

JUNIO CESAR JACINTO DE PAULA

**EFEITO DO USO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>) NA  
FABRICAÇÃO DE QUEIJOS MINAS FRESCAL E MINAS PADRÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

JUNIO CESAR JACINTO DE PAULA

**EFEITO DO USO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>) NA  
FABRICAÇÃO DE QUEIJOS MINAS FRESCAL E MINAS PADRÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 21 de dezembro de 2010.

---

Prof. Paulo Henrique F. da Silva  
(Coorientador)

---

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu

---

Prof. Ana Clarissa dos Santos Pires

---

Prof. Maximiliano Soares Pinto

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
Orientador

*A Deus, que jamais põe um sonho em nosso  
coração sem nos dar os meios para  
concretizá-lo, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar presente em minha vida e pela motivação e sabedoria a mim concedidas todos os dias.

Aos meus pais que me criaram e me educaram e à minha família, pela presença constante em minha vida, mesmo longe do meu convívio diário.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela orientação, disponibilidade e atenção a mim dispensadas, durante todo o desenvolvimento desta pesquisa e durante o curso de doutorado.

Aos professores, Paulo Henrique F. da Silva, Luiz Ronaldo de Abreu, Maximiliano Soares Pinto e Ana Clarissa dos Santos Pires, pela amizade, pela participação na banca de defesa e pela ajuda na condução deste trabalho.

Aos professores Fernando Antônio Resplande Magalhães e Paulo César Stringheta, pela participação na banca de qualificação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À EPAMIG, pela oportunidade concedida.

À FAPEMIG, pelo suporte financeiro ao projeto, e pela concessão das bolsas PCRH e BIC.

Ao Laticínio Ita, na pessoa do Sr. José Flávio e dos responsáveis técnicos Janilson e André, por permitir e viabilizar o desenvolvimento da pesquisa e a execução do experimento em suas instalações industriais.

À empresa Air Liquide, pelo apoio técnico e pelo envio de materiais.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, por disponibilizarem para utilização os equipamentos: Secador de Ponto Crítico (marca Bal-Tec, modelo CPD 030), Pulverizador de ouro (marca Electron Microscopy Sciences modelo 550x) e Microscópio Eletrônico de Varredura (Leo, modelo 1430 VP), bem como às agências financiadoras dos aparelhos (FINEP/FAPEMIG/CNPq).

Aos professores Denise Sobral, Gisela M. Machado, Renata G. B. Costa, Paulo Henrique C. Paiva e Luiz Carlos G. Costa Junior, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos demais Professores do ILCT e do DTA, pela amizade e disposição em ajudar sempre, e por permitirem a utilização de seus laboratórios e dos materiais solicitados.

Aos bolsistas Lia e Felipe, pela colaboração na realização dos experimentos.

A Márcia Ribeiro, pela ajuda nas análises reológicas dos queijos.

Ao Sr. Paulo de Oliveira, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Professor Braz dos Santos Neves, pela contribuição no desenho do sistema de injeção de gás carbônico.

Aos amigos funcionários do ILCT e do DTA, pela dedicação e amizade.

Aos amigos Adhemar, Serginho, Fabrício, Ive, Maria, Frederico, Luciano Brás e Sérgio da Silva, pelo incentivo e companheirismo.

À professora Rozimar Gomes, pela formatação e revisão linguística da tese.

Aos amigos Adbeel, Erli e aos meus irmãos José Mauro e Márcio (*in memoriam*), que, mesmo ausentes da minha atual rotina, continuam presentes no meu coração.

A Kélvia pela imensa contribuição durante todo experimento e pela agradável companhia, paciência e atenção nas horas difíceis.

A todas as pessoas e instituições que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Junio Cesar Jacinto de Paula, filho de Jacinto Teófilo de Paula e Maria Iracema de Paula, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 05 de outubro de 1976.

Em janeiro de 1996, ingressou no curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, onde trabalhou por dois anos como estudante de iniciação científica da FAPEMIG, graduando-se em janeiro de 2000.

Entre os anos de 2000 e 2002, atuou como responsável técnico, supervisor de produção e representante técnico comercial em empresas do setor laticinista.

Em setembro de 2002, iniciou o Programa de Pós-graduação, em nível de mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 15 de fevereiro de 2005.

Em 2004, participou de programa de intercâmbio na Califórnia, EUA, trabalhando como trainee no laboratório de análises de vinhos da empresa J. Lohr Corporation.

Em julho de 2005, ingressou na EPAMIG como professor e pesquisador do Instituto de laticínios “Candido Tostes”, atuando em tecnologia de queijos.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-graduação, em nível de doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo o curso em 2010.

## ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Os queijos Minas .....	3
2.2. O dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) e sua utilização em leite e derivados.....	6
2.2.1. Características gerais do CO <sub>2</sub> .....	6
2.2.2. Dióxido de carbono como inibidor de microrganismos.....	8
2.2.3. Utilização de CO <sub>2</sub> em laticínios .....	11
2.2.3.1. Utilização de CO <sub>2</sub> em leite.....	11
2.2.3.2. Utilização de CO <sub>2</sub> em outros produtos lácteos.....	15
2.2.3.3. Efeito do CO <sub>2</sub> no pH e no equilíbrio mineral do leite para fabricação de queijos .....	18
2.2.3.4. Utilização de CO <sub>2</sub> em queijos e seus efeitos tecnológicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. Localização.....	24
3.2. Determinação do efeito do uso de CO <sub>2</sub> na fabricação dos queijos Minas Frescal e Minas Padrão .....	24

3.2.1.	Delineamento estatístico.....	25
3.2.2.	Análise dos resultados.....	25
3.2.3.	O sistema de injeção e as condições de carbonatação.....	26
3.2.4.	Fabricação do queijo Minas Frescal.....	27
3.2.5.	Fabricação do queijo Minas Padrão.....	29
3.2.6.	Análises físico-químicas do leite e do soro.....	31
3.2.7.	Análises físico-químicas dos queijos.....	32
3.2.8.	Análise do rendimento de fabricação.....	33
3.2.9.	Análises microbiológicas.....	35
3.2.10.	Análise sensorial.....	36
3.2.11.	Análise microestrutural.....	37
3.2.12.	Análise reológica.....	38
3.2.13.	Análise do perfil de textura (TPA).....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1.	Efeito do uso de CO <sub>2</sub> na fabricação de queijo Minas Frescal.....	40
4.1.1.	Composição físico-química do leite.....	40
4.1.2.	Composição físico-química dos queijos após a fabricação.....	42
4.1.3.	Composição físico-química do soro.....	44
4.1.4.	Análise de rendimento.....	46
4.1.5.	Efeito do uso de CO <sub>2</sub> nos tempos de fabricação.....	48
4.1.6.	Evolução do pH durante o tempo de armazenamento.....	50
4.1.7.	Evolução do teor de umidade durante o tempo de armazenamento.....	52
4.1.8.	Extensão e profundidade da proteólise em função do tempo.....	55
4.1.9.	Análises microbiológicas.....	61
4.1.9.1	Análises microbiológicas do leite.....	61
4.1.9.2	Análises microbiológicas dos queijos.....	62
4.1.9.2.1.	Contagem de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos do queijo em função do tempo.....	62
4.1.9.2.2.	Contagem de coliformes totais.....	64
4.1.9.2.3.	Contagem de fungos filamentosos e leveduras.....	65
4.1.10	Análise sensorial.....	67



4.1.10.1 Aceitação sensorial .....	67
4.1.10.2 Análise de preferência .....	69
4.1.11 Análise microestrutural .....	70
4.1.12 Análise reológica .....	73
4.1.12.1. Características mecânicas (TPA).....	78
4.2. Efeito do uso de CO <sub>2</sub> na fabricação de queijo Minas Padrão .....	82
4.2.1. Composição físico-química do leite .....	82
4.2.2. Composição físico-química do queijo após a fabricação .....	83
4.2.3. Composição físico-química do soro .....	84
4.2.4. Análise de rendimento .....	85
4.2.5. Efeito do uso de CO <sub>2</sub> nos tempos de fabricação .....	87
4.2.6. Perfil de pH durante a fermentação do queijo.....	90
4.2.7. Evolução do pH durante o tempo de armazenamento.....	92
4.2.8. Evolução do teor de umidade durante o tempo de armazenamento..	93
4.2.9. Extensão e profundidade da proteólise durante o tempo .....	94
4.2.10. Análises microbiológicas .....	99
4.2.10.1 Análises microbiológicas do leite.....	99
4.2.10.2 Análises microbiológicas dos queijos.....	99
4.2.10.3 Contagem de coliformes totais .....	99
4.2.10.4 Contagem de fungos filamentosos e leveduras .....	101
4.2.11. Análise sensorial em função do tempo.....	102
4.2.11.1 Aceitação sensorial .....	102
4.2.11.2 Análise de preferência .....	103
4.2.12. Análise microestrutural .....	104
5. CONCLUSÃO .....	106
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Atm	- Atmosfera
Ca <sup>2+</sup>	- Íon cálcio
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	- Ânion carbonato
DP	- Desvio padrão
EST	- Extrato seco total
GES	- Gordura no extrato seco total
g ST/L	- Gramas de sólidos totais por litro de leite trabalhado
GRAS	- “Generally Recognized as Safe”- Geralmente Reconhecido como Seguro
Coeficiente GL	- Gramas de sólidos totais por litro de leite trabalhado
H <sup>+</sup>	- Íon hidrogênio
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	- Ácido carbônico
HCl	- Ácido clorídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- Ânion bicarbonato
IMCU	- Umidade internacional de coagulação do leite
kgf/cm <sup>2</sup>	- Quilogramas força por centímetro quadrado
kPa	- Quilo pascal
kV	- Tensão de aceleração de voltagem
L/kg A	- Rendimento em litros por quilo ajustado

m/m	- Massa/massa
m/v	- Massa/volume
Mg	- Magnésio
Min	- Minuto
mm/s	- Milímetro por segundo
mol/L	- Mol por litro
N	- Newton
n	- Número de repetições
NMP	- Número Mais Provável por grama
NS <sub>TCA 12 %</sub>	- Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12% (m/m)
NT	- Nitrogênio total
NSLAB	- “Non-Starter Lactic Acid Bacteria” ou Bacterias lácticas não-iniciadoras
P	- Fósforo
Pa	- Pascal
R <sup>2</sup>	- Coeficiente de correlação
RDC	- Resolução da Diretoria Coletiva
RMF	- Resíduo Mineral Fixo
S/U	- Sal na umidade
$\eta^*$	- Viscosidade complexa
G''	- Componente viscoso ou módulo de perda
G'	- Componente elástico ou módulo de armazenamento
$\tan \delta = G''/G'$	- Tangente de fase
TCA	- Ácido tricloroacético
TPA	- Análise do perfil de textura
UFC	- Unidade formadora de colônia

## RESUMO

PAULA, Junio Cesar Jacinto de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Efeito do uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na fabricação de queijos Minas Frescal e Minas Padrão.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-orientadores: Paulo Henrique Fonseca da Silva e Luis Antônio Minim.

A pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> para a fabricação de queijos pode trazer benefícios tecnológicos e econômicos. Ao contrário de outros ácidos, grande parte do ácido carbônico formado pela solubilização do CO<sub>2</sub> é perdida durante o processo de fabricação e pode ser removida facilmente do soro. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar, em escala industrial, os efeitos tecnológicos da utilização de dióxido de carbono dissolvido no leite pasteurizado para a fabricação dos queijos Minas Frescal e Minas Padrão. O experimento consistiu em avaliar dois métodos de incorporação de CO<sub>2</sub> no leite pasteurizado para a fabricação dos queijos: injeção de CO<sub>2</sub>, sob pressão, no leite a 32 °C até pH 6,30 e adição de 5 % de água carbonatada ao leite no tanque de fabricação, além do tratamento controle (sem CO<sub>2</sub>). Esse procedimento foi realizado em três repetições. Os tempos de fabricação, a composição físico-química, o rendimento, a evolução dos índices de maturação, a aceitabilidade e preferência sensorial e a microestrutura foram determinados para ambos os queijos. Procedeu-se, ainda, a determinações da capacidade de acidificação do fermento láctico utilizado na

fabricação do queijo Minas Padrão e foram analisadas as propriedades mecânicas e reológicas do queijo Minas Frescal. Foi observado que os queijos Minas produzidos com leite pré-acidificado com injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram reduções significativas nos tempos de coagulação e no tempo total de fabricação para ambos os queijos. O tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> no leite reduziu o pH (5,95) e o teor de umidade (60,18 %, m/v) do queijo Minas Frescal ao longo do tempo de armazenamento, devido ao seu maior dessoramento. A menor porcentagem de perda de proteína encontrada no soro de ambos os queijos tratados com injeção de CO<sub>2</sub> não influenciou significativamente os demais índices de rendimento. Tal fato pode ser atribuído ao maior dessoramento provocado pela microestrutura mais compacta e mais porosa observada em ambos os queijos tratados com injeção de CO<sub>2</sub>. Em razão do maior dessoramento e da microestrutura mais compacta, o queijo Minas Frescal tratado com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou maior firmeza e fraturabilidade em relação às análises de perfil de textura. A firmeza aumentou linearmente ao longo do tempo de armazenamento por 40 dias, variando de 18,65 N a 25,85 N bem como o comportamento sólido (elástico) observado em relação à análise reológica que variou de 37946,67 Pa a 85636,67 Pa. As formas de incorporação de CO<sub>2</sub> não afetaram o perfil fermentativo da cultura láctica no queijo Minas Padrão, bem como não alteraram a preferência ou a aceitabilidade sensorial, com média de sete pontos na escala hedônica de nove pontos, sendo classificado com o termo hedônico “gostei moderadamente”. As contagens microbiológicas ao longo do tempo de estocagem também não foram influenciadas pelos tratamentos ( $p > 0,05$ ), exceto em relação à contagem de *Staphylococcus aureus*, que foi não detectável pela técnica utilizada para os queijos Minas Frescal tratados com injeção de CO<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

PAULA, Junio Cesar Jacinto de, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Effect of the carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) use in Minas Frescal and Minas Padrão cheese-making.** Advisor: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-Advisors: Paulo Henrique Fonseca da Silva and Luis Antônio Minim.

The preacidification of cheese milk with CO<sub>2</sub> can bring technological and economic benefits. Unlike other acids, a great part of the carbonic acid formed by the CO<sub>2</sub> solubilization is lost during the cheese-making and can easily be removed from the whey. The main objective of this work was to determine, on industrial scale, the technological effects of the preacidification of pasteurized milk with dissolved CO<sub>2</sub> on Minas Frescal and Minas Padrão cheese-making. The experiments were carried out with two methods of incorporating CO<sub>2</sub> into pasteurized cheese milk: CO<sub>2</sub> injection, under pressure in the milk at 32 °C until to reach pH 6.30 and addition of 5 % of carbonated water to the cheese milk in the cheese vat, besides the control treatment (without CO<sub>2</sub>). This procedure was performed three times. The cheese-making times, physicochemical properties, cheese yield, changes during the storage time, sensory acceptability and preference and microstructure were determined in both cheeses. Besides acidification of lactic starter culture used in Minas Padrão cheese and mechanical and rheological properties of Minas Frescal cheese were even determined. It was

observed that Minas cheeses produced with milk preacidified with CO<sub>2</sub> injection showed significant reductions in coagulation and total making times for both cheeses. The treatment with CO<sub>2</sub> injection in the cheese milk reduced the pH (5,95) and the moisture content (60,18 %, m/v) of Minas Frescal cheese during the storage time due to their larger whey loss. The smallest percentage of protein content found in the whey of both cheeses treated with CO<sub>2</sub> injection did not significantly affect the others cheese yield indices. This fact could be attributed to increased whey loss caused by the more compact and more porous microstructure found in both cheeses with CO<sub>2</sub> injection. Due to the increased whey loss and more compact microstructure, the Minas Frescal cheese treated with CO<sub>2</sub> injection showed higher firmness and brittleness in relation to the texture profile analysis. The firmness increased linearly over the storage time during 40 days varying from 18,65 N until 25,85 N. Even the solid (elastic) Behavior observed in relation to the rheologic analysis that varied from 37946,67 Pa until 85636,67 Pa. The treatments did not affect the lactic acid fermentation in Minas Padrão cheese and did not change the preference or the sensory acceptability that reach an average of seven points in the nine-point hedonic scale, being classified with the hedonic term "liked moderately". The microbiological counts over storage time were not affected by the treatments ( $p>0,05$ ), except for the *Staphylococcus aureus* counts, which was undetectable, by the used technique, for Minas Frescal cheese treated with CO<sub>2</sub> injection.

## **1. INTRODUÇÃO**

O mercado lácteo está em constante mudança e as pressões econômicas internas e externas na indústria de laticínios estão crescendo cada vez mais em todo o mundo. Internamente, por causa do processo de concentração entre as empresas e, externamente, em razão da situação econômica global. Sendo assim, recursos tecnológicos que melhorem a qualidade dos produtos e aumentem a competitividade e a produtividade da indústria de laticínios são atrativos do ponto de vista econômico. Dentro desse contexto, o uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) tem despertado grande interesse por ser de aplicação simples, ser seguro e de baixo custo. Pesquisas em países economicamente estáveis têm demonstrado que o uso do CO<sub>2</sub> na indústria de queijos ocasiona diversos benefícios tecnológicos como diminuição do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada, maior liberação de soro, redução da dose de coalho, melhor controle do processo e alterações no rendimento.

Dentre os queijos de massa crua, o queijo Minas Frescal tem grande aceitação e popularidade no mercado, fazendo parte do hábito alimentar brasileiro, o que decorre de algumas características como alta aceitabilidade sensorial, preços mais acessíveis a uma maior faixa da população, facilidade de fabricação, bom rendimento e preparo rápido. Com alto teor de umidade, o queijo Minas Frescal é um queijo de consumo rápido, com pouca durabilidade, dependendo da qualidade do leite e do processo de fabricação utilizado. Esses



queijos são altamente perecíveis, sendo susceptíveis às condições inadequadas de transporte e estocagem nas gôndolas dos mercados distribuidores. Atualmente, há uma tendência na indústria de alimentos de substituição dos métodos de prevenção que alterem química e fisicamente os alimentos por métodos menos severos. Dessa forma, grande atenção tem sido dada a novas tecnologias de processamento e acondicionamento, tais como atmosfera modificada, embalagens ativas, adição de CO<sub>2</sub>, dentre outras.

Os benefícios tecnológicos e econômicos gerados pela utilização do CO<sub>2</sub> são suficientes para incentivar as pesquisas com utilização de CO<sub>2</sub> dissolvido no leite para a fabricação de queijos, não existindo na literatura trabalhos que avaliem, industrialmente, os efeitos da incorporação do CO<sub>2</sub> no leite para a fabricação dos queijos Minas Frescal e Padrão.

O objetivo geral do trabalho foi avaliar, em escala industrial, os impactos da utilização de CO<sub>2</sub> dissolvido no leite para a fabricação desses queijos. Os objetivos específicos foram avaliar dois processos de incorporação de CO<sub>2</sub> no leite para a fabricação dos queijos e verificar os seus efeitos nos aspectos tecnológicos de fabricação, nas características físico-químicas e microbiológicas, nos rendimentos, na evolução dos índices de maturação durante o armazenamento, na aceitabilidade sensorial, na microestrutura, na capacidade de acidificação do fermento láctico utilizado na fabricação do queijo Minas Padrão e nas propriedades mecânicas e reológicas do queijo Minas Frescal.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Os queijos Minas**

No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, regulamentado pela Portaria 146 de 1996, define queijo como sendo o produto fresco ou maturado obtido da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Conceitua-se queijo Minas Frescal como queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite e, ou outras enzimas coagulantes apropriadas, completadas ou não, com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo fresco, semigordo e de muito alta umidade (geralmente conhecido como queijo de massa branda, mole ou macia), possui formato cilíndrico, massa entre 0,3 kg e 5,0 kg, cor esbranquiçada, odor suave característico e baixa acidez (BRASIL, 2004). Trata-se de um queijo de curta durabilidade no mercado, demandando consumo rápido, em função de seu alto

teor de umidade, geralmente produzido em fábricas de pequeno, médio e grande porte.

O Queijo Minas Padrão, Minas Curado, Minas Padronizado ou Minas Prensado é um queijo de origem brasileira, produzido em vários estados. É um queijo de massa prensada que utiliza fermento láctico mesofílico, adicionado ao leite durante sua fabricação e possui um período de maturação curto que varia de 20 a 30 dias em câmara fria a 10 – 12 °C. Normalmente, o seu teor de umidade varia entre 46 % e 49 % (m/m), apresenta formato cilíndrico, com faces planas, bordas retas, massa de 800 a 1.200 g, crosta lisa e amarelada.

Possui ainda textura aberta, com poucas e pequenas olhaduras mecânicas. Sua consistência é semidura, tendendo a macia e quebradiça, com cor interna branca, tendendo a creme e apresenta sabor levemente ácido (PAULA, 2005b, LONDOÑO, 1999). Apesar da sua relevância e da significativa produção nacional, ainda não há uma normalização específica para o Queijo Minas Padrão na legislação brasileira. A importância dos queijos Minas no mercado brasileiro consiste no fato de possuírem alto rendimento, baixo custo final, simplicidade no processo de fabricação, alta aceitabilidade e preços acessíveis a uma maior faixa da população (FURTADO, 2005).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite, respondendo por 4,52 % da produção mundial. Minas Gerais, por sua tradição, clima e topografia, é o maior estado produtor de leite e queijos do Brasil, sendo responsável por mais da metade da produção nacional. A fabricação de queijos no Brasil é o principal destino do leite produzido e, em torno de 33 % do leite captado, sob inspeção federal, é destinado a esse setor (EMBRAPA, 2008). A produção de queijos tem aumentado expressivamente nos últimos anos e os maiores aumentos alcançados ocorreram nos anos em que a população apresentou maior poder aquisitivo, ou seja, após a implantação do plano real. Em 2009, a produção de queijos produzidos sob inspeção (formal) foi de 721.411 t, com aumento de 7,8 % sobre a produção de 2008. Contudo, considerando que o mercado de queijos formais equivale a 60 % do mercado total, pode-se concluir que o mercado de queijos no Brasil ultrapassou um milhão de toneladas em 2009 (ABIQ, 2010). Entre os

queijos de massa crua, o Minas Frescal e o Minas Padrão são os mais populares e representam juntos cerca de 8 % do mercado brasileiro, ocupando a terceira posição no consumo. Em 2009, o queijo Minas Frescal foi o quinto queijo mais fabricado no Brasil, com um volume total de 37.100 t, apresentando um aumento de 7 % em relação ao ano anterior. No caso do queijo Minas Padrão, foi fabricado, em 2009, um volume total de 8.050 t, o que representa um crescimento de 10 % no volume produzido em relação ao ano de 2008 (ABIQ, 2010).

