipping properties of cream. **Journal of Dairy Research**, London, v. 55, n. 1, p. 89-95, 1988.

NEVILLE, M.C.; WATTERS, C.D. Secretion of calcium into milk: review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 371-380, 1983.

NG-KWAI-HANG, K.F.; KROEKER, E.M. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel

electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 3052-3056, 1984.

O'BRIEN, B.; MEANEY, W.J.; MCDONAGH, D.; KELLY, A. Influence of somatic cell count interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 56, n. 3, p. 213-217, 2001.

OKIGBO, L.M.; RIDCHARDSON, R.J. BROWN; ERNSTROM, C.A. Coagulation properties of abnormal and normal milk from cow quarters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 8, p. 1893-1896, 1985.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo**: fundamentos tecnológicos. São Paulo: Ícone, 1986. 146 p.

OLIVEIRA, C.A.F.; FERNANDES, A.M.; CUNHA NETO, O.C.; FONSECA, L.F.L.; SILVA, E.O.T.; BALIAN, S.O. Composition and sensory evaluation of whole yogurt produced from milk with different somatic cell counts. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 57, n. 3, p. 192-196, 2002.

POLITIS, I.; LACHANCE, E.; BLOCK, E.; TURNER, J.D. Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 900-906, 1989a.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F.; GIROUX, R.N. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 7, p. 1713-1718, 1989b.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 7, p. 1711-1719, 1988a.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n.7, p. 1720-1727, 1988b.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 7, p. 1740-1746, 1988c.

POUTREL, B.; CAFFIN, J.P.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n.3, p. 535-541, 1983.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; GRÖHN, Y.T; McCULLOCH, C.E.; GUARD, C.L. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1213-1220, 1999.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Public Health Association, 1985. 412 p.

ROGERS, S.A The influence of the leucocyte content on milk composition and milk product quality. **Food Technology in Australia**; Sydney, v. 39, n. 8, p. 366-367, 1987.

ROGERS, S.A.; MITCHELL, G.E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 6. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 49, n. 2, p. 70-74, 1994.

ROGERS, S.A.; MITCHELL, G.E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 5. Pasteurized milk and skim milk powder. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 44, n. 2, p. 57-60, 1989.

ROGERS, S.A.; SLATTERY, S.L.; MITCHELL, G.E.; HIRST, P.A.; GRIEVE, P.A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 3. individual proteins. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 49-52, 1989a.

ROGERS, S.A.; MITCHELL, G.E.; BARTLEY, J.P. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 4. non-protein constituents. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 44, n. 2, p. 53-56, 1989b.

ROUPAS, P. On-farm practices and post farmgate processing parameters affecting composition of milk for cheesemaking. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 56, n. 3, p. 219-232, 2001.

SAEMAN, A.I.; VERDI, R.J.; GALTON, D.M.; BARBANO, D.M. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 505-512, 1988.

SANTOS, M.V. Impacto econômico da mastite bovina. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 131, p. 46-50, 2003.

SANTOS, M.V. **Efeitos do nível de células somáticas e de gordura no leite, da temperatura de armazenamento e da multiplicação microbiana sobre a proteólise e lipólise do leite pasteurizado**. 2001. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D.M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 1601-1607, 2003a.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003b.

SENYK, G.F.; BARBANO, D.M.; SHIPE, W.F. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2189-2194, 1985.

SCHIFTAN, T.Z.; KOMATSU, I. Estudos sobre a composição de queijo Prato consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 207, p. 33-38, 1980.

SCHULTZ, J.G. **Efeito da utilização de slurry sobre a maturação de queijo Prato**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 3763-3774, 1991.

SLAVIN, S.; PETERSEN, G.E.; LINDHAL, P.C. Determination of heavy metals in meats by atomic absorption spectroscopy. **Atomic Absorption Newsletter**, v. 14, n. 3, p. 57-75, 1975.

SPADOTI, L.M. **Avaliação de propriedades do queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação**. 2003. 228 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SPADOTI, I.M.; DORNELLAS, J.R.F.; ROIG, S.M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 59, n. 3/4, p. 151-155, 2004.

SRINIVASAN, M.; LUCEY, J.A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 5, p. 1070-1078, 2002.

SVATI, J.; PANIJPAN, B. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 54, n. 9, p. 560-562, 1977.

SWAISGOOD, H.E. Symposium: genetic perspectives on milk proteins: comparative studies and nomenclature. Review and update of casein chemistry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 3054-3061, 1993.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 3, p. 772-782, 1991a.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leucocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 7, p. 2077-2081, 1991b.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 534-538, 1988.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E.; SENYK, G.F. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 2, p. 230-242, 1987.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A. ; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000, 726 p.