Foram identificados vários pontos críticos no processamento desses queijos, destacando-se a matéria-prima, o tanque de coagulação e a salmoura. As bactérias do grupo coliformes são indicativas de condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento desses queijos. Os microrganismos psicrotóxicos têm destaque especial por alterarem os produtos sob refrigeração por causa da produção de enzimas (lipases e proteases) que degradam os lipídeos e as proteínas, resultando em alterações sensoriais e de textura desses produtos (SANGALETTI, 2007). Diversos surtos de doenças têm sido associados à ingestão de queijos, em razão, principalmente, da presença de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. Falhas ocorridas durante todo o processamento, aliadas a temperaturas inadequadas de conservação durante a comercialização, são fatores que têm contribuído para venda desses produtos fora dos padrões regulamentares (SANGALETTI, 2007).

A dificuldade de exportação e os principais problemas com a produção de queijos no Brasil estão relacionados principalmente com a baixa qualidade do leite produzido, as péssimas condições de fabricação e a falta ou ineficiência da cadeia de frio. Um estudo realizado por Lisita (2005) avaliou a evolução da contaminação em uma linha de fabricação de Minas Frescal. Os resultados demonstraram que o Minas Frescal, antes de ser embalado, já se apresentava impróprio para o consumo, em razão das altas contagens de coliformes totais e termotolerantes, podendo causar riscos aos consumidores. O próprio processo de fabricação foi responsável pela alta contaminação, constituindo um problema de saúde pública.

## 2.2. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e sua utilização em leite e derivados

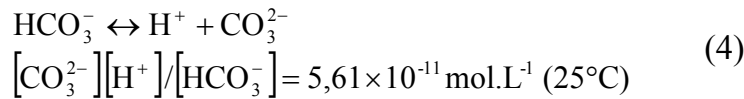
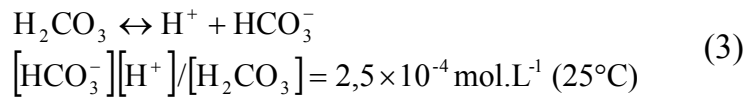
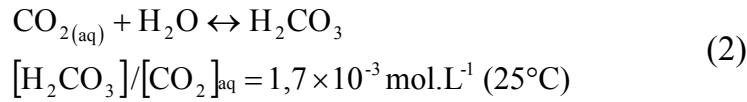
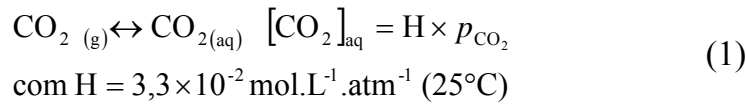
### 2.2.1. Características gerais do CO<sub>2</sub>

O dióxido de carbono está distribuído na natureza como um gás livre no ar normal em níveis de 0,03 a 0,04 % ou como sais e compostos na forma de sais como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, dentre outros. Em pressões e temperaturas normais, o dióxido de carbono é um gás incolor, inodoro, não combustível, não tóxico e levemente ácido, com as seguintes propriedades físicas e químicas: massa molecular: 44,01 g/mol, densidade relativa = 1,519 g/L (densidade do ar = 1 g/L) a 21 °C, temperatura crítica = 30,9 °C, pressão crítica = 75,34 kgf/cm<sup>2</sup>, volume específico = 0,55 m<sup>3</sup>/kg, temperatura de ebulição = - 78,5 °C, temperatura de sublimação = - 56,6 °C, massa específica a 21 °C e a 1 atm = 1,833 kg/m<sup>3</sup> (JACOBS, 1959).

O CO<sub>2</sub> é considerado um antimicrobiano natural, com ação bacteriostática, possui grande potencial para utilização na indústria de laticínios, sendo uma substância que pode ser adicionada durante o processo de fabricação e removida por processos de centrifugação ou degaseificação a vácuo, sem nenhum efeito prejudicial para o alimento. É considerado inócuo ao consumo humano, como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*), e não precisa ser declarado no rótulo dos produtos, seu efeito inibitório sobre os microrganismos é dependente da concentração e conseqüentemente da temperatura, sendo mais solúvel em temperaturas de refrigeração (LOSS e HOTCHKISS, 2003). A solubilidade do CO<sub>2</sub> em água a 0 °C e 1 atm é 3,38 g de CO<sub>2</sub> por kg de H<sub>2</sub>O, no entanto a 20 °C a solubilidade é reduzida para 1,73 g de CO<sub>2</sub> por kg de H<sub>2</sub>O (PESTANA, 2007). O CO<sub>2</sub> é solúvel no leite mesmo durante o processo de fabricação de queijos de massa crua, em temperatura de 38 °C, podendo permanecer nos produtos durante a maturação, estocagem e distribuição (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

Nos alimentos com alto teor de umidade, o CO<sub>2</sub> pode se dissolver na fase aquosa, formando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que se dissocia nas espécies iônicas

bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), de acordo com a seguinte série de equilíbrios:



As notações (g) e (aq) referem-se ao estado das espécies gás ou solução aquosa. Em condições atmosféricas normais, a concentração de dióxido de carbono dissolvido (não hidratado),  $\text{CO}_2 (\text{aq})$ , pode estar relacionada com a pressão parcial externa do  $\text{CO}_2$  ( $p_{\text{CO}_2}$ ) e a constante da lei de Henry (H). A Lei de Henry, no entanto, exige um comportamento de um gás ideal e uma solução diluída. Sob condições de pressão de  $\text{CO}_2$ , esses pressupostos não são necessariamente válidos. Além disso, as constantes de equilíbrio das reações (2) a (4) são dependentes da pressão e da temperatura. No entanto, modelos termodinâmicos melhorados têm sido desenvolvidos para prever com precisão a solubilidade e o pH do  $\text{CO}_2$  em soluções aquosas, sob pressão (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

Como consequência das equações de equilíbrio (1) a (4), a água em contato com  $\text{CO}_2$  pressurizado, em geral, torna-se ácida por causa da formação e dissociação do  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , que libera íons  $\text{H}^+$ . A redução do pH extracelular pode inibir a multiplicação microbiana e também pode diminuir a resistência à inativação, dado o maior consumo de energia para manter a homeostase por meio da força motriz de prótons. No entanto, a redução do pH externo não é suficiente para ser responsável pelo efeito letal do  $\text{CO}_2$ , uma vez que demonstra inibição

maior do que a de outros ácidos usados para reduzir o pH do meio (como o ácido clorídrico e fosfórico). Esses ácidos parecem não ter a mesma capacidade de entrar nas células microbianas tão facilmente como o CO<sub>2</sub>. Alguns autores sugerem que o abaixamento de pH externo contribui para aumento da permeabilidade celular, o que facilita a penetração de CO<sub>2</sub> nas células microbianas. Segundo esses autores, isso provavelmente explica por que o CO<sub>2</sub> pode penetrar nas células microbianas a uma taxa muito mais rápida do que outras moléculas que não produzem acidificação da solução. No entanto, é mais provável que o efeito direto do CO<sub>2</sub> (não hidratado) sobre a membrana seja provavelmente mais importante para explicar sua elevada taxa de penetração nas células bacterianas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

O equilíbrio da reação é determinado pelo pH da fase aquosa. A solubilidade do CO<sub>2</sub> aumenta com o aumento no pH, e esse efeito é mais visível em valores de pH elevados. Isso pode ser explicado pelas reações de equilíbrio que ocorrem quando o CO<sub>2</sub> se dissolve no alimento. Sendo assim, pode-se afirmar que o pH ou o poder tamponante do meio no qual o CO<sub>2</sub> é dissolvido irá afetar o seu mecanismo de ação, principalmente o teor de ácido carbônico dissolvido no meio (PESTANA, 2007).

Dióxido de carbono e os íons H<sup>+</sup> são em parte responsáveis pelos efeitos inibitórios do CO<sub>2</sub>, porém, foi provado que os íons de bicarbonato e carbonato também possuem efeito antimicrobiano sobre diversos grupos microbianos (DIEZ-GONZÁLEZ et al., 2000; CORRAL et al., 1988).

### **2.2.2. Dióxido de carbono como inibidor de microrganismos**

Quando dissolvido no meio aquoso, o CO<sub>2</sub> pode retardar a multiplicação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo que seu efeito inibidor varia em função do microrganismo e da fase na curva de crescimento em que ele se encontra. O dióxido de carbono é muito usado para estender a vida de prateleira de alimentos perecíveis, por meio da inibição de diversas enzimas naturais e microbianas e do retardamento da multiplicação de bactérias,

particularmente aquelas encontradas no leite e nos produtos lácteos. O efeito combinado do CO<sub>2</sub> e outras técnicas de conservação de alimentos como refrigeração, pasteurização ou embalagens impermeáveis tem sido demonstrado (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

As moléculas de gás carbônico são apolares e, portanto, mais solúveis em lipídios do que em água. Essa característica aumenta seu efeito antimicrobiano ao facilitar sua dissolução na membrana plasmática bacteriana, alterando sua fluidez e permitindo maior entrada de ácido carbônico, na forma não dissociada, para o interior da célula, criando um ambiente tóxico e modificando seu pH interno (LOSS e HOTCHKISS, 2003). O mecanismo pelo qual o CO<sub>2</sub> afeta a multiplicação microbiana e seu metabolismo ainda não foi totalmente elucidado, sendo que quatro principais teorias foram propostas por Loss e Hotchkiss, 2003:

- A solubilidade do CO<sub>2</sub> nos lipídeos pode afetar a estabilidade da membrana celular;
- As reações de solubilização resultam na redução do pH intracelular criando estresse ambiental, além de provocar também gasto de energia para manter a homeostase por meio da força motriz ao ativar o mecanismo de bomba de hidrogênio.
- Como metabólito de diversas reações, o CO<sub>2</sub> pode provocar desperdício de energia celular;
- CO<sub>2</sub> pode provocar alterações físico-químicas e regular diversas enzimas importantes.

Dependendo dos fatores intrínsecos a que o microrganismo está exposto e, ou do seu estado físico, uma combinação desses mecanismos seria a provável causa para o efeito antimicrobiano do CO<sub>2</sub> (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

Para Daniels et al. (1985), uma das principais explicações para a adição de dióxido de carbono em alimentos é o fato de que, sendo um gás mais pesado, desloca parte ou a totalidade do oxigênio viável necessário ao metabolismo bacteriano, diminuindo o crescimento. Com a eliminação do O<sub>2</sub> pela substituição da atmosfera por dióxido de carbono, é criado um ambiente de anaerobiose, ocorrendo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons pela falta do O<sub>2</sub> como



acceptor final de elétrons. A microbiota aeróbia é inibida desfavorecendo a multiplicação de contaminantes como fungos filamentosos e leveduras.

Genigeorgis (1985) sugere que a atividade antimicrobiana do CO<sub>2</sub> se deve à sua absorção pela fase aquosa, formando o ácido carbônico, seguido de sua ionização e conseqüente abaixamento do pH. Segundo Daniels et al. (1985) e Dixon e Kell (1989), a ação do CO<sub>2</sub> sobre a microbiota tem sido atribuída a vários fatores, e não apenas ao pH baixo.

O efeito final do dióxido de carbono seria o retardamento da fase lag e, ou da taxa de multiplicação na fase log de microrganismos deterioradores. Entretanto, o mecanismo específico para o efeito inibidor ainda não foi proposto pelos autores (DANIELS et al., 1985; CHURCH e PARSONS, 1995; FARBER, 1991 e PHILLIPS, 1996). Para Farber (1991), as principais teorias de ação do CO<sub>2</sub> sobre os microrganismos seriam a alteração na função da membrana celular, afetando a absorção de nutrientes; inibição direta do sistema enzimático e na taxa de respiração; penetração do CO<sub>2</sub> pela membrana microbiana, resultando na mudança interna do pH e mudança direta nas propriedades físico-químicas das enzimas responsáveis pelo metabolismo celular.

Outros fatores como concentração final e inicial do gás, temperatura de estocagem e quantidade de gás dissolvido, assim como estágio da curva de multiplicação inicial, além de fatores como pH, A<sub>w</sub> (atividade de água), concentração de sal e açúcar, também exercem influência sobre a atividade inibidora do CO<sub>2</sub> (PHILLIPS, 1996; SARANTÓPAULOS et al., 1998). A solubilidade do CO<sub>2</sub> é inversamente proporcional à temperatura de estocagem, sendo que a multiplicação microbiana é reduzida a altas concentrações de CO<sub>2</sub> e o efeito global é aumentado com o abaixamento da temperatura durante a estocagem (GILL e TAN, 1980).

O dióxido de carbono é mais eficaz em alimentos em que os microrganismos deterioradores são normalmente aeróbios, Gram-negativos e psicrotróficos, fato esse que incentiva ainda mais a sua utilização para estender a vida útil de produtos lácteos (DANIELS et al., 1985; CHURCH e PARSONS, 1995 e PHILLIPS 1996). No entanto, deve-se atentar especialmente para o fato

de que inibir a multiplicação de microrganismos naturalmente associados com o produto pode resultar em aumento do número de organismos diferentes, os quais podem ser microrganismos patogênicos para o homem (CRUZ, 2000).

### **2.2.3. Utilização de CO<sub>2</sub> em laticínios**

O dióxido de carbono tem sido empregado para aumentar a vida de prateleira de alimentos refrigerados, inibindo a multiplicação de microrganismos deterioradores, como bactérias psicrotróficas (GUILLAUME et al., 2004). A refrigeração do leite preconizada pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento produz condições que são seletivas para bactérias psicrotróficas, principalmente *Pseudomonas* ssp. Esse grupo de microrganismo é responsável pela deterioração de leite e produtos lácteos por causa da sua capacidade de produzir enzimas termorresistentes (proteases e lipases) que afetam o rendimento e a qualidade dos produtos. Rowe (1988) mostrou que a adição de CO<sub>2</sub> tem um efeito diferencial na produção de enzimas extracelulares por *Pseudomonas fluorescens*, particularmente lipase, sendo inibida em maior extensão do que a multiplicação bacteriana.

Como resultado da busca de melhorias econômicas na indústria de laticínios, existe uma demanda por métodos que permitam prolongar a estocagem do leite, e dos produtos lácteos, sem riscos subsequentes e que permitam maior flexibilidade na sua utilização.

#### **2.2.3.1. Utilização de CO<sub>2</sub> em leite**

Gevaudan et al. (1996) relataram que a injeção de CO<sub>2</sub> sob pressão diminui o pH do leite e, após a despressurização, o pH retorna ao seu estado inicial. No estudo não foram observadas mudanças na concentração de P, Ca, ou Mg na fase aquosa do leite após a ultracentrifugação. No entanto, as curvas de capacidade

tamponante do leite despressurizado que foi tratado com o CO<sub>2</sub> foram diferentes daquelas do leite original. Foram observados dois picos (pH 4,95 e 5,40) na curva de capacidade tamponante, em vez de um, demonstrando que a solubilização de CO<sub>2</sub> induziu a formação de um novo sistema de salino. Sendo assim, o CO<sub>2</sub> tem um efeito reversível no pH e um efeito irreversível no fosfato de cálcio coloidal inorgânico, o qual é transformado em outras formas salinas.

A aplicação de CO<sub>2</sub> sob pressão durante o tratamento térmico do leite pode reduzir o tempo requerido para a esterilização ou pasteurização e, portanto, minimizar a degradação térmica de substâncias sensíveis como vitaminas (ERKMEN, 2001).

O prazo de validade do leite pasteurizado refrigerado poderia ser estendido por no mínimo 25 até 200 % em concentrações próximas ao limiar de percepção sensorial ( $> 0,0028$  mol/L e  $\leq 0,0091$  mol/L de CO<sub>2</sub>) com o uso de embalagens que ofereçam barreira à evolução do CO<sub>2</sub>, proporcionando maior retenção do gás no meio e otimizando o seu efeito durante a validade. As maiores variáveis que influenciam no tempo de vida útil são as quantidades de CO<sub>2</sub> adicionado e as propriedades de barreira da embalagem (HOTCHKISS et al., 1998).

O tratamento do leite refrigerado com 20 a 30 mmol/L de CO<sub>2</sub> foi avaliado como um método para prolongar a vida útil e inibir a multiplicação de bactérias psicrotróficas. Os tempos de geração para cada uma das cinco espécies *Pseudomonas* foram significativamente superiores quando cultivados a 7 °C em leite estéril tratado com CO<sub>2</sub> comparando-se as mesmas bactérias cultivadas em leite estéril sem adição do gás. Quando os leites crus foram armazenados a 7 °C e tratados com o CO<sub>2</sub>, o tempo necessário para aumentar a contagem de 10 vezes foi pelo menos 24 h maior do que nos mesmos leites não tratados. Também o número de coliformes totais, psicrotróficos e aeróbios e anaeróbios facultativos foram significativamente menores no leite cru tratado com CO<sub>2</sub> que no leite não tratado incubado a 7 °C por seis dias. (ROBERTS e TORREY, 1988). O número de coliformes, psicrotróficos e aeróbios (facultativos e obrigatórios), foi significativamente mais baixo no leite cru tratado com CO<sub>2</sub> que em leite não tratado incubado a 7 °C por seis dias. O tratamento a 101,97 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão

de CO<sub>2</sub> por sete horas causou a diminuição de 6,42 e 7,24 ciclos logaritmos na população de *E. coli* em leite integral e leite desnatado, respectivamente, quando inoculados com culturas puras não patogênicas desses microrganismos (ERKMEN, 2001).

King e Mabbitt (1982) examinaram o efeito de concentrações de 0,01 mol/L a 0,03 mol/L de CO<sub>2</sub> na multiplicação de bactérias psicrófilas em leite integral cru e em culturas puras de *P. fluorescens* em leite desnatado e caldo nutriente. A deterioração de leite integral cru foi inibida pela adição de CO<sub>2</sub> e o efeito foi aumentado com o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> e diminuição da temperatura de estocagem. Experimentos com culturas puras de *Pseudomonas fluorescens* mostraram que o efeito inibitório do CO<sub>2</sub> não decorreu do aumento da acidez ou do deslocamento de oxigênio, mas da presença do CO<sub>2</sub>, o qual induziu aumento da duração da fase lag de multiplicação e teve um pequeno efeito na fase log.

Werner e Hotchkiss (2002) pesquisaram o efeito do CO<sub>2</sub> na multiplicação de esporos de *Bacillus cereus* no leite durante a estocagem prolongada e concluíram que a adição de 0,0119 mol/L de CO<sub>2</sub> reduziu o pH do leite de 6,61 para 6,31. Os dados sugerem que a adição de moderados níveis de CO<sub>2</sub> inibem a germinação de esporos de *Bacillus cereus*, durante longos períodos de estocagem, diminuindo o risco de doenças alimentares por esses microrganismos.

Foi avaliado o efeito de concentrações de CO<sub>2</sub> dissolvido (0,0006 a 0,0614 mol/L) na multiplicação bacteriana em leite cru e em culturas puras inoculadas em leite estéril a 15 °C utilizando condutância. Os leites estéreis foram inoculados isoladamente com um e seis microrganismos diferentes (*P. fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*) até uma concentração final de aproximadamente 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL. O leite cru foi ajustado com uma população bacteriana de aproximadamente 10<sup>3</sup> UFC/mL. Em todos os casos, o CO<sub>2</sub> dissolvido inibiu a multiplicação de bactérias do leite cru, e influenciou as fases lag, exponencial e estacionária, bem como em todas as culturas puras testadas. A adição de CO<sub>2</sub> no leite cru aumentou a fase lag e o tempo de multiplicação em 100 %, mesmo a

15 °C. O CO<sub>2</sub> dissolvido reduziu a multiplicação microbiana em todos os microrganismos testados, no entanto, a inibição foi menor em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. O dióxido de carbono influenciou as fases de multiplicação de maneira diferente para todos os organismos. As bactérias Gram-positivas tiveram um aumento significativo na fase lag. Já as bactérias Gram-negativas apresentaram aumento significativo na fase lag e também no tempo para atingir a população máxima (MARTIN et al., 2003).

Foram determinados os efeitos do CO<sub>2</sub> dissolvido no leite sobre o desempenho de quatro importantes testes de rotina. A adição de CO<sub>2</sub> (1 g/L) não afetou o desempenho de três marcas diferentes de provas de antibiótico no leite. A adição de CO<sub>2</sub> diminuiu o pH e o ponto de congelamento do leite, sendo que essa diminuição foi reversível com a remoção do CO<sub>2</sub> dissolvido. O aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> no leite aumentou as leituras de absorvância das amostras no comprimento de onda de referência da lactose (7,651 µm a 7,788 µm) e modificou o seu índice de refração (~ - 0,18%). As mudanças nos teores de proteínas (≤ - 0,02%) e gordura (≤ + 0,03%) foram relativamente pequenas. Para os testes de fosfatase alcalina, a adição de CO<sub>2</sub> não afetaria a habilidade de um analista em diferenciar um leite pasteurizado de um leite cru ou um leite pasteurizado que foi contaminado com leite cru, utilizando-se os métodos: Fluorophos, Charm PasLite, e Schärer Modificado (MA et al., 2001).