WIKING, L.; STAGSTED, J.; LENNART, B.; NIELSEN, J.H. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. **International Dairy Journal**, London, v. 14, n. 10, p. 909-913, 2004.

ZACHOS, T.; POLITIS, I.; GOREWIT, R.C.; BARBANO, D. Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. **Journal of Dairy Research**, London, v. 59, n. 4, p. 461-467, 1992.

ANEXO 1

Análise individual da CCS e da composição do leite para seleção das vacas

Foram ordenhados 42 vacas, a composição do leite e a CCS foram avaliadas(Tabela 1) e os animais foram selecionados conforme tabelas 2 e 3 para a obtenção de leite com CCS alta e baixa.

Tabela 1: Avaliação individual da composição e da CCS dos leites.

Amostra	Brinco	% gordura	% proteína	% lactose	% solidos totais	CCS (1.000 cél/mL)
1	563	4,5700	2,8800	4,3400	12,8200	647
2	567	3,2200	2,8000	4,0400	10,9000	415
3	566	3,3200	2,5300	4,1600	10,9700	289
4	342	2,8200	2,4300	3,9500	10,0700	947
5	572	3,9500	2,9600	4,3500	12,2600	1464
6	565	3,8900	2,7400	4,3200	11,9800	647
7	361	6,6000	3,8100	3,7400	14,6800	841
8	579	4,3100	3,4700	4,4800	13,2300	2466
9	575	5,1900	3,0000	3,8600	12,8000	447
10	559	4,8800	2,7500	4,4200	13,1500	52
11	21	3,5000	3,1000	4,1300	11,5500	1712
12	530	3,6900	3,0300	4,4200	12,1500	3609
13	475	5,3200	3,1500	3,9700	13,2100	338
14	546	3,5300	2,9800	4,4400	11,9800	1200
15	570	3,6200	2,7400	3,9100	11,0600	310
16	568	3,8800	2,7000	4,3300	11,9500	2120
17	560	2,6500	2,5900	4,1200	10,2800	369
18	498	4,1400	3,2000	3,9900	12,0700	504
19	542	3,9300	3,2200	4,6000	12,8200	215
20	543	3,2900	3,4000	4,4800	12,1200	417
21	531	3,7800	2,9200	4,5000	12,2800	161
22	536	3,8400	3,4000	4,6200	12,9100	357
23	555	3,0500	2,9000	4,4800	11,4800	588
24	523	3,3400	2,6700	4,4300	11,5200	496
25	376	3,2100	2,8200	4,4000	11,4700	771
27	556	3,9600	3,4000	4,5500	12,9300	265
28	564	3,1400	3,0300	4,6800	11,9900	132
29	411	3,2100	2,8500	4,0900	11,0100	146
30	450	4,5800	2,4800	4,3000	12,4500	27
31	569	2,3500	2,5200	4,0200	9,7600	107
32	535	2,8700	2,8900	4,5300	11,3700	271
33	534	3,3700	2,8800	4,5400	11,8900	109
34	512	3,1200	2,7400	4,6600	11,7300	362
35	580	3,9700	2,7900	4,1600	11,8500	94
36	548	2,8600	3,0100	4,4700	11,3700	200
37	540	2,4100	3,4600	4,6000	11,4500	455
38	532	2,5900	2,6200	4,4700	10,7900	181
39	474	2,2700	2,5900	4,2300	10,0600	44
40	581	2,7700	2,8700	4,4800	11,1700	94
41	478	3,0600	2,6100	4,1100	10,6900	13
42	465	3,9600	2,4800	4,1600	11,6000	269
43	Tanque	3,4200	2,8600	4,3200	11,5800	420

Tabela 2: Seleção das vacas – CCS baixa.

Seleção de vacas - CCS baixa				
Brinco	Produção (L)	% gordura	% Proteína	CCS (1.000 cél/mL)
512	15	3,1200	2,7400	362
543	13	3,2900	3,4000	417
478	5	3,0600	2,6100	13
542	11	3,9300	3,2200	215
564	12	3,1400	3,0300	132
	56	3,32	3,04	265,45

Tabela 3: Seleção das vacas – CCS alta

Seleção de vacas - CCS alta				
Brinco	Produção (L)	% gordura	% Proteína	CCS (1.000 cél/mL)
546	7,0	3,5300	2,9800	1200
568	13,0	3,8800	2,7000	2120
540	7,0	2,4100	3,4600	455
555	13,2	3,0500	2,9000	588
579	13,0	4,3100	3,4700	2466
	53,2	3,54	3,07	1393,62

ANEXO 2

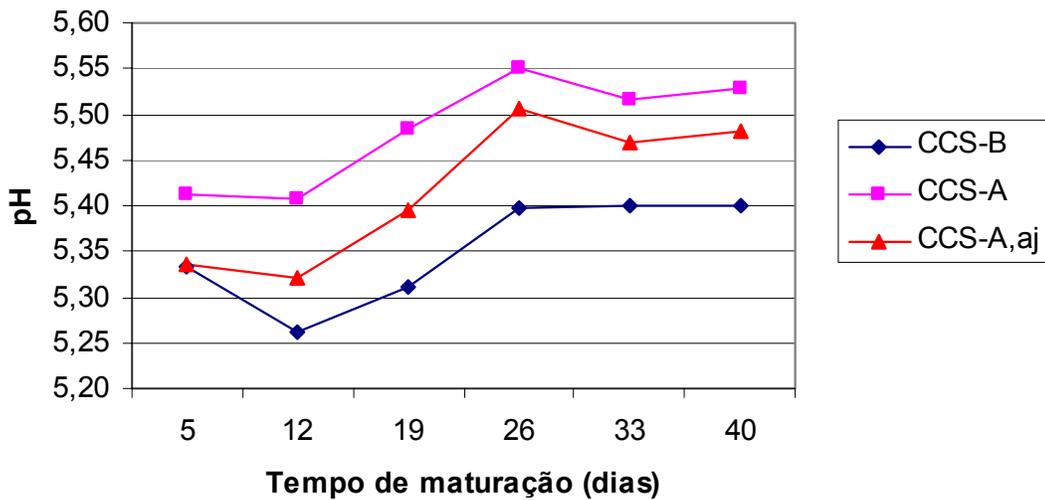


Figura 6.1: Comportamento médio do pH ao longo da maturação para os diferentes tratamentos (n=3).

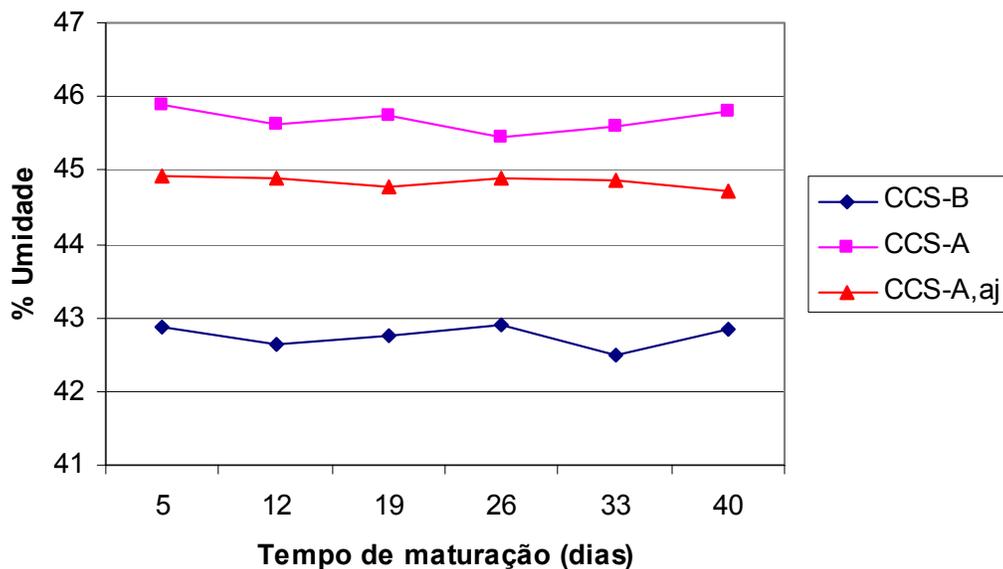


Figura 6.2: Comportamento médio da umidade ao longo da maturação para os diferentes tratamentos (n=3).