Ma et. al. (2003) avaliaram o efeito da adição de CO<sub>2</sub> na proteólise e lipólise do leite cru refrigerado a 4 °C. A adição de 1,5 g/L de CO<sub>2</sub> retardou a multiplicação de bactérias no leite cru durante os 21 dias de armazenamento a 4 °C. Para a contagem padrão de leite cru atingir o limite legal de 3 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, a partir de uma contagem inicial de 10<sup>4</sup> UFC/mL, o tempo total foi cerca de 7 dias para o controle e para o leite acidificado com HCl em comparação com 14 dias para o leite tratado com 1,5 g/L de CO<sub>2</sub>. Do ponto de vista da contagem microbiana, a adição de 1,5 g/L de CO<sub>2</sub> dobrou o tempo de armazenamento do leite cru a 4 °C. Esse tempo de armazenamento poderia ser estendido ainda mais se a contagem inicial fosse mais baixa aliada a uma maior concentração de CO<sub>2</sub> e temperaturas de estocagem inferiores. A adição de CO<sub>2</sub> no

leite cru diminuiu a proteólise por pelo menos dois mecanismos: redução das proteases devido à reduzida multiplicação microbiana e a possível redução na atividade da plasmina em função do pH mais baixo do leite. O efeito do CO<sub>2</sub> na redução da lipólise foi atribuído a uma reduzida multiplicação microbiana. Não foi detectado nenhum efeito da adição de CO<sub>2</sub> ou acidificação do leite na lipólise pela lipase natural do leite.

Foram investigados os efeitos na microbiota endógena do leite cru estocado sob pressões de 0,69 a 6,93 kgf/cm<sup>2</sup> de CO<sub>2</sub> em temperaturas de 5 °C, 6,1 °C, 10 °C e 20 °C. Essas combinações de pressão e temperatura não causaram precipitação de proteínas do leite e a contagem de aeróbios mesófilos do leite tratado mostrou-se mais baixa comparada com o controle em todas as temperaturas e, em alguns casos, o tratamento foi letal. O leite cru tratado com CO<sub>2</sub> e armazenado a 6,1 °C por 4 dias exibiu multiplicação bacteriana reduzida. As taxas de pressões de 0,69 kgf/cm<sup>2</sup>, 1,75 kgf/cm<sup>2</sup>, 3,51 kgf/cm<sup>2</sup>, 5,26 kgf/cm<sup>2</sup> e 7,02 kgf/cm<sup>2</sup> demonstraram ser eficientes na redução da viabilidade da contagem total. O tratamento a 7,02 kgf/cm<sup>2</sup> também reduziu *Lactobacillus* ssp. e bactérias Gram-negativas. O tempo requerido para leite cru, tratado a 7,02 kgf/cm<sup>2</sup> alcançar 4,30 log UFC/mL a 4 °C, foi aumentado em 4 dias, comparado com o controle. Coliformes totais no leite tratado manteve-se a 1,95 log UFC/mL por 9 dias de tratamento. Esses dados indicaram que o armazenamento do leite cru tratado com baixas pressões de CO<sub>2</sub> pode reduzir a multiplicação bacteriana sem causar precipitação de proteínas. Baixa pressão de CO<sub>2</sub> combinada com a refrigeração do leite melhoraria a qualidade microbiológica e a segurança do leite cru e poderia ser uma estratégia efetiva para transporte por longas distâncias de leite refrigerado “in natura” ou concentrado (RAJAGOPAL et. al., 2005).

### **2.2.3.2. Utilização de CO<sub>2</sub> em outros produtos lácteos**

Paula (2005a) elaborou e avaliou a estabilidade de uma bebida carbonatada à base de soro de leite obtido das fabricações de queijo Minas Padrão e Mussarela. O produto obteve boa aceitação sensorial e apresentou estabilidade

físico-química e microbiológica durante o armazenamento à temperatura ambiente por pelo menos três meses.

Chio e Kosikowski (1984) produziram um iogurte aromatizado carbonatado a 5 kgf/cm<sup>2</sup> e armazenado sob refrigeração a 4 °C. O CO<sub>2</sub> retardou a pós-acidificação do produto durante a estocagem refrigerada a 4,4 °C, sendo estável durante 4 meses de vida útil. O iogurte não carbonatado (controle) não obteve aceitabilidade sensorial após 30 dias.

Gueimonde et al. (2003) estudaram a adequabilidade de leite conservado por refrigeração, durante cinco dias a 4 °C, e adição de CO<sub>2</sub> para fabricação de iogurte. O produto foi fabricado após a pasteurização do leite refrigerado e carbonatação (pH 6,15) e comparado com dois controles diferentes que foram fabricados a partir de leite pasteurizado fresco ou a partir de leite mantido refrigerado. A capacidade de multiplicação e acidificação da cultura “starter”, bem como a evolução da acidez, não foi afetada pela prévia refrigeração e adição de CO<sub>2</sub> no leite cru ou por resíduos de CO<sub>2</sub> presentes no leite pasteurizado. A refrigeração aumentou a produção de etanol e diacetil. Contudo, não houve diferenças nas propriedades sensoriais durante a estocagem refrigerada entre o iogurte fabricado com leite tratado com CO<sub>2</sub> e aqueles fabricados com leite refrigerado. Os autores concluíram que o leite refrigerado acidificado com CO<sub>2</sub> poderia ser satisfatoriamente usado na fabricação de iogurte.

Noriega et al. (2003) estudaram a inibição de *Bacillus cereus* em leite bífido fermentado carbonatado. A população de *Bifidobacterium infantis* não foi afetada pela presença de CO<sub>2</sub> e a população de *B. cereus* foi reduzida dois ciclos logarítmicos em 12 horas de incubação em leite carbonatado, a 37 °C. Durante a estocagem a 4 °C, o CO<sub>2</sub> também preveniu a degradação proteolítica das amostras contaminadas, inibiu a formação de ácidos orgânicos pelo *B. cereus*, reduziu a proporção de ácidos acético e láctico no leite fermentado. Os autores concluíram que o uso de leite acidificado com CO<sub>2</sub> não afetou as propriedades sensoriais do produto. Portanto, a carbonatação de leite, tratado termicamente, antes da adição da bifidobactéria pode contribuir para reduzir o risco de contaminação de leite bífido por *B. cereus*.

O uso de leite acidificado com CO<sub>2</sub> não tem efeito prejudicial nas propriedades sensoriais de leite fermentado com bactérias lácticas e probióticas (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*). A carbonatação de leite pasteurizado antes da adição de cultura “starter” poderia ser usada satisfatoriamente para reduzir o tempo de fabricação desses produtos. Os níveis mais elevados de acidez das amostras carbonatadas (como resultado da produção de ácido carbônico pela dissolução do CO<sub>2</sub>) e acidificadas aumentaram a multiplicação e a atividade metabólica da cultura “starter” durante a fermentação e foi a razão para a redução no tempo de incubação do leite fermentado (VINDEROLA et al., 2000).

Vianna (2010) avaliou o efeito da adição de CO<sub>2</sub> sobre a qualidade dos leites cru e UHT. O leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub> foi armazenado a 4 °C e 7 °C foram avaliadas quanto à contagem padrão em placas, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp., concentração de CO<sub>2</sub>, proteólise e lipólise, até a contagem padrão em placas atingir 7,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. O tempo de conservação foi de 14 dias para o leite armazenado a 4 °C adicionado de CO<sub>2</sub> e de 5 dias para o armazenado a 7 °C não adicionado de CO<sub>2</sub>. Independente da temperatura de armazenamento, a adição de CO<sub>2</sub> estendeu o tempo de fase lag e de geração dos microrganismos psicrotróficos e reduziu sua taxa de crescimento. O leite adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou menor proteólise e lipólise quando comparado ao não adicionado dado o menor desenvolvimento de psicrotróficos. Após seis dias de armazenamento a 4 °C, o leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> manteve sua qualidade físico-química e microbiológica, enquanto o leite não adicionado sofreu perda significativa de qualidade. A taxa de aumento de proteólise foi 1,4 vezes maior no leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub>, comparado à amostra produzida com adição de CO<sub>2</sub>. O leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou maior ação de proteases microbianas. A lipólise foi maior no leite UHT produzido a partir de leite cru sem adição de CO<sub>2</sub>.



### **2.2.3.3. Efeito do CO<sub>2</sub> no pH e no equilíbrio mineral do leite para fabricação de queijos**

Alteração do pH do leite, especialmente por acidificação, constitui etapa fundamental para uma série de processos tecnológicos de fabricação, sendo que durante a diminuição de pH, mudanças podem ocorrer na composição e, portanto, na estrutura micelar (GASTALDI et al., 1996).

A acidificação por fermentação ou por adição de um ácido dissolve progressivamente o fosfato de cálcio coloidal e diminui a intensidade de ligações do cálcio com as caseínas. O grau de solubilização de fosfato de cálcio aumenta muito em pH abaixo de 5,6 e quase se completa em pH próximo de 5,2 (DALGLEISH e LAW, 1989; VAN HOOYDONK, 1986). Em pH 5,8, observou-se também que as micelas de caseína começaram a se agregar (GASTALDI et al., 1996). Autores relatam que o fosfato de cálcio coloidal é o primeiro componente a ser solubilizado, quando o pH abaixa. Lucey e Fox (1992) relataram inibição da coagulação por coalho quando 30 % do fosfato de cálcio coloidal foi solubilizado como consequência das mudanças estruturais resultantes nas micelas.

O abaixamento do pH do leite também leva ao aumento na atividade do íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>), que desempenha papel muito importante na redução da repulsão entre caseínas carregadas negativamente e, conseqüentemente, aumenta a taxa de agregação durante a coagulação do leite. A acidificação seguida de neutralização melhorou as propriedades de coagulação pelo coalho, que foi atribuída a uma elevada atividade de Ca<sup>2+</sup> (LUCEY et al., 1996). O teor de fosfato de cálcio coloidal não é totalmente restaurado na micela, quando o leite acidificado é neutralizado e outros sais de fosfato de cálcio também são formados, proporcionando diferentes propriedades tamponantes (LUCEY et al., 1996).

Recentemente, atenção especial tem sido dada a esses leites conservados com CO<sub>2</sub> visando à sua utilização na fabricação de queijos. Entre as vantagens potenciais para a indústria de queijos, destacam-se as menores quantidades de uso de coalho necessárias para a realização da coagulação do leite em função da diminuição do tempo de coagulação. Na literatura não existe consenso sobre o

efeito dessa tecnologia no rendimento de fabricação de queijos, apesar de não haver efeitos significativos, quando se utiliza leite armazenado sob atmosfera de CO<sub>2</sub> para a fabricação de queijos (CALVO et al., 1993; DE LA FUENTE et al., 1998).

A adição de CO<sub>2</sub> no leite resultou em diminuição do pH, remoção do fosfato de cálcio coloidal e do cálcio ligado diretamente às caseínas (GEVAUDAN et al., 1996), aumentou os níveis de Ca<sup>2+</sup> (DE LA FUENTE et al., 1998), e resultou em ruptura da estrutura micelar (CHANG e ZHANG, 1992). Como relatado anteriormente, os aumentos nos níveis de Ca<sup>2+</sup> seriam benéficos para as propriedades de coagulação pelo coalho, embora a solubilização excessiva de fosfato de cálcio coloidal possa ter efeito no processo de fabricação do queijo. No leite despressurizado sob vácuo, os teores de P solúvel, Ca e Mg retornaram aos valores originais após a despressurização (GEVAUDAN et al., 1996). A restauração imediata do balanço salino original não ocorre quando o leite tratado com CO<sub>2</sub> é submetido à agitação suave à pressão atmosférica. Após 3h, nem os níveis desses elementos solúveis, nem a atividade de Ca<sup>2+</sup> foram restaurados, o que implicaria positivamente na aptidão do leite para a coagulação. (DE LA FUENTE et al., 1998).

Embora Green e Grandison (1993) tivessem sugerido que a agitação suave no tanque, que normalmente é feita nas primeiras fases do processo de fabricação de queijo, seria suficiente para eliminar a influência do CO<sub>2</sub>, esses efeitos foram ainda visíveis horas após a despressurização. De la Fuente et al. (1998) relataram que, quando a remoção de CO<sub>2</sub> foi realizada por agitação suave na pressão atmosférica, 3h após a abertura dos tanques, os valores do tempo de coagulação pelo coalho e da taxa de formação da coalhada não foram iguais aos obtidos para o leite cru. No entanto, a remoção forçada de CO<sub>2</sub> por um evaporador rotativo a vácuo promoveu a recuperação das propriedades coagulantes. Da mesma forma, a degaseificação forçada foi necessária para recuperar o rendimento do queijo, garantindo assim a reversibilidade do processo. Esses resultados podem ser atribuídos ao retorno lento da distribuição salina original.

Trabalhos têm relatado que as mudanças produzidas pela adição de CO<sub>2</sub> são devido às modificações de pH. No entanto, uma comparação da distribuição das micelas de caseínas em leites acidificados com HCl, adicionado de CO<sub>2</sub> e leites não tratados, indicaram que o nível de caseínas solúveis no leite acidificado foi o dobro do produto não tratado, mas apenas a metade do que o medido nos leites carbonatados (CHANG e ZHANG, 1992). Essa observação pode ser correlacionada à maior liberação de cálcio (e Ca<sup>2+</sup>) para a fase contínua do leite pela adição de CO<sub>2</sub>, em comparação com a acidificação por adição de HCl (DE LA FUENTE et al., 1998). Esses resultados sugerem que as mudanças na distribuição micelar nos leites gaseificadas não decorreram somente das variações de pH, mas de outros mecanismos que devem estar envolvidos.

Quando o CO<sub>2</sub> é adicionado para acidificar o leite a pH abaixo de 6,0, mudanças mais drásticas e irreversíveis ocorrem. Após a despressurização, o pH retorna ao seu valor inicial, embora os níveis de sais solúveis de fosfato de cálcio coloidal inorgânico se assemelhem aos do leite cru, as curvas de capacidade tamponante foram diferentes das do leite original, mostrando que o CO<sub>2</sub> induziu a formação de um novo sistema salino. Gevaudan et al. (1996) sugeriram que a solubilização de sais desestabilizou a estrutura micelar e, ao mesmo tempo, após o término da despressurização, as caseínas e outras formas de fosfato de cálcio induzidas pelo tratamento tornaram-se reassociadas. No entanto, essa nova associação não era a mesma da original. Além disso, Chang e Zhang (1992) observaram menor redistribuição das caseínas com permanente manutenção de caseínas que foram solubilizadas, em resposta ao tratamento com CO<sub>2</sub>, aos mesmos níveis observados nos leites carbonatados, quando o excesso foi removido de um leite gaseificado a pH 5,8.

#### **2.2.3.4. Utilização de CO<sub>2</sub> em queijos e seus efeitos tecnológicos**

Diversos efeitos podem ser visivelmente observados na tecnologia e no produto final, quando se utiliza a pré-acidificação do leite para fabricação de queijos. Dentre eles, vários autores têm relatado efeitos tecnológicos como

diminuição do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada, maior liberação de soro, redução da dose de coalho, melhor controle do processo e alterações no rendimento (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

A adição de CO<sub>2</sub> por meios artificiais abaixa o pH do leite e resulta em diminuição do tempo de coagulação. Esse efeito pode ser usado para se obter o mesmo tempo de coagulação com menor quantidade de coalho. A injeção de CO<sub>2</sub> normalmente é feita na linha de alimentação do tanque de fabricação sendo que a taxa de injeção e o tempo de contato com o leite antes de misturar o coalho tem de ser calculados quando o sistema for instalado. Queijarias que utilizam o dióxido de carbono relatam que a quantidade de coalho pode ser reduzida pela metade sem efeitos adversos, o que seria uma grande vantagem do ponto de vista econômico (PAULA, 2006).

O aumento do cálcio iônico, em leites de diferentes espécies (cabra, ovelha e vaca), devido à adição de CO<sub>2</sub> poderia explicar por que o leite submetido a tal tratamento é mais apropriado para a coagulação. A remoção do CO<sub>2</sub> pela agitação do leite à pressão atmosférica resulta em maior concentração de cálcio iônico que no leite não carbonatado, melhorando, assim, a sua aptidão tecnológica para a fabricação de queijos (DE LA FUENTE et al., 1998).

Menor tempo total de fabricação foi observado por St-Gelais et al. (1997) para queijo Cheddar fabricado com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH 6,56. Nelson et al. (2004) também encontraram redução no tempo total de fabricação (15 min) e no tempo entre a adição de coagulante e a drenagem do soro (10 min) para queijo Cheddar pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH de 5,93. Calvo et al. (1993) registraram redução no tempo de coagulação enzimática de 80 % em queijos espanhóis fabricados com leite pasteurizado, o pH do leite foi abaixado de 6,65 para 6,0 com adição CO<sub>2</sub>. Montilla et al. (1995), ao fabricarem queijo ibérico, encontraram redução de 75 % na dose de coalho necessária para a coagulação no leite com adição de CO<sub>2</sub>, seguindo-se redução da proteólise do queijo. Os queijos não apresentaram diferenças nas características sensoriais, e os autores concluíram que queijos fabricados com os leites adicionados de CO<sub>2</sub> não apresentam problemas no rendimento, além de desenvolverem menor proteólise.

Ruas-Madiedo et al. (1998a), na fabricação do queijo espanhol Afuega'l Pitu, adicionaram CO<sub>2</sub> ao leite cru e armazenaram o leite por 4 dias em temperatura de refrigeração (4 °C), antes da pasteurização. O tratamento com CO<sub>2</sub> reduziu a proteólise durante os primeiros estágios de fabricação do queijo e preveniu a diminuição do seu rendimento. A redução das proteases por conta da diminuição da multiplicação de bactérias psicotróficas durante o armazenamento do leite e a possível redução na atividade da plasmina em função do pH mais baixo do leite podem ser as possíveis causas da prevenção da perda de rendimento.

Ruas-Madiedo et al. (2002) obtiveram redução de 60 % no tempo de coagulação na fabricação de queijo Manchego, um queijo espanhol de massa dura. O tratamento com CO<sub>2</sub> modificou os aspectos tecnológicos da produção: o tempo de coagulação foi reduzido, a dureza da coalhada aumentou, porém, não houve diferença no rendimento, quando comparado ao queijo controle.

Dias e Gigante (2009), avaliando a influência da adição de CO<sub>2</sub> no leite pasteurizado para fabricação de queijo Minas Frescal, em escala piloto, observaram menor tempo de coagulação. Neste trabalho, a redução de 0,6 unidades de pH (de aproximadamente 6,8 para 6,2 no leite acidificado por meio da adição de ácido láctico ou CO<sub>2</sub>) implicou na redução de 80 % do tempo de coagulação, o qual foi determinado empiricamente, quando a coalhada atingiu o ponto de corte. Para a carbonatação do leite, o gás foi borbulhado por meio de mangueira perfurada, à pressão atmosférica, até obtenção do pH desejado.

Ao avaliar o efeito da acidificação do leite com CO<sub>2</sub> sobre a dosagem de coagulante empregado na fabricação de queijos, Silveria et al. (2009) observaram que, em decorrência da maior atividade da enzima, a redução do pH para 6,6, 6,4 e 6,2 implicou na redução da dosagem de coagulante em aproximadamente 33, 65 e 74 %, respectivamente.

Outro estudo avaliou a influência da acidificação do leite com CO<sub>2</sub> na proteólise e maturação de queijo Cheddar. O dióxido de carbono (aproximadamente 1,6 g/L) foi adicionado ao leite refrigerado até obtenção de pH de 5,9 a 31 °C. As condições de fabricação foram mantidas iguais, incluindo a

dosagem de coagulante. O teor de cálcio do queijo tratado com CO<sub>2</sub> foi menor, mas nenhuma diferença no teor de umidade foi observada. O teor de CO<sub>2</sub> nos queijos tratados (0,337 g/L) foi maior em relação ao controle (0,124 g/L) e foi mantido ao longo de seis meses de maturação. Os índices de proteólise ao longo da maturação também foram mais altos nos queijos tratados. Esses altos índices em queijos feitos com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> podem ser explicados pelo aumento da disponibilidade do substrato na fase aquosa, ou pelo aumento da atividade da quimosina ou ainda por sua maior retenção na massa, dada a redução do pH (NELSON, et al., 2004).

Chen e Hotchkiss (1991) avaliaram o efeito do uso de CO<sub>2</sub> dissolvido na multiplicação de bactérias psicrotróficas em queijo cottage. O queijo foi inoculado com 10<sup>3</sup> UFC/g de uma mistura de três gêneros de bactérias psicrotróficas Gram-negativas, envasado em potes de vidro impermeável e estocado a 4 °C e a 7 °C por 80 dias. O CO<sub>2</sub> foi adicionado por dissolução no dressing, antes da mistura com a coalhada. Nenhum crescimento foi detectado no queijo tratado com CO<sub>2</sub> durante os 70 dias de armazenamento a 4 °C ou 30 dias a 7 °C. A boa aparência e o frescor foram mantidos por 80 dias a 4 °C e por 60 dias a 7 °C. Durante os primeiros 10 dias de armazenamento a 7 °C ou 17 dias a 4 °C, o queijo não tratado apresentou contagem quatro vezes maior que o queijo tratado. Esses dados indicam que o uso de CO<sub>2</sub> dissolvido pode efetivamente inibir a multiplicação de bactérias Gram-negativas em queijo cottage com embalagem impermeável.

A literatura relata as propriedades e os efeitos tecnológicos da utilização do CO<sub>2</sub> no leite e em produtos lácteos. Os estudos sobre o assunto, principalmente em relação ao uso de CO<sub>2</sub> em tecnologia de queijos, são ainda limitados. Observa-se que a literatura ainda pode avançar, principalmente com relação à elucidação dos efeitos benéficos da utilização de CO<sub>2</sub> em queijos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização**

Os experimentos foram conduzidos em escala industrial nas dependências do Laticínio Ita, em Itabirito, Minas Gerais. As análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes” da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (ILCT/EPAMIG). As análises do perfil de textura (TPA) e das propriedades reológicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV) e as análises microestruturais foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

#### **3.2. Determinação do efeito do uso de CO<sub>2</sub> na fabricação dos queijos Minas Frescal e Minas Padrão**

Foram realizados dois experimentos, sendo um para o queijo Minas Frescal e outro para o queijo Minas Padrão. Para ambos os experimentos com os queijos, utilizou-se o mesmo sistema e as mesmas condições de carbonatação descritas a seguir.

O fluxograma de fabricação dos queijos, os métodos para incorporação de CO<sub>2</sub> e as modificações tecnológicas do processo foram definidos por meio de testes preliminares realizados no núcleo industrial do ILCT/EPAMIG.

### **3.2.1. Delineamento estatístico**

Os experimentos foram conduzidos em três repetições, no delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, sendo o fator CO<sub>2</sub> alocado nas parcelas e nos tempos de estocagem como subparcelas. Para ambos os queijos, repetiu-se o mesmo delineamento, diferindo-se apenas as datas do tempo de estocagem em que foram realizadas as análises. As análises estatísticas foram processadas de forma semelhante.

As hipóteses de interesse foram:

1) As formas de incorporação do CO<sub>2</sub> (tratamentos):

Ho: injeção de CO<sub>2</sub> = adição de 5% de água carbonatada = controle (sem CO<sub>2</sub>);

2) As características do produto durante o tempo de vida útil (em dias de estocagem):

Ho: 1 = 10 = 20 = 30 = 40 dias, para o queijo Minas Frecal; e,

Ho: 3 = 30 = 60 = 90 = 120 dias, para o queijo Minas Padrão;

3) A interação entre os dois fatores de estudo CO<sub>2</sub> x Tempo

Ho: O comportamento das características do produto ao longo do tempo é o mesmo para cada tratamento.

### **3.2.2. Análise dos resultados**

Empregou-se a análise de variância para verificar se existe diferença entre os três tratamentos, o tempo de estocagem e a interação dos dois fatores. As diferentes formas de incorporação de CO<sub>2</sub> e o controle foram comparados pelo teste de Tukey. A resposta da variável ao longo do período de armazenamento foi



avaliada por meio da análise de regressão. Para as variáveis que apresentaram efeito significativo da interação (tratamento e Tempo) foi feito o desdobramento, no qual se avaliaram as diferentes formas de incorporação de CO<sub>2</sub> e o controle para cada tempo de estocagem e a tendência, via regressão, em função do tempo de estocagem, para cada tratamento. As análises foram realizadas com o auxílio do programa MINITAB, versão 14 (*STATISTICAL SOFTWARE. MINITAB INC., 2003*).

### **3.2.3. O sistema de injeção e as condições de carbonatação**

O leite foi pasteurizado em pasteurizador a placas (BRAS HOLANDA, modelo 7500, Curitiba-PR, Brasil) a 72 °C por 15 segundos e resfriado para 32 °C, utilizando-se a regeneração do sistema. Um expansor de aço inoxidável foi inserido na tubulação de saída de leite pasteurizado, após a seção de regeneração do pasteurizador. Um tubo retardador de aço inoxidável, com uma válvula sanitária de controle de pressão inserida no final, foi adicionado após o ponto de injeção de CO<sub>2</sub>, permitindo, pelo menos, 15 segundos de tempo de contato para incorporação de CO<sub>2</sub> no leite pasteurizado. Um medidor de pressão foi colocado na linha logo antes da válvula de controle de pressão. A quantidade de CO<sub>2</sub> adicionada ao leite foi controlada em função da leitura de pH do leite no tanque de fabricação, por meio da abertura ou do fechamento da válvula de controle de fluxo de CO<sub>2</sub>, até obtenção de valores de pH na faixa de 6,30. A Figura 1 mostra o desenho esquemático do sistema de carbonatação utilizado no experimento.

O tratamento com adição de água carbonatada foi realizado por meio da incorporação de 5 % de água carbonatada comercial (marca Crystal) sob o volume de leite utilizado para a fabricação do queijo (2,5 L para 50 L de leite). A água foi adicionada no leite no tanque de fabricação logo antes da adição do coagulante.

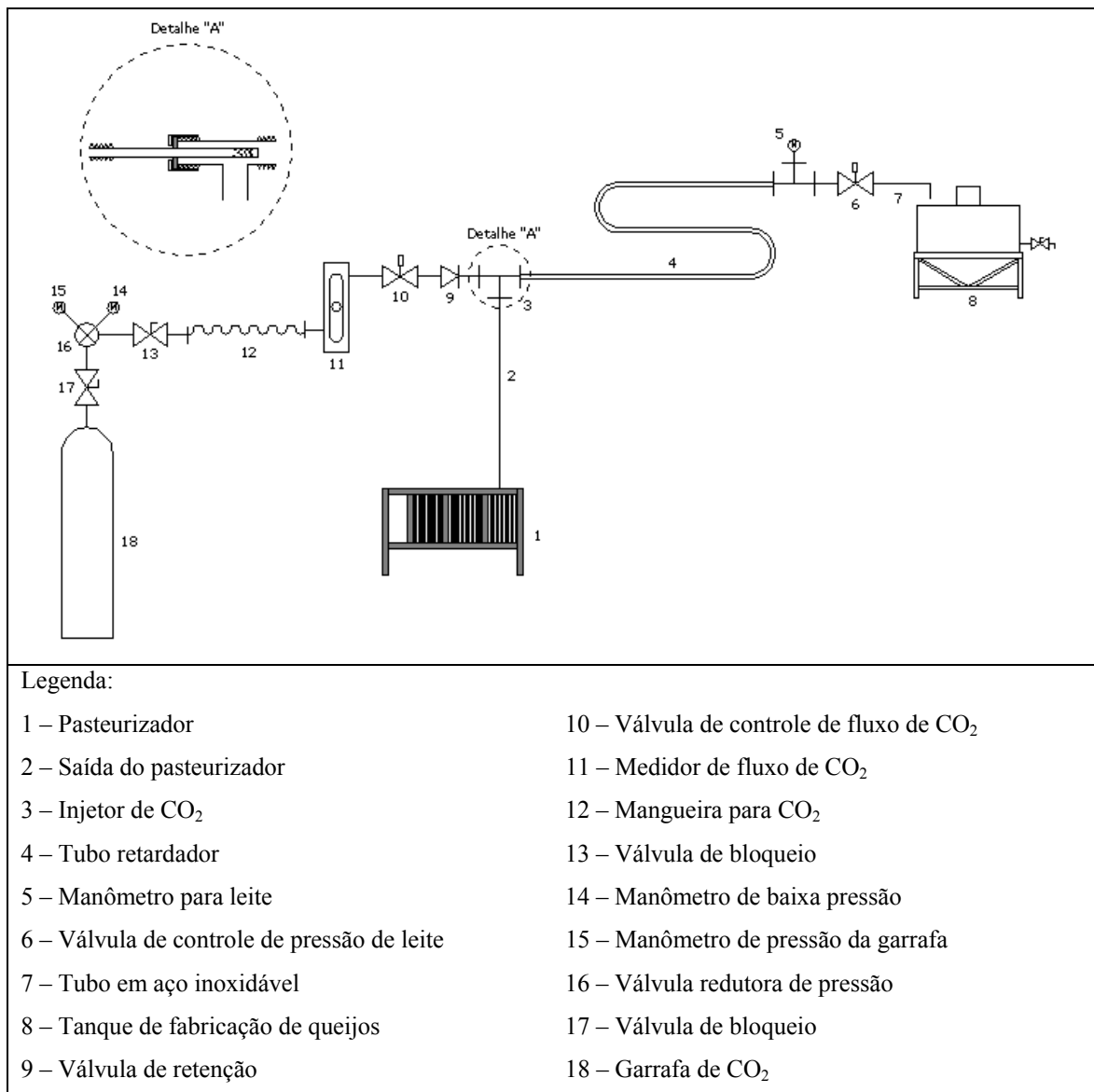


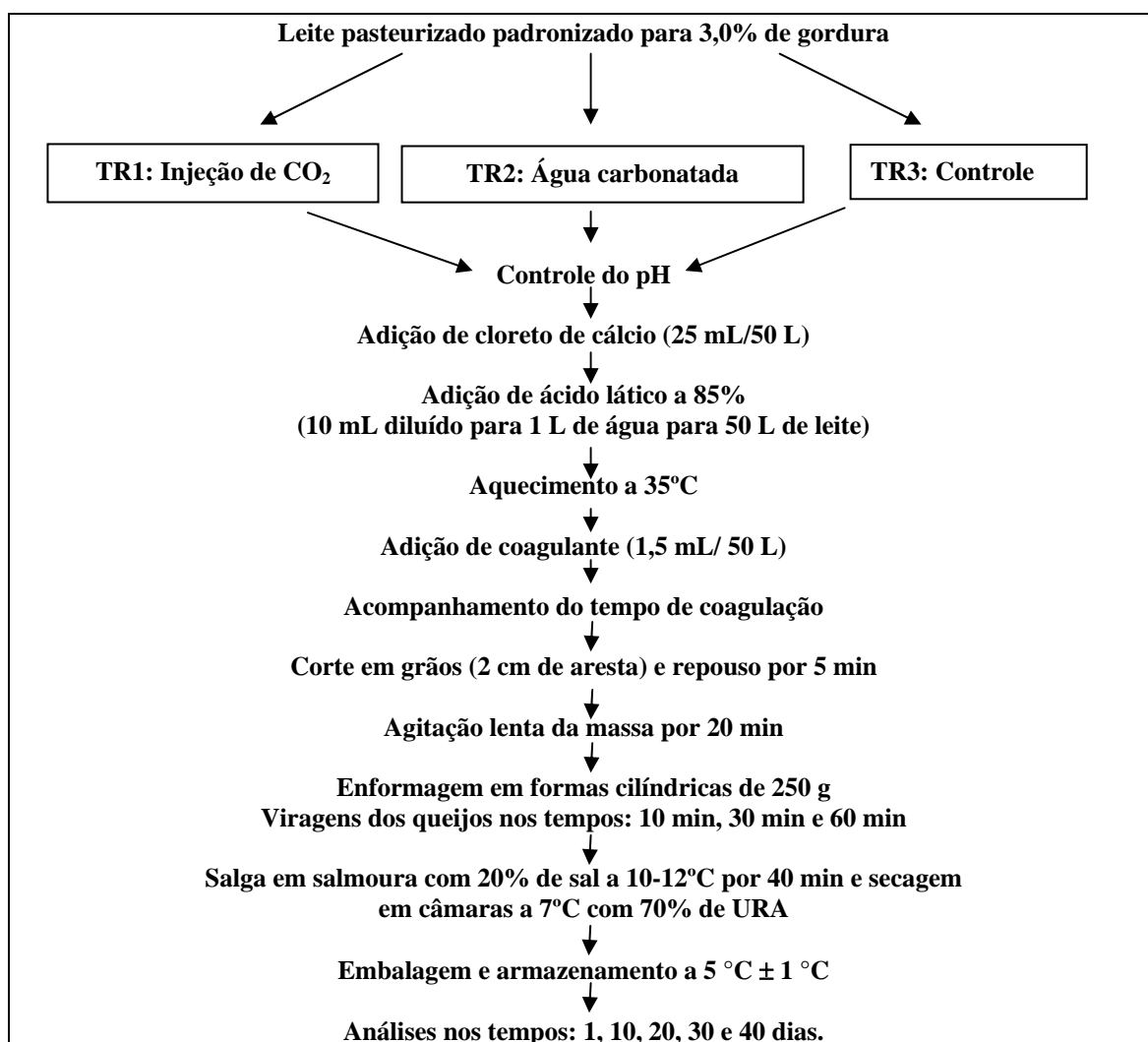
Figura 1 - Sistema de carbonatação para leite utilizado no experimento.

### 3.2.4. Fabricação do queijo Minas Frescal

Para a fabricação do queijo Minas Frescal, foram utilizados 50 L de leite pasteurizado e padronizado para 3,0 % (m/m) de gordura, ao qual foi adicionado cloreto de cálcio (Produtos Macalé LTDA), 25 mL da solução a 40 % (m/v). O leite, utilizado nos três tratamentos, foi então acidificado lentamente com solução de ácido láctico (Produtos Macalé LTDA), 0,85 % (m/v), diluído a 1 % (10 mL da solução a 85 % m/v, diluída para 1,0 L de água destilada), de modo a aumentar a acidez em 0,02 g de ácido láctico por 100 mL de leite. A temperatura foi ajustada

para 35 °C e então se procedeu à coagulação, usando 1,5 mL de coagulante (Chymax M<sup>®</sup>, força 950 IMCU/mL, Chr-Hansen) sendo mantida a mesma quantidade de coagulante para os diferentes tratamentos. O tempo de coagulação foi cronometrado desde a adição do coagulante até que a coalhada apresentasse firmeza suficiente para realização do corte. Após o tempo necessário para a coagulação, a coalhada foi cortada lentamente, por meio de liras horizontal e vertical, em cubos grandes (2 cm de aresta) e deixada em repouso por 5 min. O processo de mexedura foi fixado em 20 min após o início da mexedura da coalhada. A massa foi então enformada em formas de Minas Frescal de 250 g, as quais foram deixadas em repouso para o dessoramento e para a realização de três viragens, após 10 min, 30 min e 60 min. Os queijos foram então salgados em salmoura a 20 % (m/v) de sal em temperatura de 10 °C a 12 °C por 40 min e deixados na própria forma para a secagem a 7 °C e a 70 % de umidade relativa do ar até o dia seguinte, quando foram embalados em embalagens plásticas de polietileno. O queijos foram armazenados em estufas tipo B.O.D (American Lab, BOD AL200) a 5 °C ± 1 °C para a realização das análises nos tempos previstos.

Os queijos Minas Frescal foram fabricados conforme as etapas descritas no fluxograma de fabricação da Figura 2.



Fonte: Adaptado de FURTADO (2005b).

Figura 2 – Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal.

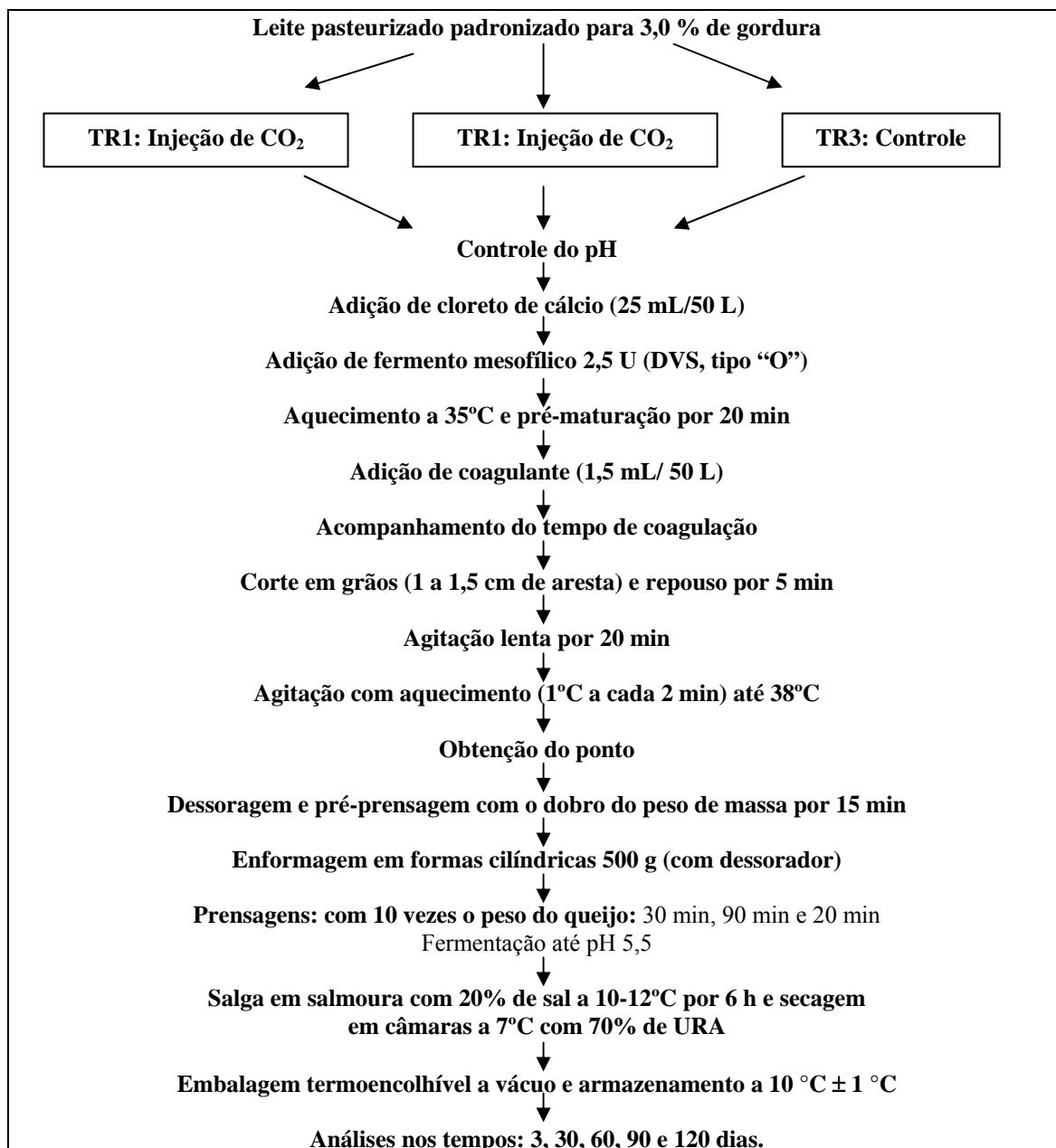
### 3.2.5. Fabricação do queijo Minas Padrão

Para a fabricação do queijo Minas Padrão, foram utilizados 50 L de leite pasteurizado, padronizado para 3,0 % (m/m) de gordura e adicionado de cloreto de cálcio (Produtos Macalé LTDA), 25 mL da solução a 40 % (m/v). Foi então acrescentada dose normal (2,5 U) de fermento láctico mesofílico (DVS, R-704<sup>®</sup>, Chr-Hansen, composto por: *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) e a temperatura ajustada para 35 °C. Deixou-se o leite em repouso

por 20 min, e procedeu-se a coagulação, usando-se 1,5 mL de coagulante líquido (Chy-max M<sup>®</sup>, força 950 IMCU/mL, Chr-Hansen) para 50 L de leite, sendo mantida a mesma quantidade de coagulante para os diferentes tratamentos. O tempo de coagulação foi cronometrado desde a adição do coagulante até que a coalhada apresentasse firmeza suficiente para realização do corte. Após o tempo necessário para a coagulação, a coalhada foi cortada lentamente em cubos médios (1,0 cm a 1,5 cm de aresta) e deixada em repouso por cinco minutos. A primeira mexedura foi fixada em 20 min, quando, então, iniciou-se a segunda mexedura com aquecimento da massa com vapor indireto até 38 °C. O processo de mexedura se prolongou até o ponto, que foi medido pela ligeira consistência dos grãos. O soro foi drenado e a massa foi pré-prensada, com duas vezes o seu peso estimado, no próprio tanque de fabricação, por 15 min. Após, o bloco de massa foi cortado e enformado em formas cilíndricas de 500 g, equipadas com dessoradores no corpo e na tampa. Os queijos foram prensados por 30 min com peso equivalente a 10 vezes o peso do queijo (5 kg) e, em seguida, foram virados nas formas e recolocados na prensa, trocando-se a posição dos queijos que ficaram na parte superior para a inferior, e novamente foram prensados por mais 90 min com o mesmo peso. Ao final, os queijos foram virados e prensados novamente, da mesma forma, porém, sem o uso do dessorador da forma, durante 20 min, quando os pesos foram retirados e os queijos deixados na própria prensa até obtenção de pH 5,5. Para acompanhamento da evolução do pH ao longo do tempo de fermentação, durante a prensagem dos queijos, foi montada uma curva de pH por tempo para os três tratamentos estudados.

Após a fermentação, os queijos foram levados imediatamente para a salga em salmoura a 20 % (m/v) de sal em temperatura de 10 °C a 12 °C por 6 horas e posteriormente foram deixados na secagem a 7 °C e a 70 % de umidade relativa do ar até o dia seguinte, quando foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis a vácuo. Os queijos foram armazenados em câmara fria a 10 °C ± 2 °C, para a realização das análises nos tempos previstos.

Os queijos Minas Padrão foram fabricados conforme as etapas descritas no fluxograma de fabricação da Figura 3.



Fonte: Adaptado de FURTADO (2005b).

Figura 3 – Fluxograma de fabricação do queijo Minas Padrão.

### 3.2.6. Análises físico-químicas do leite e do soro

As análises de pH, teor percentual de gordura (m/m), sólidos totais (m/m), proteína (m/m), acidez titulável (m/v) e densidade a 15 °C do leite e do soro de leite foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Instrução

Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### **3.2.7. Análises físico-químicas dos queijos**

As análises de composição centesimal foram realizadas com um dia de estocagem para o queijo Minas Frescal e aos três dias de estocagem para os queijos Minas Padrão. As análises de pH, umidade e extensão e profundidade da proteólise foram realizadas nos tempos de 1, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem para o queijo Minas Frescal e nos tempos de 3, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem para o queijo Minas Padrão. As análises físico-químicas dos queijos foram realizadas segundo as metodologias:

- pH, teores percentuais de umidade e sólidos totais (m/m), gordura (m/m), cloreto de sódio (m/m) e resíduo mineral fixo (m/m) dos queijos foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).
- Teores percentuais (m/m) de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA a 12 % (m/v) foram obtidos pelo método Kjeldahl, conforme descrito por Pereira (2001), para se calcular:
  - Teor percentual (m/m) de proteína: com base no teor de nitrogênio total. O fator utilizado foi 6,38.
  - Índice de extensão de proteólise (relação % de  $NS_{pH\ 4,6} / NT$ );
  - Índice de profundidade de proteólise (relação % de  $NS_{TCA\ 12\ \%} / NT$ );
- Teor percentual de cálcio inorgânico total (solúvel em TCA, %, m/m) foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (SILVA e QUEIROZ, 2002).
- Teor de GES ou percentual de gordura no extrato seco (relação % de teor de gordura / EST).

### 3.2.8. Análise do rendimento de fabricação

Os resultados obtidos das análises físico-químicas dos leites, soros de leite e queijos e da pesagem da produção final após um dia de fabricação foram utilizados para o cálculo das variáveis de rendimento de fabricação segundo metodologia descrita por Furtado (2005):

- Percentual de cifra de transição de gordura no soro de leite pelo método técnico, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Perda de gordura (\%)} = (\text{kgl} - P) G_s \times 100 / (\text{kgl} / D_l) G_l \times D_s \quad (1),$$

em que

$D_s$  = densidade a 15 °C do soro de leite;

$D_l$  = densidade a 15 °C do leite;

$K_{gl}$  = quilos de leite;

$G_l$  = porcentagem de gordura no leite;

$G_s$  = porcentagem de gordura no soro de leite;

$P$  = produção de queijos (kg).