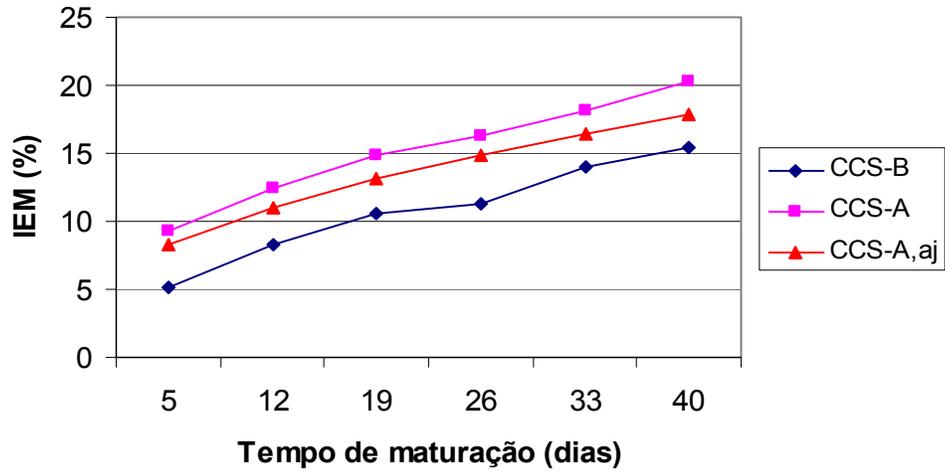


Figura 6.3: Comportamento médio do índice de extensão de maturação ao longo do tempo para os diferentes tratamentos (n=3).

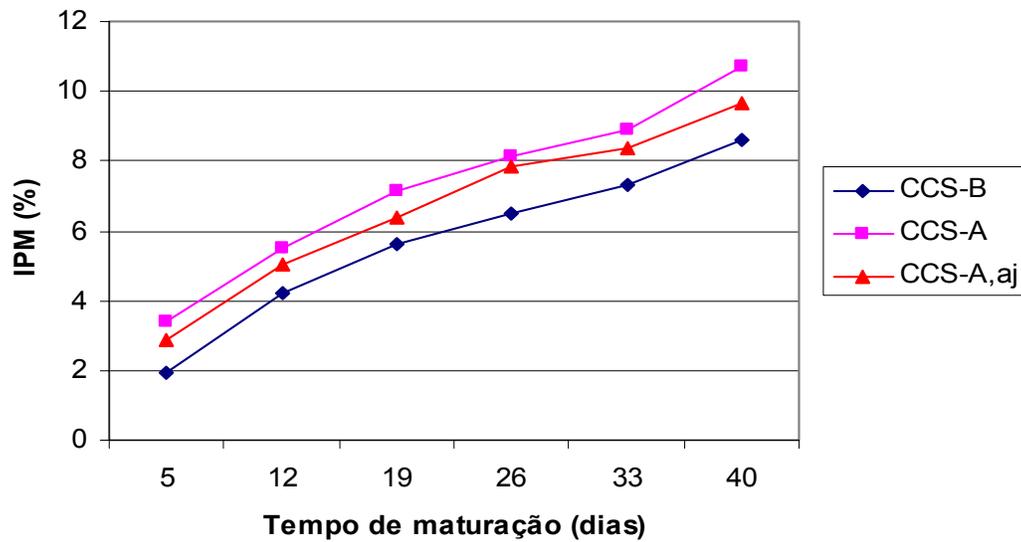


Figura 6.4: Comportamento médio do índice de profundidade de maturação ao longo do tempo para os diferentes tratamentos (n=3).

ANEXO 3

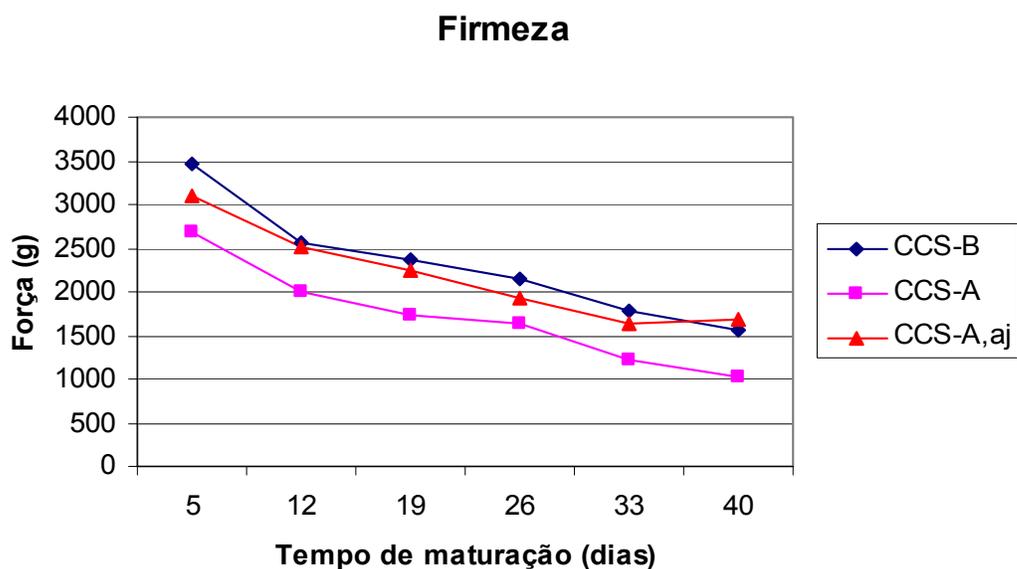


Figura 6.5: Comportamento médio da firmeza do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3).