- Percentual de cifra de transição de proteína no soro pelo método empírico, de acordo com a Equação 2:

$$\text{Perda de proteína (\%)} = P_s \times 100 / P_l \quad (2),$$

em que

$P_s$  = porcentagem de proteína do soro de leite;

$P_l$  = porcentagem de proteína do leite.

- Percentual de cifra de transição de proteína no soro pelo método técnico, de acordo com a Equação 3:

$$\text{Perda de proteína (\%)} = (\text{kgl} - P) \times P_s \times 100 / (\text{kgl} / D_l) P_l \times D_s \quad (3),$$



em que

Ds = densidade a 15 °C do soro de leite;

Dl = densidade a 15 °C do leite;

Kgl = quilos de leite;

Pl = porcentagem de proteína no leite;

Ps = porcentagem de proteína no soro de leite;

P = produção de queijos (kg).

- Aproveitamento de sólidos no queijo em relação a cada litro de leite trabalhado ou Coeficiente GL (g ST/L), de acordo com a Equação 4:

$$g\ ST/L = ST \times P \times 10 / V \quad (4),$$

em que

ST = porcentagem de sólidos totais do queijo;

P = produção de queijos (kg);

V = volume de leite (L).

- Rendimento em litros de leite por quilo de queijo ajustado (L/kg A), de acordo com a Equação 5:

$$L/kg\ A = V (100 - UP) / P \times ST \quad (5),$$

em que

V = volume de leite (L);

UP = porcentagem de umidade comum pretendida fixada em 60 % (m/m) para o queijo Minas Frescal e 49 % (m/m) para o queijo Minas Padrão;

ST = porcentagem de sólidos totais do queijo.

### 3.2.9. Análises microbiológicas

As contagens de *Staphylococcus aureus*, contagens de *Listeria monocytogenes* e contagens de *Salmonella* sp. foram realizadas após um dia de estocagem para o queijo Minas Frescal e após 3 dias de estocagem para o queijo Minas Padrão. As contagens padrão, coliformes a 30 °C e fungos filamentosos e leveduras foram realizadas no leite e nos queijos Minas Frescal em todos os tempos determinados. Para o queijo Minas Padrão, foram realizadas as mesmas contagens, excetuando-se apenas a contagem padrão, devido à adição de fermento lácteo.

As contagens microbiológicas: contagem padrão, coliformes a 30 °C, fungos filamentosos e leveduras e *S. aureus* foram realizadas, utilizando-se as técnicas de contagem em placas Petrifilm, de acordo com a metodologia e material, citados a seguir, e com os procedimentos determinados pelo fabricante, sendo ambos indicados para análises em leite e queijos (PARK, 2004):

- Contagem padrão de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos – *Petrifilm Aerobic Count Plate*, 3M, NM-USA, Contagem de Aeróbios (AOAC – 990.12 – Contagem de Aeróbios em alimentos, Filme Reidratável Seco);
- Contagem de coliformes a 30 °C – *Petrifilm E.coli/Coliform Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 991.14 – Contagem de Coliformes e *E. coli* em alimentos, película Reidratável Seca);
- Contagem de fungos filamentosos e leveduras – *Petrifilm Yeast and Mold Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 997.02 – Contagem de Bolores e Leveduras em Alimentos, Filme Reidratável Seco – Método Petrifilm)
- Contagem de *Staphylococcus aureus* – *Petrifilm Staph Express Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 2003.08 – Método para Contagem de *Staphylococcus aureus* em Laticínios);
- Contagem de *Listeria monocytogenes* (American Public Health Association - APHA, 2004);

- Contagem de *Salmonella* sp. (American Public Health Association - APHA, 2004).

### **3.2.10. Análise sensorial**

Foi realizado teste de aceitação sensorial, utilizando-se a escala hedônica de nove pontos, conforme apresentado na Figura 4. (CHAVES e SPROESSER, 1996; MINIM, 2006). As avaliações foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do ILCT/EPAMIG. Os testes foram conduzidos em cabines individuais, sob luz branca. As amostras foram apresentadas de maneira casualizada e balanceada, em temperatura ambiente (25 °C), devidamente codificada com números aleatórios de três dígitos, em pratos descartáveis, contendo aproximadamente 30 g de cada amostra de queijo. Para avaliar a influência dos tratamentos na preferência dos consumidores foi realizado também o teste de ordenação (Figura 4) e as amostras foram apresentadas de forma semelhante ao teste de aceitação, segundo metodologia descrita por Minim (2006). As avaliações foram realizadas por 30 provadores não-treinados, durante os tempos de estocagem: 3, 10, 20, 30, 35 e 40 dias para o queijo Minas Frescal e nos tempos: 3, 30, 60, 90 e 120 dias para o queijo Minas Padrão.

ESCALA HEDÔNICA / ORDENAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Por favor, avalie as amostras utilizando as escalas abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita seu julgamento. Em seguida, ordene-as de acordo com sua preferência. Atribua o número 1 para a amostra mais preferida, 2 para a segunda mais preferida e assim sucessivamente. Entre cada avaliação, enxágue a boca com água e espere 30 segundos.

Código da amostra: _____	Código da amostra: _____	Código da amostra: _____
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente
<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito	<input type="checkbox"/> Gostei muito
<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Indiferente	<input type="checkbox"/> Indiferente	<input type="checkbox"/> Indiferente
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente
Ordem de preferência: _____	Ordem de preferência: _____	Ordem de preferência: _____
<b>Observações:</b> _____		

Figura 4 – Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação e preferência, adaptado de Minim (2006).

### 3.2.11. Análise microestrutural

As análises microestruturais foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV. As amostras de queijo Minas Frescal e Minas Padrão foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com a metodologia utilizada por Lobato-Calleros et al. (2002) e Freire (2009), com modificações. Amostras cilíndricas de 0,5 cm de diâmetro e de altura foram fixadas em solução tampão de glutaraldeído 2 (%) por seis horas, desidratadas em soluções com concentração etanólica crescente: 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % e 100 %, por um período de tempo de permanência em cada solução de 30 min e, por fim, colocadas em acetona por uma hora. Na sequência, as amostras foram levadas ao secador de ponto crítico (marca Bal-Tec modelo

CPD 030). Cada amostra seca foi partida manualmente e montada nos *stubs* (suportes porta-amostra do microscópio) com a parte fraturada voltada para cima, e então foram levadas ao pulverizador de ouro (Electron Microscopy Sciences modelo 550x) e recoberta com uma camada de ouro para evitar o colapso da superfície. Um microscópio eletrônico de varredura (Leo modelo 1430 VP, Cambridge, Inglaterra), operando com 15 kV, foi utilizado para visualização das amostras na magnitude entre 1.000 e 2.000 vezes.

### **3.2.12. Análise reológica**

Foram realizadas análises reológicas e de perfil de textura somente para os queijos Minas Frescal, pois, durante os testes preliminares, identificaram-se diferenças visualmente detectáveis em relação às propriedades mecânicas e reológicas desses queijos.

As análises para a determinação das propriedades reológicas dos queijos Minas Frescal foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado um reômetro oscilatório HAAKE MARS (Modular Advanced Reometer System, Thermo Electron Corp., Alemanha), equipado com um banho termostático (Phoenix 2C30P, Thermo Electron Corp., Alemanha), utilizando-se o sensor de placas paralelas serrilhadas de 20 mm de diâmetro (PP 20S) para todas as amostras.

As análises dos queijos foram realizadas após 1, 2, 3, 4 e 5 semanas de estocagem à temperatura de 5 °C, em três repetições. Antes das análises reológicas, as amostras foram mantidas em repouso, no sensor, por cinco minutos para estabilização da temperatura e rearranjo estrutural a exatamente 5 °C. Uma nova amostra foi utilizada em cada ensaio.

A região de viscoelasticidade linear de cada formulação foi determinada por meio da aplicação de uma varredura de tensão entre 1 Pa e 500 Pa a frequência constante de 1 Hz. Para o teste oscilatório, foi utilizado um valor de tensão dentro do intervalo de viscoelasticidade linear (20 Pa).

No teste oscilatório, foi aplicada uma varredura de frequência (0,01 Hz a 10 Hz) a uma tensão constante e os valores dos componentes elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) e  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) foram calculados usando o software Haake RheoWin Data Manager.

Também foi realizada uma varredura de temperatura (de 5 °C a 85 °C), a frequência de 1 Hz a 1,5 °C/min, para verificar o comportamento viscoelástico dos queijos Minas em função da temperatura.

Para as análises estatísticas dos resultados, utilizou-se o valor de  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \delta$  a frequência de 1 Hz (Juan et al., 2007).

### **3.2.13. Análise do perfil de textura (TPA)**

As análises para a determinação do perfil de textura do queijo Minas Frescal foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. Para a análise do perfil de textura, foi utilizado o Instron Universal Testing Machine, modelo 3367 (Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA). As condições de trabalho foram: pré-teste, teste e pós-teste nas velocidades de um mm/s, com distância de compressão de 40 % da parte superior da amostra. Uma sonda cilíndrica de 55 mm foi usada juntamente com uma célula de carga de 1 KN, movida perpendicularmente através das amostras de queijos cilíndricos (25 mm de diâmetro e 25 mm de altura) que foram colhidas aleatoriamente do queijo inteiro. As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a firmeza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade em Newton (N), elasticidade (mm) e coesividade foram calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron - Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) x tempo (s) obtidos durante os ensaios.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Efeito do uso de CO<sub>2</sub> na fabricação de queijo Minas Frescal**

Para determinação dos efeitos do uso de CO<sub>2</sub> na fabricação dos queijos Minas Frescal, os resultados das análises realizadas neste experimento estão descritos e discutidos a seguir.

#### **4.1.1. Composição físico-química do leite**

Os resultados da composição físico-química média do leite utilizado nas fabricações dos queijos Minas Frescal dos três tratamentos encontram-se na Tabela 1. Para Fox e Mc Sweeney (1998), a importância da composição do leite está relacionada à coagulação enzimática, firmeza da coalhada, sinérese e textura do queijo.

Tabela 1 – Composição físico-química média do leite utilizado para a fabricação do queijo Minas frescal

Variáveis	Tratamentos		
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)	Água Carbonatada (média ± DP)	Controle (média ± DP)
Gordura (% m/v)	3,00 ± 0,00 a	3,03 ± 0,10 a	3,03 ± 0,10 a
EST (% m/v)	11,58 ± 0,21 a	11,60 ± 0,20 a	11,63 ± 0,10 a
Proteína (% m/v)	3,53 ± 0,08 a	3,54 ± 0,06 a	3,54 ± 0,06 a
Densidade (g/mL)	1,0309 ± 0,0008 a	1,0306 ± 0,0003 a	1,0310 ± 0,0004 a
Acidez* (% m/v)	0,22 ± 0,014 b	0,15 ± 0,013 a	0,15 ± 0,013 a
pH	6,36 ± 0,08 b	6,88 ± 0,04 a	6,88 ± 0,06 a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

DP = Desvio Padrão; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

O leite utilizado para a fabricação dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos apresentou composição físico-química similar na maioria dos constituintes analisados. Esse fato pode ser atribuído ao uso do mesmo leite de conjunto que foi estocado sob refrigeração em um tanque isotérmico, tipo silo, de cinquenta mil litros. O leite do tratamento com adição de água carbonatada foi analisado antes da incorporação da mesma e por isso apresenta composição muito parecida com a do leite do tratamento controle. O leite do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> foi analisado após o processo de injeção de CO<sub>2</sub>, pelo fato de o gás ser adicionado no leite a 32 °C na linha de leite pasteurizado, logo após a sessão de resfriamento do pasteurizador. A injeção do CO<sub>2</sub> no leite resultou em diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) na acidez titulável e pH, em relação ao leite utilizado para os demais tratamentos, que, por sua vez, não diferiram entre si. O pH final do leite, na faixa de 6,36, foi atingido pela incorporação do gás CO<sub>2</sub> diretamente no leite pasteurizado sob pressão. A adição de dióxido de carbono para acidificação do leite até valores de pH próximo a 6,0 foi utilizada para inibir a multiplicação de microrganismos esporulados em leite cru antes da fabricação de queijos (CALVO et al., 1993; McCARNEY et al., 1995).

Ao avaliar a influência da adição de CO<sub>2</sub> sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal, Dias (2009) obteve valores de pH de 6,83 para o leite controle, 6,24 para o leite pré-acidificado com ácido láctico e 6,27 para o leite pré-acidificado por meio do borbulhamento de CO<sub>2</sub>.



#### 4.1.2. Composição físico-química dos queijos após a fabricação

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos Minas Frescal dos três tratamentos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição físico-química média dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos		
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)	Água Carbonatada (média ± DP)	Controle (média ± DP)
Umidade (% m/m)	62,09 ± 1,68 a	63,55 ± 0,86 a	64,23 ± 0,92 a
Gordura (% m/m)	18,25 ± 1,74 b	15,88 ± 0,32 a	16,19 ± 0,69 ab
GES	48,12 ± 3,73 b	43,56 ± 0,61 a	45,26 ± 1,49 ab
NaCl (m/m)	1,80 ± 0,21 a	1,79 ± 0,15 a	1,70 ± 0,28 a
S/U (% m/m)	2,91 ± 0,38 a	2,83 ± 0,28 a	2,65 ± 0,43 a
RMF (% m/m)	3,48 ± 0,25 a	3,52 ± 0,23 a	3,86 ± 0,28 a
Proteína (% m/m)	16,81 ± 1,81 a	15,20 ± 0,80 a	15,40 ± 0,52 a
pH	6,24 ± 0,09 b	6,36 ± 0,08 ab	6,40 ± 0,05 a
Cálcio inorgânico total (% m/m)	0,39 ± 0,03 a	0,39 ± 0,03 a	0,42 ± 0,04 a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão; GES = Gordura no Extrato Seco; S/U = Sal na Umidade; RMF = Resíduo Mineral Fixo.

Os queijos dos tratamentos com injeção de CO<sub>2</sub> e controle, quanto ao teor de gordura no extrato seco (GES) e ao teor de umidade, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos e com a Instrução Normativa número 04 de 2004, classificam-se em queijo gordo e de muito alta umidade. Já o queijo adicionado de água carbonatada apresentou teor de gordura no extrato seco inferior, sendo, portanto, classificado como queijo semigordo e também de muito alta umidade (BRASIL, 1996 e BRASIL, 2004).

A classificação como queijo de muito alta umidade exige que o seu teor não seja inferior a 55% (m/m). Para todos os tratamentos, o teor de umidade dos queijos foi superior a 60 % (m/m). Os queijos Minas Frescal encontrados no mercado normalmente apresentam teores de umidade superiores a 60 % (m/m), o que é preferido pelas indústrias brasileiras que buscam alcançar maior rendimento de fabricação, em litros por kg de produto. Devido a esse elevado teor de umidade, o teor de lactose residual presente no queijo também é muito alto, o

que favorece a multiplicação de bactérias deterioradoras mesmo durante a sua estocagem refrigerada. Sendo assim, a sua vida útil é curta e o seu consumo deve ser rápido.

Os resultados de teor de umidade encontrados para este experimento foram muito próximos aos resultados encontrados por Dias e Gigante (2009), ao avaliarem o efeito da pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> no rendimento e nas características físico-químicas do queijo Minas Frescal. Esses autores encontraram valores de umidade de 63,02 % (m/m) para os queijos controle (adicionados de cultura láctica), 57,44 % (m/m) para os queijos obtidos a partir do leite pré-acidificado com ácido láctico e 57,62 % (m/m) para o queijo tratado com CO<sub>2</sub> (pH 6,21). A menor umidade obtida no queijo tratado com CO<sub>2</sub> foi justificada em função da maior sinérese do coágulo no tanque de fabricação.

Com relação ao teor de gordura a análise de variância, indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. Os queijos do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram teor de gordura superior em relação ao queijo do tratamento com adição de água carbonatada, no entanto, ambos os tratamentos não diferiram ( $p > 0,05$ ) do tratamento controle. Essa diferença influenciou, da mesma forma, no teor de gordura em relação ao estrato seco total (GES). Esse fato pode ter decorrido da maior perda de gordura no soro do queijo tratado com adição de água carbonatada. No caso do queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, o menor pH do leite antes da coagulação pode ter permitido a formação de uma coalhada mais firme e com melhores condições de aprisionamento dos constituintes como a gordura. No entanto, na Tabela 3, demonstra-se que a perda de gordura no soro foi estatisticamente não significativa. Essa ausência de diferença significativa no teor de gordura do soro pode ser explicada por ele ter sido coletado para a análise aos 15 min após o corte da coalhada, não representando a composição real ao final do processo.

A análise de variância também indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação à variável pH para os tratamentos utilizados. O pH do queijo do tratamento controle foi maior ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao do queijo do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>. No entanto, o pH de ambos os tratamentos não diferiram

significativamente ( $p > 0,05$ ) do pH dos queijos com adição de água carbonatada. Esse comportamento pode ser explicado pela própria presença de ácido carbônico proveniente da dissolução  $\text{CO}_2$  no leite.

Dias e Gigante (2009), ao avaliarem a influência da adição de  $\text{CO}_2$  no leite pasteurizado para fabricação de queijo Minas Frescal, em escala piloto, encontraram diferença de pH, umidade, gordura, sal na umidade e resíduo mineral fixo entre queijos tratados com  $\text{CO}_2$  e os queijos do tratamento controle (com adição de cultura lática). Esses autores encontraram valores de pH de 6,32 % m/m, umidade de 57,62, gordura de 22,67 % m/m, sal na umidade de 2,76 % m/m e resíduo mineral fixo de 2,76 % m/m para os queijos tratados com  $\text{CO}_2$  que foram diferentes em relação aos encontrados para os queijos do tratamento controle. Este apresentou valores de pH de 5,77 % m/m, umidade de 63,02, gordura de 19,10 % m/m, sal na umidade de 2,44 % m/m e RMF de 3,25 % m/m.

No presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) no teor de proteína, umidade, sal ( $\text{NaCl}$ ), sal na umidade, resíduo mineral fixo e cálcio total. A maior diferença entre o queijo tratado com injeção de  $\text{CO}_2$  em relação aos demais foi o pH final de 6,24 em comparação com 6,36 para o tratamento com adição de água carbonatada e 6,40 para o tratamento controle.

#### **4.1.3. Composição físico-química do soro**

Os resultados das análises físico-químicas dos soros obtidos das fabricações dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 3.

A composição físico-química média dos soros dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos variou ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao pH, acidez titulável e proteína. O soro proveniente da fabricação com injeção de  $\text{CO}_2$  apresentou menor pH e maior acidez titulável do que aqueles resultantes dos tratamentos com adição de água carbonatada e controle, que, por sua vez, não diferiram entre si. A

diminuição do pH e o conseqüente aumento na acidez titulável podem ser atribuídos à presença de CO<sub>2</sub> no soro.

Tabela 3 – Composição físico-química média dos soros de leite obtidos dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos					
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)		Água Carbonatada (média ± DP)		Controle (média ± DP)	
pH	6,30 ± 0,08	b	6,47 ± 0,07	A	6,57 ± 0,08	a
Acidez* (% m/v)	0,14 ± 0,015	b	0,11 ± 0,008	A	0,11 ± 0,013	a
EST (% m/v)	5,66 ± 0,21	a	4,92 ± 0,78	A	5,56 ± 0,59	a
Gordura (% m/v)	0,16 ± 0,05	a	0,20 ± 0,06	A	0,17 ± 0,05	a
Densidade (g/mL)	1,0262 ± 0,0013	a	1,0252 ± 0,0017	A	1,0252 ± 0,0019	a
Proteína (% m/v)	0,74 ± 0,02	b	0,79 ± 0,02	A	0,83 ± 0,06	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

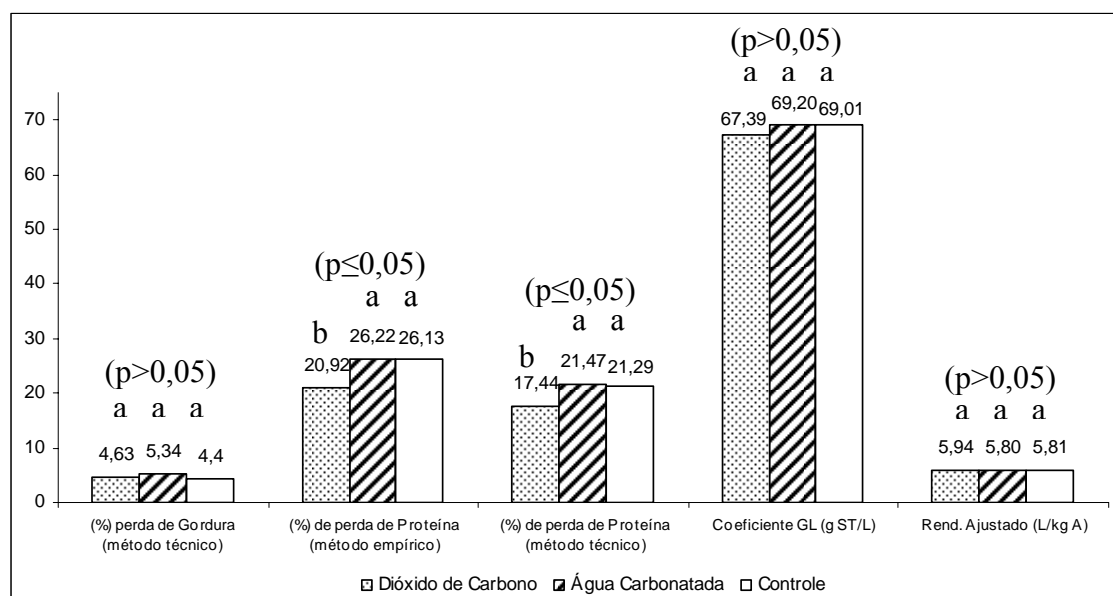
O teor de proteína presente no soro foi menor para o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> em relação aos demais tratamentos, que, por sua vez, também não diferiram entre si. Esse fato pode ser explicado pela maior adsorção e retenção desse constituinte, por causa do menor pH da coalhada obtida de leite tratado com injeção de CO<sub>2</sub>. Esse fato pode ser constatado pelas diferenças encontradas posteriormente no estudo de porcentagem de perda de proteína pelos métodos empírico e técnico. Para os outros aspectos físico-químicos, a diferença não foi significativa (p>0,05).

Os valores obtidos para a composição físico-química do soro do queijo Minas Frescal tratado com injeção de CO<sub>2</sub> no leite foram inferiores, exceto para acidez titulável, aos valores encontrados por Dias e Gigante (2009) que obtiveram médias de pH de 6,43, acidez titulável de 0,15 (% m/v), EST de 6,81 (% m/v), gordura de 0,56 (% m/v) e proteína de 1,08 (% m/v) ao avaliarem o efeito da pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> (até pH 6,21) no rendimento e nas características físico-químicas do queijo Minas Frescal. Os mesmos autores não encontraram diferenças no teor de proteína presente nos soros. No entanto, foram encontradas diferenças em relação ao teor de gordura que foi menor no tratamento com CO<sub>2</sub>, em relação ao tratamento controle. Nelson et al. (2004),

avaliando o impacto da acidificação do leite com CO<sub>2</sub> na composição e no rendimento de queijo Cheddar, relataram valores médios de pH de 6,3, acidez de 0,13 % (m/v), EST de 6,28 % (m/v), gordura de 0,68 % (m/v), proteína de 0,80 % (m/v) e densidade de 1,0249 (g/mL).

#### 4.1.4. Análise de rendimento

Na Figura 5 são mostrados os resultados dos diferentes métodos de avaliação de rendimento, utilizados no experimento para o queijo Minas Frescal.



Letras iguais indicam médias semelhantes a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Figura 5 – Métodos de avaliação de rendimento utilizados no experimento para o queijo Minas Frescal.

A análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em relação às variáveis “Porcentagem de perda de gordura pelo método técnico”, “Coeficiente GL” e “Rendimento Ajustado” para os tratamentos. No entanto, a análise de variância registrou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para as variáveis “Porcentagem de perda de proteína pelo método empírico” e “Porcentagem de perda de proteína pelo método técnico”.

O tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou porcentagem de perda de proteína mais baixa ( $p \leq 0,05$ ), tanto pelo método empírico como pelo método técnico, em relação aos demais tratamentos, que, por sua vez, não diferiram entre si. Esse decorreu, provavelmente, de melhor formação da coalhada, o que permitiu maior aprisionamento desse constituinte. Porém, para os índices Perda de gordura pelo método técnico, Coeficiente GL (g ST/L) e Rendimento Ajustado (L/kg A), o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) quando comparado aos demais tratamentos. Esse comportamento pode ser explicado pelo menor pH da coalhada no tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>, o que aumentaria o seu dessoramento durante as etapas de enformagem, viragem, salga e secagem, resultando em menor peso final da produção, visto que essas variáveis levam em conta a quantidade de queijo produzida (produção final). Outro fator importante que deve ser levado em conta é o tempo de mexedura, que foi o mesmo para ambos os tratamentos no experimento com o queijo Minas Frescal.

Tendo em vista estes resultados, uma alternativa para melhorar os índices de rendimento seria estudar a possibilidade de redução do tempo de corte da coalhada juntamente com a diminuição do tempo de mexedura, visando contrabalancear o maior dessoramento do queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, o que diminuiria a dessoragem dos queijos. A possibilidade de redução do tempo para a realização do corte da coalhada e do tempo de mexedura poderia otimizar ainda mais o processo de fabricação dos queijos, o que seria muito interessante do ponto de vista tecnológico e econômico.

Dias e Gigante (2009) não observaram diferenças significativas em relação à recuperação de proteína entre os tratamentos com pré-acidificação do leite com ácido láctico ou CO<sub>2</sub> (pH 6,20) e em relação ao tratamento com adição de cultura láctica. No entanto, observou-se diferença significativa com maior perda de gordura no soro do queijo fabricado com adição de cultura láctica, indicando que a pré-acidificação do leite tanto com ácido láctico ou com CO<sub>2</sub> ajudou na formação da coalhada com menores perdas desse componente. Contudo, mesmo com essa diferença, os rendimentos dos queijos também não foram afetados.

#### 4.1.5. Efeito do uso de CO<sub>2</sub> nos tempos de fabricação

Na Tabela 4, são mostradas as médias dos tempos de fabricação para os diferentes tratamentos utilizados.

Tabela 4 – Médias dos tempos durante a fabricação para os diferentes tratamentos para o queijo Minas Frescal

Etapas da fabricação	Tempo gasto (min)			Redução do tempo (min) Tratamento vs. Controle		Redução do tempo (%) Trat. vs. Controle	
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)	Água Carbonatada (média ± DP)	Controle (média ± DP)	CO <sub>2</sub>	Água Carbonatada	CO <sub>2</sub>	Água Carbonatada
Coagulação	17 ± 3 b	25 ± 3 a	29 ± 2 a	12	4	42	16
Tempo total de fabricação	40 ± 3 b	47 ± 3 a	52 ± 2 a	12	5	24	10

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão.

O tempo entre a adição de coagulante e o corte da coalhada foi 42 % menor para o tratamento com CO<sub>2</sub> e 16 % menor para o tratamento com adição de água carbonatada, em comparação ao tratamento controle, conforme apresentado na Tabela 4. Sendo assim, o CO<sub>2</sub> diminuiu o tempo gasto para a fabricação do queijo Minas Frescal. Esse fato pode ser explicado pelo menor pH do leite antes da coagulação, que se aproximou do pH ótimo de atuação da enzima coagulante e melhorou a sua atuação, resultando em maior firmeza da coalhada e reduzindo o tempo de coagulação. Um fator importante a ser considerado é a quantidade de cálcio solúvel que pode ser maior no leite tratado com CO<sub>2</sub>. Quanto maior a quantidade de cálcio solúvel presente no meio, mais rápida será a formação do coágulo e maior a sua firmeza. O menor pH do leite também favorece o aumento da velocidade de agregação das micelas, aumentando a firmeza do gel durante a coagulação. Esse aumento na agregação micelar decorre da diminuição da estabilidade das micelas por neutralização das cargas negativas e pela difusão de fosfato de cálcio intramicelar para a fase contínua, aumentando a disponibilidade de íons cálcio em solução (FOX et al., 2000).

O tempo total de fabricação também foi consideravelmente menor com o leite pré-acidificado com injeção de CO<sub>2</sub> (redução de 24 %), principalmente por causa da diminuição no tempo de coagulação, como pode ser observado na Tabela . Menor tempo total de fabricação também foi observado por St-Gelais et al. (1997) para queijo Cheddar fabricado com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> (pH 6,56). Entretanto, eles relataram um tempo similar do corte até a drenagem do soro em relação ao tratamento controle e 30 min menos no tempo de cheddarização. Nelson et al. (2004) também encontraram menor tempo total de fabricação (15 min) e menor tempo entre a adição de coagulante e a drenagem do soro (10 min) para queijo Cheddar pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH de 5,93.

Para alguns autores (MONTILLA et al., 1995; St-GELAIS et al., 1997), leites pré-acidificados com CO<sub>2</sub>, para pH de 6,0 e 6,56, respectivamente, coagulam de maneira similar aos controles, porém, com 75 % e 30 % menos coagulante, respectivamente. A redução do tempo de coagulação também foi observada por Calvo et al. (1993) que registraram redução no tempo de coagulação enzimática de 80 % em queijos espanhóis fabricados com leite pasteurizado, o pH do leite foi abaixado de 6,65 para 6,0 com adição de CO<sub>2</sub>. Ruas-Madiedo et al. (2002) obtiveram redução de 60 % no tempo de coagulação na fabricação de um queijo espanhol de massa dura, após a redução de 0,5 unidade de pH através da adição de CO<sub>2</sub> no leite. Dias e Gigante (2009) obtiveram redução de 80 % no tempo de coagulação do queijo Minas Frescal com o abaixamento de 0,6 unidade de pH (de 6,8 para 6,2), pelo emprego da pré-acidificação do leite com ácido láctico ou com o uso de CO<sub>2</sub>. Este fato foi justificado pelo melhor desempenho do coalho em meio ácido e pela maior agregação micelar conferida pela diminuição da estabilidade da micela por neutralização das cargas negativas e pela difusão de fosfato de cálcio para a fase contínua, aumentando a sua disponibilidade no meio.



#### 4.1.6. Evolução do pH durante o tempo de armazenamento

A Figura 6 apresenta a evolução do pH ao longo do armazenamento em função dos diferentes tratamentos utilizados para o queijo Minas Frescal.

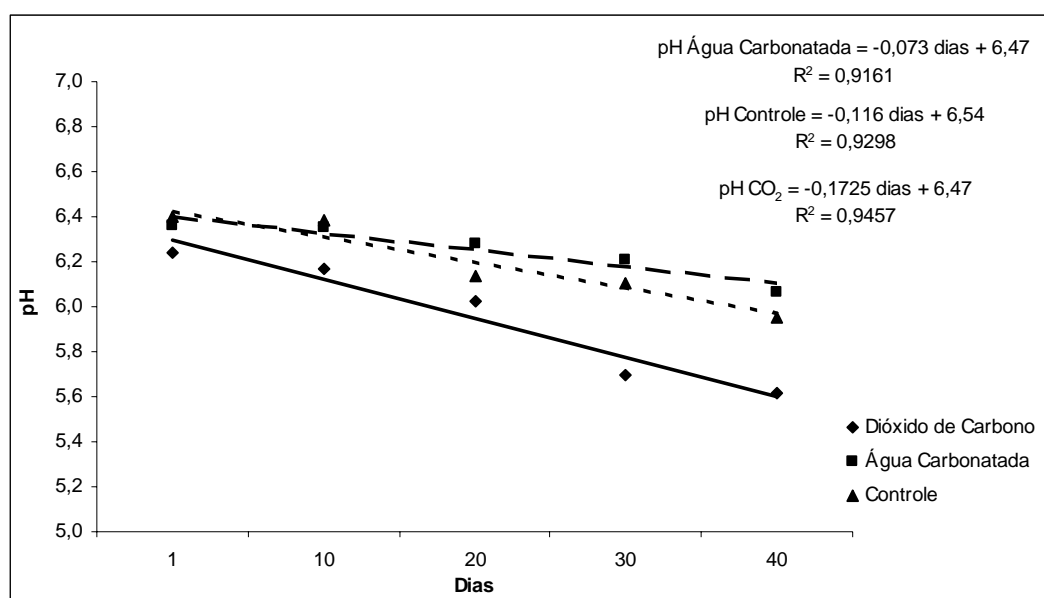


Figura 6 – Evolução do pH dos queijos Minas Frescal ao longo do armazenamento.

Na avaliação durante o tempo de armazenamento, a análise de variância indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao valor de pH para os tratamentos e para os tempos de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ) que variaram de um a quarenta dias. Pelo estudo da regressão, a variável pH apresentou tendência linear de redução ao longo do tempo, conforme os modelos e gráfico apresentados na Figura 6. A interação entre tratamento e período, segundo a análise de variância, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Na Tabela 5, estão os valores médios de pH para os três tratamentos do queijo Minas Frescal, para todos os tempos avaliados, demonstrando o efeito de tratamento.

Tabela 5 – Valores médios de pH para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos para todos os tempos

Tratamentos	pH
CO <sub>2</sub>	5,95 b
Água Carbonatada	6,25 a
Controle	6,19 ab

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os queijos do tratamento com CO<sub>2</sub> apresentaram menor pH em relação aos queijos do tratamento com adição de água carbonatada. No entanto, o pH de ambos os tratamentos não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) do pH dos queijos do tratamento controle. A diferença no pH entre os queijos com injeção de CO<sub>2</sub> e os queijos com adição de água carbonatada pode ser atribuída à presença de ácido carbônico por causa da dissolução do CO<sub>2</sub> na massa do queijo do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>, bem como e da incorporação de 5% de água carbonatada no leite. A adição de água promove uma delactosagem parcial, o que diminui a produção de ácido no queijo e modifica o seu perfil de pH durante a estocagem. Esse processo de delactosagem pela adição de água ao leite ou mesmo ao soro durante a fabricação é comumente utilizado para controlar o pH e a desmineralização da massa em queijos como Gouda e Emmental (FOX et al., 2004). Na Tabela 6, são apresentados os valores médios de pH ao longo do tempo de estocagem refrigerada para os tratamentos para o queijo Minas Frescal.

Tabela 6 – Valores médios de pH ao longo do tempo para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos

Dias de estocagem	pH
1	6,33 a
10	6,30 ab
20	6,15 ab
30	6,00 ab
40	5,87 b

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na avaliação geral ao longo do tempo, o pH médio dos queijos dos diferentes tratamentos caiu de 6,33 para 5,87 representando redução de 0,45 no pH durante o armazenamento. Pode-se observar na Tabela 6 que após 30 dias de armazenamento o pH dos queijos apresentou uma considerável redução caindo de 6,00 para 5,87, sendo diferente significativamente dos valores encontrados nas datas anteriores. Essa queda no pH pode ser atribuída à atuação de bactérias contaminantes presentes no produto, o que sugere um prazo de validade de aproximadamente 30 dias a 5°C. Dias (2009) também registrou queda de pH dos queijos Minas Frescal elaborados com pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> (até pH de 6,27), que caiu de 6,30 no primeiro dia até 5,54 no 19º dia.

Sangaletti (2007) também verificou diferença significativa em relação ao pH, ao avaliar a vida útil de queijos Minas Frescal comercial armazenados durante 30 dias a 4 °C. Foi observada redução de pH de 0,81 entre o 1º e 30º dia de armazenamento, no qual o pH caiu de 6,66 para 5,85. Buriti et al. (2005) registraram variação de pH de 6,16 a 5,38 durante 21 dias de armazenamento refrigerado para queijo Minas Frescal. Silva et al. (2003) também encontraram redução no valores de pH que variaram de 6,20 a 5,00 para queijos Minas Frescal.

A diminuição do pH e o aumento da acidez estão diretamente relacionadas com o aumento da contagem de bactérias contaminantes e bactérias lácticas (NSLAB) que resistiram à pasteurização e que transformam a lactose em ácido láctico durante o armazenamento (SANGALETTI, 2007). O aumento excessivo da acidez e consequente diminuição do pH podem prejudicar a aceitação sensorial do produto.

#### **4.1.7. Evolução do teor de umidade durante o tempo de armazenamento**

Na Figura 7 apresenta-se a evolução do teor de umidade dos diferentes tratamentos ao longo do armazenamento.

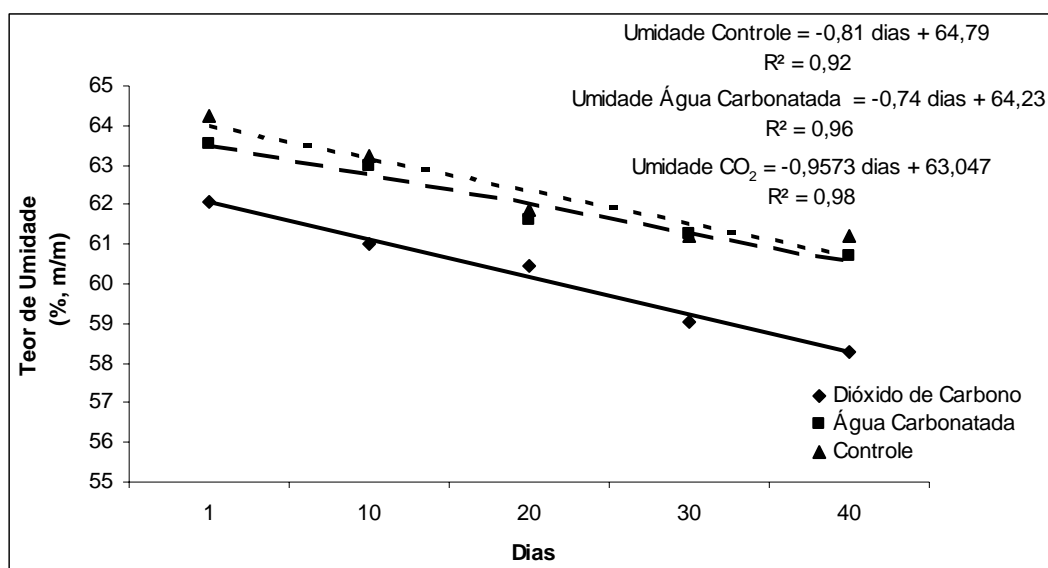


Figura 7 – Evolução dos teores médios de umidade dos queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos ao longo do tempo de armazenamento.

A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) e os tempos de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ), em relação ao teor de umidade do queijo Minas Frescal, onde os queijos tratados por injeção de  $\text{CO}_2$  apresentaram menor teor em relação aos que sofreram adição de água carbonatada e o controle, que, por sua vez, não diferiram entre si. Pelo estudo da regressão, a variável umidade apresentou tendência de redução linear ao longo do tempo, conforme modelos apresentados na Figura 7, onde o tempo variou no intervalo de 1 a 40 dias. A interação entre os tratamentos e os períodos de armazenamento, segundo a análise de variância, não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Na Tabela 7 são mostrados os valores médios de umidade para os três tratamentos do queijo Minas Frescal, para todos os tempos avaliados, demonstrando o efeito de tratamento.

Os queijos do tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  inicialmente já apresentaram teor de umidade inferior, em relação aos queijos dos demais tratamentos e a evolução dos teores de umidade durante o tempo de armazenamento também apresentou diferenças entre os tratamentos.

Tabela 7 – Valores médios de teor umidade para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos para todos os tempos

<b>Tratamentos</b>	<b>Umidade</b>
CO <sub>2</sub>	60,18 b
Água Carbonatada	62,02 a
Controle	62,13 a

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Este comportamento pode ter ocorrido por causa do pH mais baixo do queijo tratado por injeção de CO<sub>2</sub>, o que pode ter provocado maior dessoramento durante armazenamento sob refrigeração por 40 dias. Comparando-se o comportamento do pH dos queijos ao longo do armazenamento (Figura 6) com o comportamento da umidade desses mesmos queijos (Figura 7), observa-se que existe uma correlação direta entre o pH e a umidade presente na massa. Quanto maior a queda do pH, maior a que no teor de umidade dos queijos, o que pode ser observado em relação aos queijos tratados com injeção de CO<sub>2</sub>. Mantidas iguais as demais condições, quanto menor o pH do queijo, mais baixo é o seu teor de umidade. A maior acidificação do queijo leva a uma neutralização progressiva de sua carga, o que diminui a capacidade natural de retenção de água (FURTADO, 2005).

Para os tempos de estocagem, também foram encontradas diferenças significativas. No tempo 40 dias o valor de umidade foi muito menor do que os encontrados no início da estocagem. Esse comportamento foi esperado, visto que o menor pH encontrado para esse tempo leva conseqüentemente a um maior dessoramento e menores teores de umidade nos queijos. Na Tabela 8, estão os valores médios de umidade ao longo do tempo de estocagem refrigerada para os tratamentos para o queijo Minas Frescal.

Fox et al. (2000) afirmam que a desmineralização, ocorrida por meio da perda de cálcio e fosfato das frações de caseínas, por diminuição do pH, compromete a extensão das ligações entre essas micelas. Menor grau de ligação entre cadeias de caseínas pode ter ocorrido no tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>, favorecendo a formação de uma estrutura mais porosa no queijo, o que foi constatado posteriormente por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 8 – Valores médios de teor de umidade ao longo do tempo para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos

<b>Dias de estocagem</b>	<b>Umidade (%)</b>
1	63,29 a
10	62,40 ab
20	60,95 bc
30	60,51 bc
40	60,06 c

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Todos os tratamentos apresentaram redução na umidade ao longo do tempo. O grau de sinérese está diretamente relacionado à acidez e inversamente associado ao pH (FOX et al., 2000). Como a concentração de íons  $H^+$  aumenta durante a acidificação, as forças repulsivas diminuem, e as micelas de caseínas se tornam mais agregadas. A considerável expulsão de soro durante a estocagem resultou em significativa redução no teor de umidade dos queijos entre o 1<sup>o</sup> e o dia 40<sup>o</sup> dia de armazenamento.

#### **4.1.8. Extensão e profundidade da proteólise em função do tempo**

A proteólise é o evento bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação ou armazenagem dos queijos e é causada por agentes como coagulante residual, enzimas naturais do leite, fermentos lácteos adicionados, microbiota acompanhante, composta por bactérias lácticas não “starter” (NSLAB) e, em muitas variedades, enzimas dos fermentos secundários (SOUSA et al., 2001).

A extensão da proteólise é um índice de maturação que se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo, e expressadas como porcentagens do nitrogênio total. Esse valor é obtido pela razão entre o percentual de nitrogênio solúvel em pH 4,6 pelo nitrogênio total. A extensão da proteólise está relacionada com a hidrólise da matriz proteica, principalmente pela ação de coagulante residual (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

Na Figura 8, apresenta-se o comportamento da extensão da proteólise ao longo do armazenamento do queijo Minas Frescal dos diferentes tratamentos.

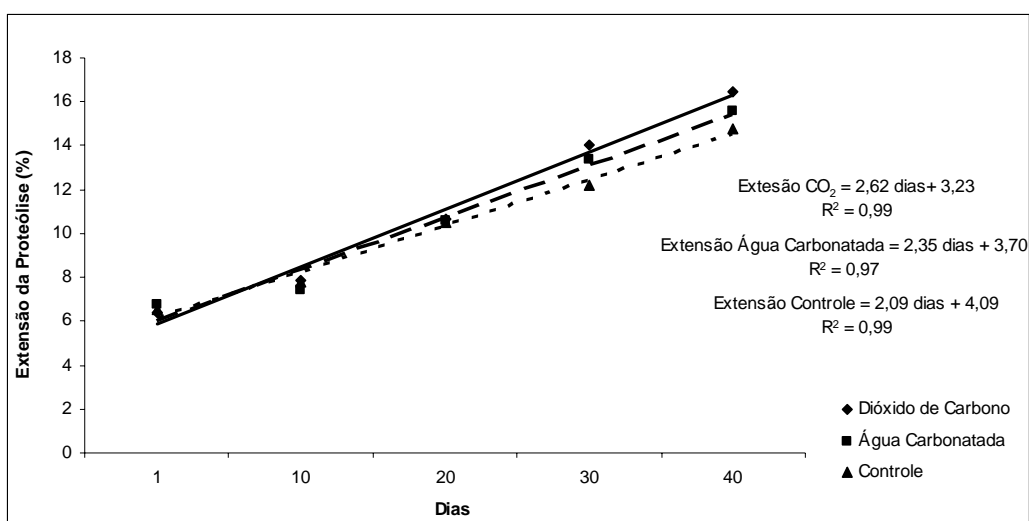


Figura 8 – Extensão da proteólise ao longo do armazenamento para o queijo Minas Frescal dos três tratamentos.