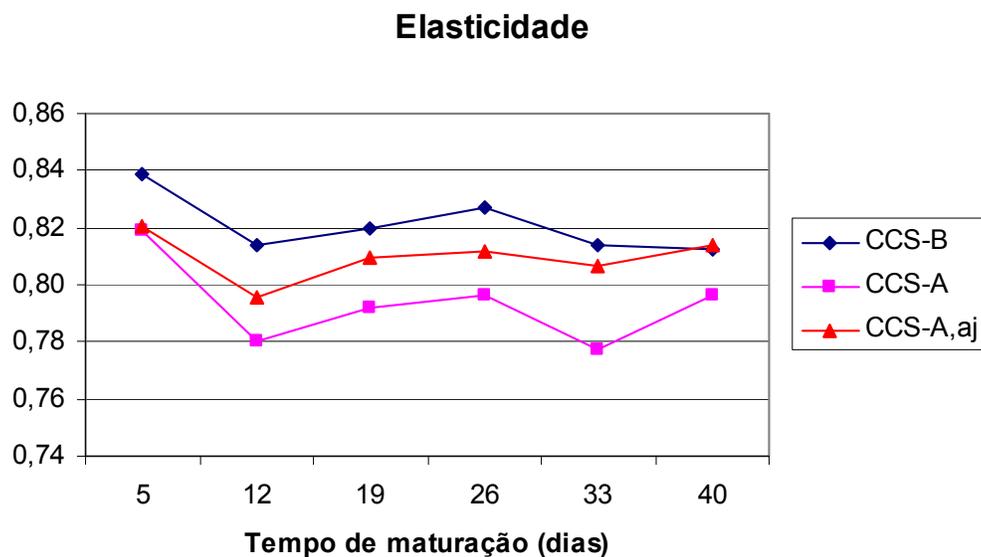


Figura 6.6: Comportamento médio da elasticidade do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3).

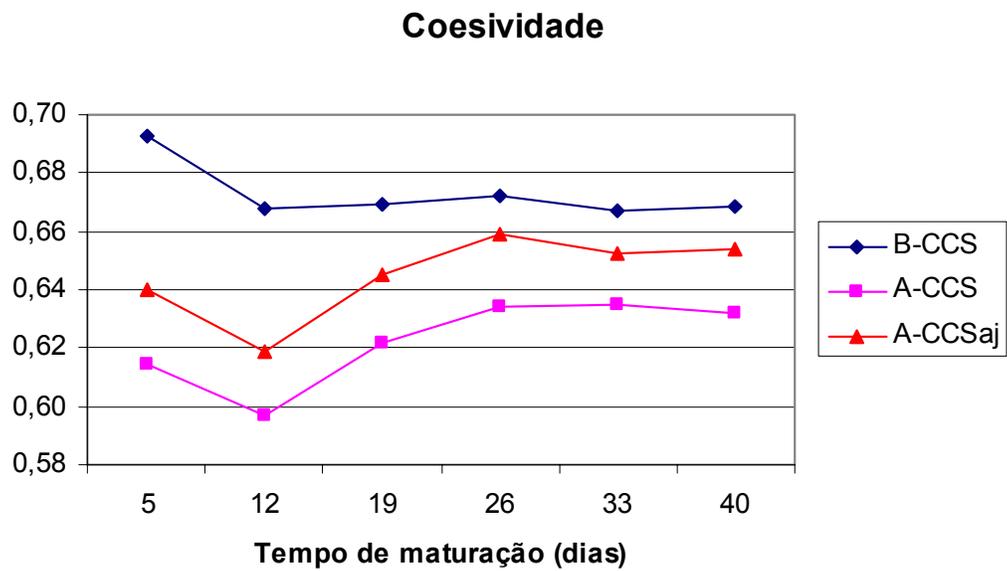


Figura 6.7: Comportamento médio da coesividade do queijo Prato durante a maturação para os diferentes tratamentos (n=3).