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à extensão da proteólise para os tratamentos, porém, para o tempo de armazenamento que varia de 1 a 40 dias, esta diferença foi constatada ( $p \leq 0,05$ ). A interação entre tratamento e tempo não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Pelo estudo da regressão, a variável extensão da proteólise apresentou tendência de aumento linear ao longo do tempo, conforme os modelos apresentados na Figura 8.

Na Tabela 9 são mostrados os valores médios de extensão ao longo do tempo de estocagem refrigerada para os tratamentos para o queijo Minas Frescal.

Na avaliação geral, os resultados médios para extensão da proteólise dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos apresentaram aumento linear desses índices ao longo do tempo de armazenamento. Nos tempos a partir de vinte dias os valores de extensão foram muito maiores do que os encontrados no início da estocagem refrigerada.

Tabela 9 – Valores médios de extensão ao longo do tempo para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos

Dias de estocagem	Extensão (%)
1	6,57 a
10	7,72 a
20	10,59 b
30	13,20 c
40	14,94 c

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a de 5% de probabilidade.

O aumento do índice de extensão a partir desse período indica que o queijo Minas Frescal é um queijo de consumo rápido sendo preferivelmente consumido em até dez dias de armazenamento sob refrigeração a 5°C. Após esse período é maior a possibilidade de formação de compostos como peptídeos amargos que prejudicam a aceitação do produto. Esse comportamento foi esperado em resposta ao aumento da degradação da matriz proteica provocado pela ação do coagulante, que é um dos maiores responsáveis pela proteólise na maioria dos queijos, principalmente os de alta umidade, o qual continua sua atividade durante a maturação e também pelo aumento das contagens de bactérias contaminantes como as NSLABs e outros grupos de microrganismos deterioradores se multiplicaram ao longo do tempo de armazenamento. O queijo Minas Frescal é um queijo de muito alta umidade. Sendo assim, o teor de lactose residual presente no queijo é elevado, o que favorece a multiplicação dessas bactérias deterioradoras mesmo durante a sua estocagem refrigerada.

A maior parte do coagulante adicionado é perdida no soro, porém uma parte é retida na massa do queijo. Aproximadamente 6 % a 20 % da quimosina adicionada é retida no queijo (FOX e Mc SWEENEY, 1998). Baixos níveis de pH durante a drenagem resultam em níveis mais elevados de retenção de coagulante, que está disperso na fase aquosa do queijo. Consequentemente, quanto mais umidade no queijo, maior será a atividade do coagulante na matriz proteica (Mc SWEENEY, 2007). A quantidade de coagulante residual retido no queijo é de grande importância para a proteólise durante a maturação e, em alguns casos, para o desenvolvimento de sabor, textura e funcionalidade dos



queijos. Uma série de fatores afeta a retenção e a atividade do coagulante no queijo: teor de umidade, temperatura de cozimento, quantidade de coagulante adicionado ao leite, teor de caseínas do leite, tamanho micelar das caseínas, temperatura de cozimento da massa, pH da massa, força iônica e pH do queijo.

Outro fator importante é que a plasmina e o plasminogênio acompanham as micelas caseínas na coagulação do leite e são concentradas no queijo. Desse modo, a atividade da plasmina também contribui para a proteólise primária da caseína. A ativação do plasminogênio em plasmina ativa depende da presença de ativadores de plasminogênio. Alguns ativadores de plasminogênio estão associados às células somáticas e, portanto, alta contagem de células somáticas também pode representar aumento na proteólise do queijo durante a estocagem. No caso do leite pasteurizado, o calor pode ter um papel relevante na dissociação do ativador do plasminogênio das células somáticas.

Os valores médios encontrados para extensão da proteólise neste experimento (Tabela 9) foram muito próximos aos observados por Sangaletti (2007) que encontrou valores variando de 5,72 % a 12,98 % ao avaliar a vida útil de queijos Minas Frescal armazenados por 30 dias sob refrigeração a 4 °C. Saboya et al. (1998) encontraram também valores próximos a esses (7,59 % a 13,03 %) ao avaliarem a evolução desse índice de proteólise do queijo Minas Frescal durante 21 dias. Isepon e Oliveira (1993) encontraram valores que variaram de 4,99 % a 10,71 % no 1<sup>o</sup> e no 13<sup>o</sup> dia de armazenamento de queijos Minas Frescal, respectivamente. Wolfschoon-Pombo e Lima (1989) encontraram valores médios para extensão da proteólise que variaram de 5,8 % a 10,9 % durante quinze dias de estocagem refrigerada, para queijo Minas Frescal com leite pré-acidificado com ácido láctico. Dias (2009) ao comparar o queijo Minas Frescal adicionado de cultura láctica com os queijos obtidos a partir de leite acidificado com adição de ácido láctico e CO<sub>2</sub> encontrou aumento no índice de extensão da proteólise dos que variou de 4,46 % a 14,82 % durante treze dias de armazenamento para o queijo adicionado de cultura láctica. No entanto, para os queijos fabricados com adição de ácido láctico ao leite, os valores de extensão da proteólise variaram de 4,42 % até 9,36 % e para os queijos obtidos a partir da

acidificação do leite com CO<sub>2</sub> os valores de extensão variaram de 4,42 % a 10,03 % durante os treze dias de armazenamento refrigerado.

Metzger et al. (2000) reportaram maior extensão e profundidade da proteólise em queijos mussarela onde o leite foi acidificado a pH de 6,0 e 5,8 com ácido cítrico e acético sendo que foi utilizada a mesma dosagem de coagulante para os diferentes tratamentos. Uma alta atividade de quimosina no leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> aumentaria a retenção de enzima residual. As condições no tratamento com CO<sub>2</sub> seriam mais favoráveis para a atuação da quimosina, bem como para a difusão de frações de caseína para a fase aquosa do queijo (NELSON et al., 2004).

A profundidade da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixa massa molecular, acumuladas durante o processo. Os compostos característicos são os aminoácidos, peptídeos menores, aminas e outros compostos nitrogenados. Esta variável é obtida pela razão entre o percentual de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12 % (m/v) pelo nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

Na Figura 9 encontra-se o comportamento da profundidade da proteólise ao longo do armazenamento para os diferentes tratamentos, para o queijo Minas Frescal.

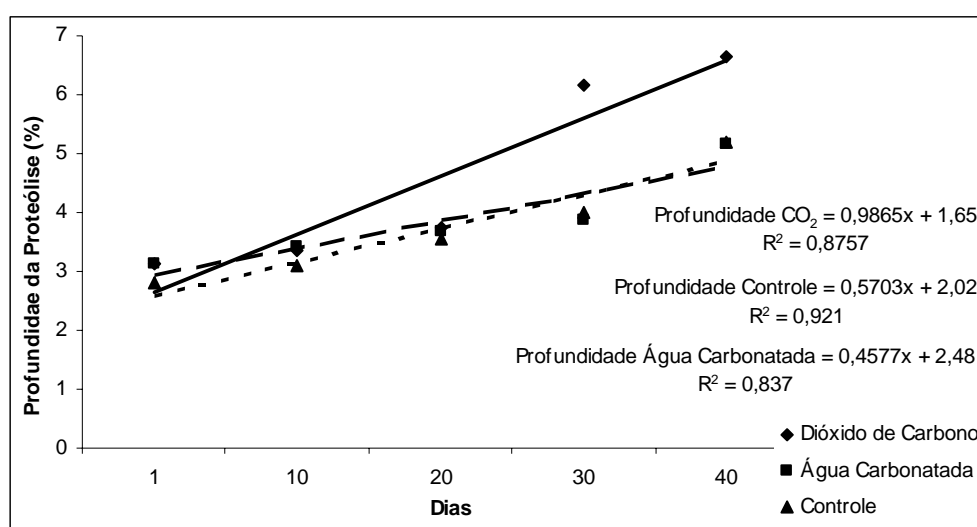


Figura 9 – Profundidade da proteólise ao longo do armazenamento para o queijo Minas Frescal dos diferentes tratamentos.

Com relação à profundidade da proteólise a análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) para os tratamentos, porém, para os tempos de armazenamento, que variam de 1 a 40 dias houve diferença ( $p\leq 0,05$ ). A interação entre tratamento e período, segundo a análise de variância, apresentou diferença não significativa ( $p>0,05$ ). Na Tabela 10, estão os valores médios de profundidade ao longo do tempo de estocagem refrigerada para os tratamentos para o queijo Minas Frescal. A variável profundidade da proteólise apresentou tendência de aumento linear ao longo do tempo, conforme os modelos apresentados na Figura 9.

Tabela 10 – Valores médios de profundidade ao longo do tempo para os queijos Minas Frescal dos três tratamentos

Dias de estocagem	Profundidade (%)
1	3,01 a
10	2,97 a
20	3,53 a
30	4,68 ab
40	5,67 b

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados para profundidade da proteólise dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos apresentaram aumento desse índice ao longo do tempo de armazenamento com médias variando de 3,01 % a 5,67 % durante o período avaliado. Nos tempos a partir de 30 dias e 40 dias, os valores de extensão foram bem maiores do que os encontrados no início da estocagem refrigerada. Esse resultado indica que ocorreu uma degradação mais acentuada da matriz proteica do queijo com liberação de frações nitrogenadas de baixa massa molecular provocado principalmente pela ação de enzimas como aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, provenientes de bactérias contaminantes e das NSLABs (*Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, entre outros), principalmente após a lise das células. No queijo Minas Frescal, a formação de frações nitrogenadas de baixa massa molecular pode impactar negativamente no

sabor e no aroma dos queijos, de forma que o tempo de vida útil normalmente adotado pelas empresas, para o queijo Minas Frescal armazenado a 5 °C, deve ser de no máximo 30 dias, a partir do qual o aumento na degradação proteica tornaria os queijos inaceitáveis aos consumidores.

Os valores de extensão da proteólise para este experimento foram inferiores aos obtidos por Wolfschoon-Pombo e Lima (1989) que encontraram valores médios para profundidade da proteólise variando de 3,6 % a 5,8 % durante quinze dias de estocagem refrigerada para queijo Minas Frescal fabricado a partir de leite pré-acidificado com ácido láctico. No entanto, Dias (2009) registrou valores médios para profundidade de proteólise de 4,94 % para o queijo controle (adicionado de cultura láctica), 2,73 % para os queijos fabricados com leite acidificado com adição de ácido láctico e 2,89 % para o queijo obtido de leite acidificado com adição de CO<sub>2</sub>.

Pelos resultados encontrados para a extensão e profundidade da proteólise, os dados indicam que estes índices aumentaram significativamente durante os 40 dias de armazenamento refrigerado para os queijos Minas Frescal dos diferentes tratamentos. Essa evolução nos índices de proteólise durante o armazenamento pode estar relacionada com a ação de enzimas do coagulante, que continuam o seu processo de hidrólise ao longo do tempo, e com a ação de enzimas de microrganismos deterioradores (NSLAB e outros) que originam peptídeos e aminoácidos.

#### **4.1.9. Análises microbiológicas**

##### **4.1.9.1 Análises microbiológicas do leite**

A contagem padrão média para o leite utilizado nos diferentes tratamentos foi de 2,54 log UFC/mL. As amostras de leite pasteurizado dos diferentes tratamentos apresentaram contagens inferiores a 1 UFC/mL para coliformes a 30 °C ou a 45 °C e para fungos filamentosos e leveduras, encontrando-se,

portanto, dentro do limite permitido pela Instrução Normativa nº 51 de 2002 para leite pasteurizado (BRASIL, 2002).

#### **4.1.9.2 Análises microbiológicas dos queijos**

As amostras de queijos dos diferentes tratamentos apresentaram ausência de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra. As contagens médias de *Staphylococcus aureus* foram: <10 UFC/g, 133 UFC/g e 383 UFC/g para os queijos dos tratamentos com injeção de CO<sub>2</sub>, adição água carbonatada e controle, respectivamente. As amostras encontravam-se, portanto, dentro do limite de tolerância para amostra indicativa conforme RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001).

Dias (2009) encontrou contagens de *S. aureus* < 1,0 x 10<sup>2</sup> UFC/g para os queijos fabricados com pré-acidificação do leite com ácido láctico ou com CO<sub>2</sub>, até pH próximo de 6,2 e para o queijo adicionado de cultura láctica.

##### **4.1.9.2.1. Contagem de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos do queijo em função do tempo**

Os resultados da evolução das contagens de aeróbios mesófilos em função dos tempos de armazenamento, durante os 40 dias de estocagem estão apresentados na Figura 10.

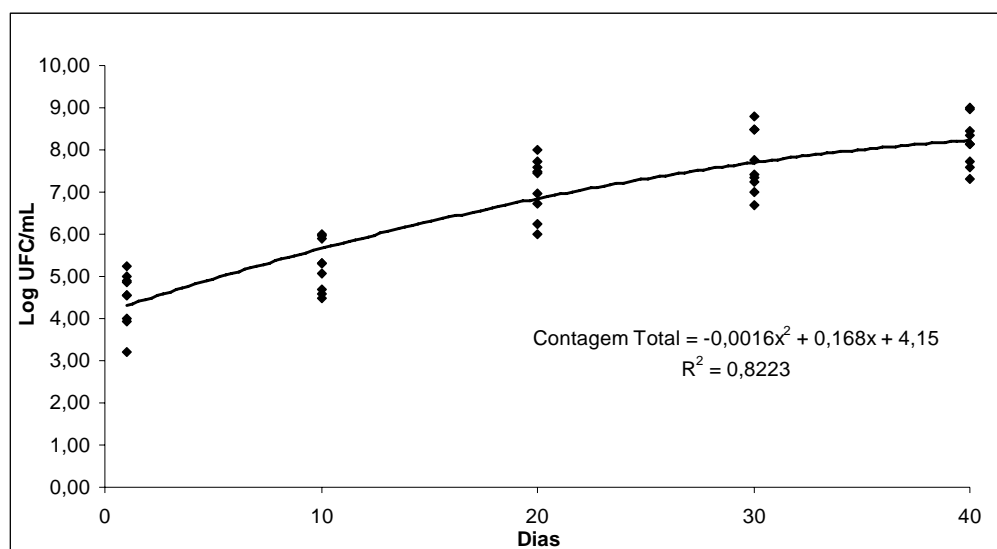


Figura 10 – Evolução das contagens de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos em função do tempo para o queijo Minas Frescal.

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à contagem de aeróbios mesófilos dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos (injeção de  $\text{CO}_2$ , adição de água carbonatada e controle). No entanto, para os tempos de armazenamento que variam de 1 a 40 dias, essa diferença foi significativa ( $p \leq 0,05$ ). A interação entre tratamento e período, segundo a análise de variância, também não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Pelo estudo da regressão, houve efeito significativo de tempo de armazenamento e a contagem total apresentou uma tendência quadrática ao longo do tempo através do modelo demonstrado na Figura 10.

Pelos resultados, pode-se observar que a contagem de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos para os diferentes tratamentos aumentou ao longo do tempo de estocagem refrigerada. Esse aumento na contagem total de bactérias mesofílicas é esperado em queijos Minas Frescal em razão das condições favoráveis de multiplicação microbiana como elevado pH, ausência de fermento e presença de lactose. Sangaletti (2007) também observou aumento em média de 2,57 log UFC/g a cada 10 dias de armazenamento para contagem de bactérias mesofílicas em queijo Minas Frescal armazenado por 30 dias.

Ao avaliar a linha de produção de queijo Minas Frescal de uma fábrica de queijos, Lisita (2005) encontrou 4,75 log UFC/mL no leite pasteurizado e 9,45 log UFC/g no queijo antes da salga em salmoura.

Dias (2009) registraram aumento na contagem total dos queijos fabricados a partir de leite pré-acidificado com ácido láctico e com CO<sub>2</sub> (pH 6,2) que apresentaram população inicial de 4,70 e 4,60 log UFC/g até atingirem contagens de em torno de 7,00 log UFC/g no final do armazenamento por 25 dias. Esse aumento foi justificado pela presença de microrganismos resistentes à pasteurização, que se desenvolveram no queijo.

Não existem na legislação brasileira normas com padrões microbiológicos estabelecidos para contagem de bactérias mesofílicas em queijo Minas Frescal. Entretanto, a enumeração desse grupo microbiano tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e servem pra estimar o seu tempo de vida útil. Quando presentes em concentrações elevadas, podem afetar a qualidade, comprometendo a estabilidade dos produtos alimentícios durante a estocagem. Alterações ocasionadas por esses microrganismos são evidenciadas pelo aparecimento de “off-flavor” (JAY, 2005).

#### **4.1.9.2.2. Contagem de coliformes totais**

Na Figura 11 é apresentada a evolução das contagens de coliformes totais em função dos tempos de armazenamento para o queijo Minas Frescal.

As contagens de coliformes totais ao longo do armazenamento também apresentaram comportamento semelhante às contagens de aeróbios mesófilos. Para esse grupo microbiano também não houve efeito significativo dos tratamentos ( $p > 0,05$ ), bem como da interação tratamento e tempo ( $p > 0,05$ ). Porém, houve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) do tempo de armazenamento e a contagem apresentou tendência quadrática de crescimento (Figura 11).

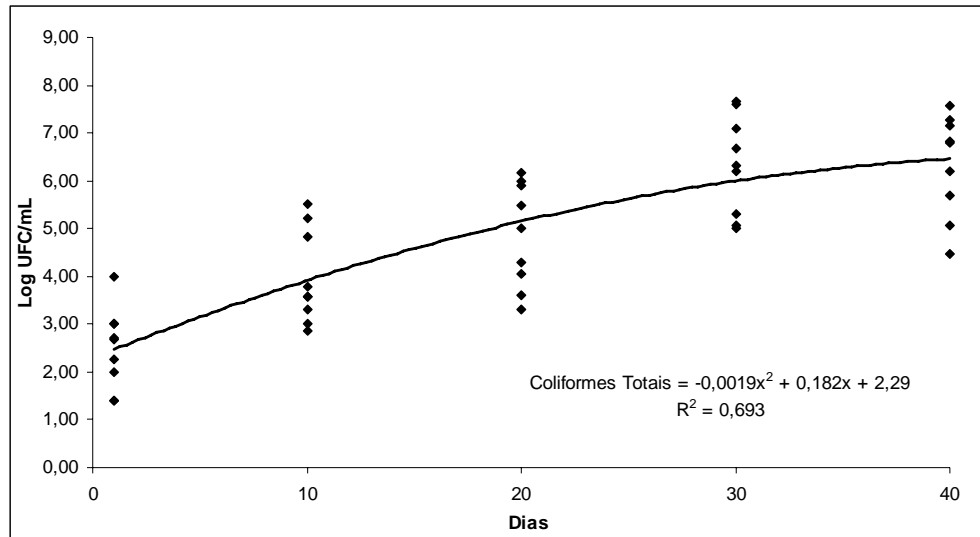


Figura 11 – Evolução das contagens de coliformes totais em função do tratamento e do tempo para o queijo Minas Frescal.

As contagens de coliformes totais dos diferentes tratamentos também apresentaram aumento do número ao longo do tempo de estocagem refrigerada. Ao avaliar a linha de produção de queijo Minas Frescal de uma fábrica de queijos, Lisita (2005) encontrou aumento 11,77 ciclos log entre a contagem no leite pasteurizado e no queijo após salga em salmoura, demonstrando que tal queijo estaria impróprio para o consumo mesmo antes da sua comercialização. Dias (2009) também registrou aumento de coliformes totais nos queijos Minas Frescal fabricados com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> que apresentou contagem inicial de 58 NMP/g e aumentou para > 2400 NMP/g aos 25 dias de armazenamento.

#### 4.1.9.2.3. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Na Figura 12 estão os resultados da evolução das contagens de fungos filamentosos e leveduras em função dos tempos de armazenamento para o queijo Minas Frescal.



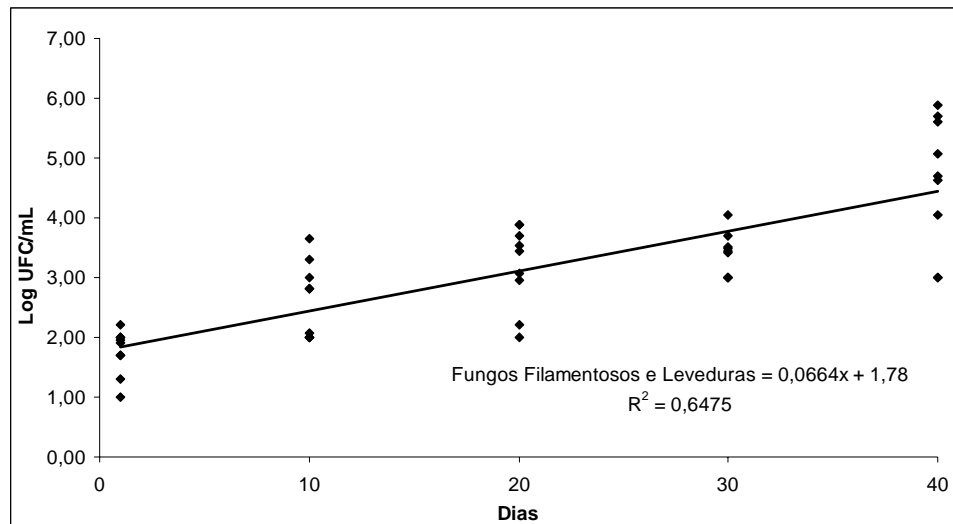


Figura 12 – Evolução das contagens de fungos filamentosos e leveduras em função do tratamento e do tempo para o queijo Minas Frescal.

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos (injeção de  $\text{CO}_2$ , adição de água carbonatada e controle), porém, foi constatado efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para os tempos de armazenamento, que variaram de 1 a 40 dias. A interação entre tratamento e período também não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Pelo estudo da regressão, a variável fungos filamentosos e leveduras apresentou relação linear ao longo do tempo de armazenamento (Figura 12).

Pelos resultados pode-se observar que a contagem de fungos filamentosos e leveduras dos diferentes tratamentos aumentou ao longo do tempo de estocagem. Dias (2009) registrou menores contagens de *Pseudomonas* ssp. e de fungos filamentosos e leveduras durante a vida de prateleira do queijo fabricado a partir de leite acidificado com  $\text{CO}_2$ , em escala piloto, sugerindo assim o  $\text{CO}_2$  como um bom inibidor de certos grupos microbianos, o que seria uma vantagem se associado com o uso de culturas lácticas as quais possuem efeito inibidor comprovado. Como o queijo Minas Frescal é um queijo fabricado com alto grau de manipulação, apresenta um elevado teor de umidade e lactose, e baixo teor de NaCl, sendo esse produto muito sensível a contaminações. Dessa forma, qualquer

tratamento que apresente alguma proteção frente a qualquer grupo de contaminantes seria de grande interesse da indústria de laticínios.

Não existem na legislação brasileira normas com padrões microbiológicos estabelecidos para fungos filamentosos e leveduras em queijos Minas Frescal. No entanto, a qualidade de produtos lácteos, em termos microbiológicos, também pode ser verificada a partir da determinação quantitativa de fungos filamentosos e leveduras, constituindo boa fonte de informações acerca das condições de higiene, a fim de verificar as condições sanitárias do processo, do ambiente e do estabelecimento. Fungos filamentosos e leveduras são os microrganismos que mais contaminam os ambientes na indústria de laticínios (ANDRADE, 2008).

#### 4.1.10 Análise sensorial

##### 4.1.10.1 Aceitação sensorial

Em relação aos tempos de estocagem avaliados, na Figura 13 apresenta-se o comportamento da aceitação sensorial do queijo Minas Frescal em função dos tratamentos e dos tempos de armazenamento.

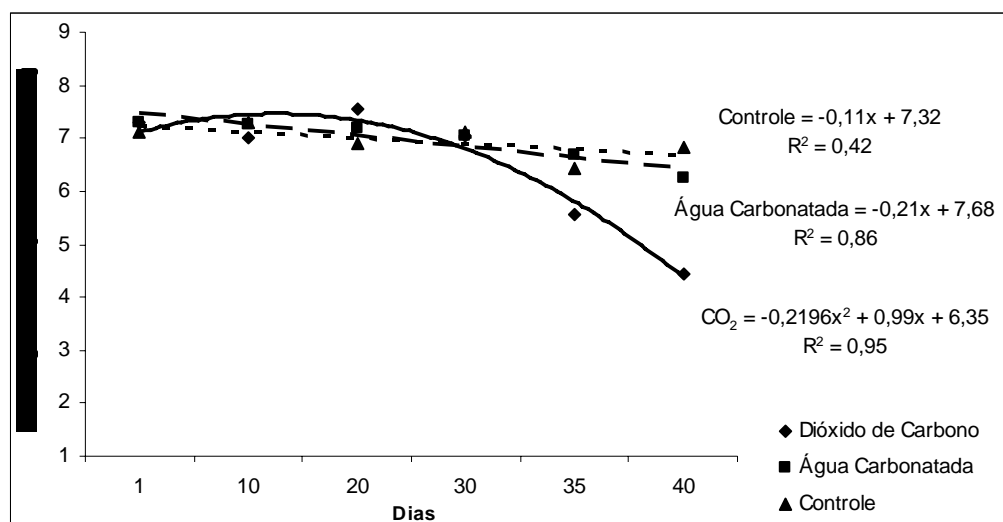


Figura 13 – Comportamento da aceitação sensorial do queijo Minas Frescal em função dos tratamentos e dos tempos de armazenamento.

A análise de variância indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para os queijos tratados pelas diferentes formas de incorporação de  $\text{CO}_2$  e controle, para os tempos de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ) e para a interação tratamento e tempo ( $p \leq 0,05$ ) em relação à aceitação sensorial. Na Tabela 11 são apresentadas as notas médias dos provadores na escala hedônica de nove pontos durante o tempo de estocagem refrigerada para os diferentes tratamentos para o queijo Minas Frescal.

Tabela 11 – Notas médias dos provadores na escala hedônica de nove pontos durante o tempo de estocagem refrigerada para os diferentes tratamentos para o queijo Minas Frescal

Dias de estocagem	$\text{CO}_2$	Água Carbonatada	Controle	Média
1	7,30 a	7,30 a	7,10 a	7,23
10	7,00 a	7,27 a	7,30 a	7,19
20	7,57 a	7,20 a	6,90 a	7,22
30	7,03 a	7,03 a	7,13 a	7,06
35	5,57 b	6,67 a	6,43 ab	6,22
40	4,43 b	6,23 a	6,83 a	5,83
Média	6,48	6,95	6,95	

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na avaliação da média geral, houve ligeira queda na pontuação da aceitação sensorial durante o tempo de armazenamento, porém essa queda não indicou rejeição por parte dos consumidores, porque a pontuação foi maior que 6 até 30 dias de armazenamento. Os queijos dos tratamentos com água carbonatada e controle não diferiram entre si e ambos tiveram escores superiores aos dos queijos do tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$ . No entanto, no desdobramento da interação tratamento e tempo de armazenamento, comparando-se os tratamentos em cada tempo analisado, pode ser demonstrado que o período de armazenamento influenciou na aceitação sensorial somente a partir dos 35 dias de armazenamento, quando o queijo tratado com injeção de  $\text{CO}_2$  apresentou média de aceitação sensorial menor ( $p \leq 0,05$ ) do que o queijo adicionado de água carbonatada, porém ambos não diferiram estatisticamente do tratamento controle ( $p > 0,05$ ). No tempo 6, aos 40 dias de armazenamento, o tratamento com injeção

de CO<sub>2</sub> apresentou média de aceitação sensorial inferior ( $p \leq 0,05$ ) aos demais tratamentos, que, por sua vez, também não diferiram entre si.

O queijo Minas Frescal é um queijo de curta durabilidade (aproximadamente até 10 dias) no mercado e de consumo rápido. Sendo assim, raramente seria consumido após 30 dias de armazenamento, período até o qual não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, com relação à aceitabilidade sensorial, pelo desdobramento da interação tratamento e tempo. Sendo assim, o tratamento controle poderia ser substituído pelo tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> no leite para fabricação do queijo Minas Frescal.

#### **4.1.10.2 Análise de preferência**

Os testes de preferência são usados quando se deseja comparar vários produtos quanto à preferência. Esses testes, embora avaliem a preferência dos consumidores, não indicam se eles gostaram ou não dos produtos avaliados. O pesquisador deve ter conhecimento prévio sobre a avaliação efetiva desses produtos. Nas indústrias de alimentos, esses testes são utilizados no desenvolvimento de novos produtos, melhoria de produtos, alteração de processos de produção, formulação de produtos, entre outros. O método de ordenação determina a ordem de preferência entre três ou mais amostras. O método é rápido e permite avaliar várias amostras numa mesma sessão (MINIM, 2006).

Com relação ao teste de ordenação (preferência), encontram-se na Tabela 12 os resultados das somas das ordens de cada tratamento para cada tempo estudado. Os pares de soma de ordens seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada tempo, nas linhas, não diferem entre si quanto à preferência, pelo teste de Friedman a 5 % de probabilidade.

Tabela 12 – Soma de ordens de preferência dos três tratamentos em cada tempo para o teste de ordenação

Dias	Tratamentos		
	Injeção de CO <sub>2</sub>	Controle	Água Carbonatada
1	57 a	64 a	59 a
10	63 a	56 a	61 a
20	55 a	66 a	59 a
30	63 a	57 a	60 a
35	67 a	60 a	53 a
40	79 b	46 a	55 a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

Pelos resultados apresentados na Tabela 12, observa-se que não houve preferência significativa ( $p > 0,05$ ) entre os queijos nos diferentes tratamentos nos tempos 1, 10, 20, 30 e 35 dias. Para o tempo de 40 dias de estocagem, observa-se que os queijos obtidos do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> foram menos preferidos entre os consumidores.

#### 4.1.11 Análise microestrutural

Na Figura 14 são mostradas as micrografias dos queijos Minas Frescal submetidos aos diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub> estudados nos dias 7 e 29 de armazenamento.

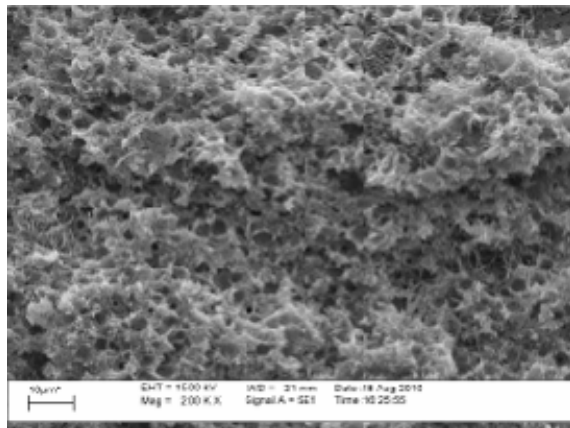
Diferenças na microestrutura, aos 7 dias, foram observadas, onde a matriz proteica do queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub> (A-7) apresentou visualmente uma estrutura mais compacta, com maior número de poros de tamanho reduzido em comparação com a matriz proteica dos queijos dos demais tratamentos. Tal fato pode ser explicado pelo menor pH do queijo. O tratamento com adição de água carbonatada (C-7) apresentou visualmente uma microestrutura com poros maiores em comparação aos demais tratamentos (A-7) e (B-7), além de apresentar maior número de poros em relação ao tratamento controle (B-7), porém, em menor número quando comparado ao tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (A-7). O tratamento controle (B-7) apresentou visualmente uma microestrutura menos porosa e mais compacta em relação ao queijo adicionado de água

carbonatada (C-7). Aos 29 dias, todos os tratamentos (A-7, B-7 e C-7) apresentaram visualmente uma microestrutura semelhante às demonstradas aos 7 dias, em termos comparativos de tamanho e porosidade da matriz proteica. Porém, todas as estruturas encontravam-se mais dilatadas, o que foi claramente observado na avaliação dos queijos por meio da microscopia eletrônica de varredura aos 29 dias. Tal expansão da rede proteica pode ser explicada pela proteólise ocorrida durante o armazenamento do queijo por 29 dias.

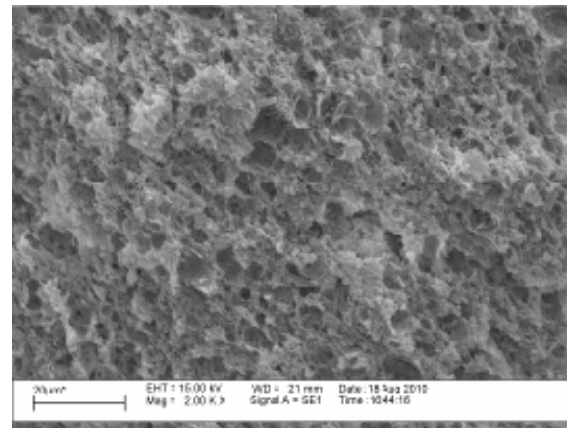
Fox et al. (2000) afirmam que a desmineralização, ocorrida através da perda de cálcio e fosfato das micelas de caseínas, é proveniente da diminuição do pH, e compromete a extensão das ligações entre as micelas. Menor grau de ligação entre as caseínas pode ter ocorrido no tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>. Esse fato pode ter refletido na formação de redes de proteínas menos extensas, favorecendo assim a formação de muitos pequenos espaços vazios (poros) na estrutura proteica, interferindo com as interações entre as cadeias de caseínas e favorecendo a formação de uma estrutura de proteínas altamente porosa e compacta. Freire (2009) também encontrou diferenças na microestrutura dos queijos, ao avaliar o efeito da adição de *Bifidobacterium* e, ou o emprego da acidificação direta sobre as propriedades de queijo Minas Frescal, porém, os queijos sem ácido láctico apresentaram visualmente uma estrutura mais compacta.

De acordo com Viotto e Oliveira (1998), para queijo Minas Frescal, esse comportamento decorre do fato de que o coágulo desses queijos elaborados por acidificação direta é formado por partículas de caseínas de menores tamanhos e mais desmineralizadas, resultando em uma rede proteica mais frágil.

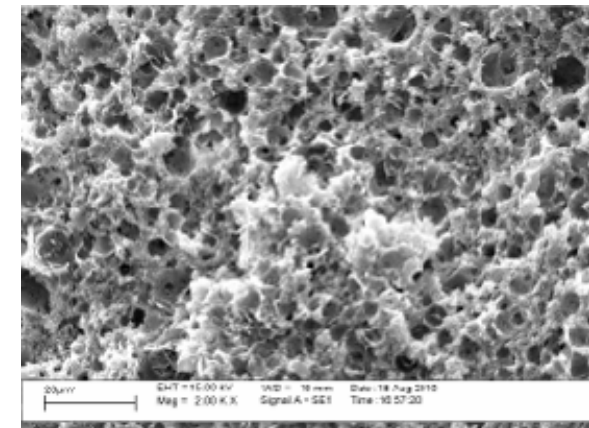
Como existe grande relação entre microestrutura, reologia e textura dos queijos (MADADLOU et al., 2007), a matriz proteica mais compacta observada na Figura 14 (A-7) poderia justificar a maior firmeza e fraturabilidade e maior comportamento sólido (elástico) encontrados posteriormente nas análises de textura e reologia, respectivamente, dos queijos com injeção de CO<sub>2</sub>.



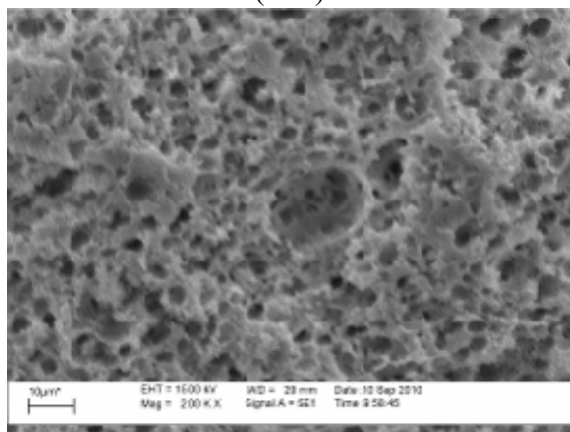
(A-7)



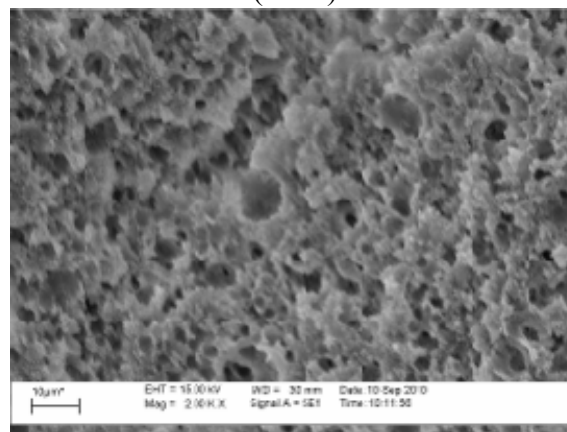
(B - 7)



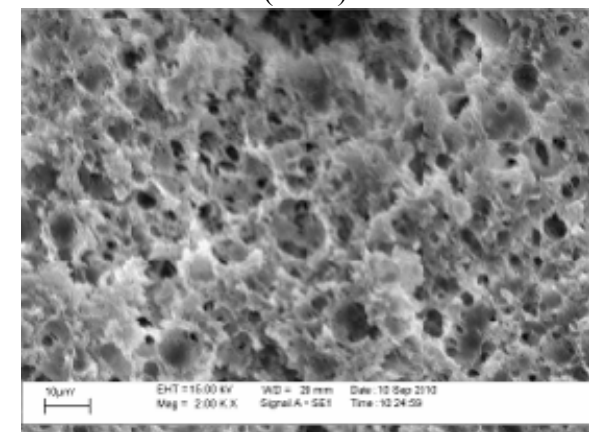
(C - 7)



(A - 29)



(B - 29)



(C - 29)

Figura 14 – Micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos Minas Frescal submetidos aos diferentes tratamentos; (A-7) queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, aos 7 dias, (B-7) queijo do tratamento Controle, aos 7 dias, (C-7) queijo do tratamento com adição de água carbonatada, aos 7 dias; (A-29) queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, aos 29 dias, (B-29) queijo do tratamento Controle, aos 29 dias, (C-29) queijo do tratamento com adição de água carbonatada, aos 29 dias.

#### 4.1.12 Análise reológica

Os queijos, em geral, são considerados materiais viscoelásticos (Fox et al., 2000). Vários fatores, principalmente de sua composição físico-química, são conhecidos por influenciar a textura dos queijos, como exemplo, os teores de proteína, gordura, sal, minerais e pH (VISSER, 1991).

Ensaio oscilatório fornece importantes informações sobre as propriedades viscoelásticas dos queijos, tais como módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ), os quais caracterizam o comportamento sólido (elástico) e líquido (viscoso), respectivamente, bem como a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) e tangente de fase ( $\tan \delta = G''/G'$ ).

Na Tabela 13, são apresentados os atributos reológicos ao longo do tempo de estocagem dos queijos Minas Frescal tratado com os diferentes métodos de incorporação de  $\text{CO}_2$ .

Tabela 13 – Atributos reológicos ao longo do tempo de estocagem dos queijos Minas Frescal tratado com os diferentes métodos de incorporação de  $\text{CO}_2$

Estocagem do queijo (dias)	Tratamento	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	Tan $\delta$	$\eta^*$ (Pa.s)
7	$\text{CO}_2$	39875,00	8403,50	0,21	6486,00
	Branco	31483,33	6771,33	0,22	5125,33
	Água carbonatada	28833,33	6112,67	0,21	4690,67
14	$\text{CO}_2$	37946,67	8371,00	0,22	6184,33
	Branco	34985,00	7437,00	0,21	5692,00
	Água carbonatada	31325,00	6939,00	0,22	5106,50
21	$\text{CO}_2$	39286,67	8762,67	0,22	6407,00
	Branco	36363,33	8153,67	0,22	5930,67
	Água carbonatada	33220,00	7443,00	0,22	5418,67
28	$\text{CO}_2$	45936,67	10596,67	0,23	7503,00
	Branco	44390,00	10446,33	0,24	7258,00
	Água carbonatada	32416,67	7524,67	0,23	5296,67
35	$\text{CO}_2$	85636,67	18053,67	0,24	12471,33
	Branco	45390,00	9836,00	0,23	6861,00
	Água carbonatada	37143,33	7579,00	0,23	5432,00

Legenda: \* valores médios de cada tratamento em cada tempo.



Na caracterização reológica dos queijos Minas Frescal submetidos aos diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub> verificou-se que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras, para os atributos reológicos: componente elástico ( $G'$ ), componente viscoso ( $G''$ ) e viscosidade complexa ( $\eta^*$ ). O método de incorporação de CO<sub>2</sub> e o período de armazenamento do queijo por cinco semanas alteraram as propriedades viscoelásticas dos queijos Minas Frescal.

Durante todo o período de armazenamento, os queijos submetidos aos diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub> apresentaram valores do módulo de armazenamento ( $G'$ ) superiores ao módulo de perda ( $G''$ ) para toda a faixa de frequência estudada, mostrando o caráter sólido dos queijos.

Observou-se diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento para os atributos  $G'$ ,  $G''$ ,  $\eta^*$  e  $\tan \delta$  que apresentaram crescimento linear em função do tempo. A interação entre tratamento e tempo de armazenamento, segundo a análise de variância, apresentou diferença significativa para os atributos reológicos estudados ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao tratamento controle, os valores de  $G'$ ,  $\eta^*$  e  $\tan \delta$  aumentaram linearmente em função do tempo durante o período de estocagem. Já para o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>, não houve tendência significativa em função do tempo apenas para o atributo  $G''$ . Para o tratamento com adição de água carbonatada, os atributos  $G'$  e  $\eta^*$  não apresentaram tendência significativa, porém, os atributos  $G''$  e  $\tan \delta$  aumentaram em função do tempo para esses tratamentos.

Para o tempo de 7, 14 e 21 dias de armazenamento, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) em relação aos atributos reológicos estudados. Aos 28 dias de armazenamento, o queijo Minas Frescal tratado com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou maiores valores de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  em relação ao tratamento com adição de água carbonatada, não diferindo estatisticamente do tratamento controle. Em relação à última semana de armazenamento, o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou maiores valores de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  diferindo dos demais tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). Isto se deve provavelmente ao maior decaimento do queijo que foi constatado pelo teor de umidade muito mais baixo encontrado para esse tratamento na última semana de análise. Este

resultado também corrobora aqueles encontrados durante o estudo de TPA que detectou maior firmeza e fraturabilidade para o queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub> e durante o estudo da microestrutura realizado por meio da microscopia eletrônica de varredura em que foi observado que a matriz proteica do queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub> (Figura 14, A-7 e A-29) apresentou visualmente uma estrutura mais compacta, com maior número de poros de tamanho reduzido em comparação com matriz proteica dos queijos dos demais tratamentos. Segundo Karoui & Dufour (2003), alguns fatores podem afetar a viscoelasticidade de queijos e estão geralmente relacionados ao conteúdo de água, proteólise e pH.

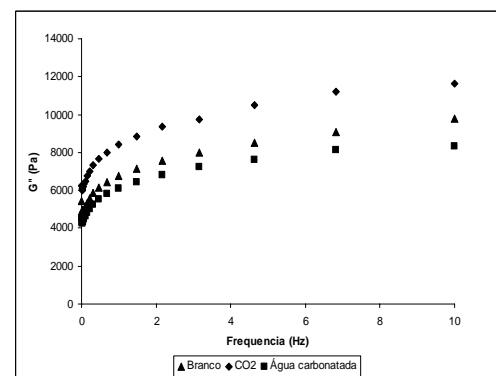
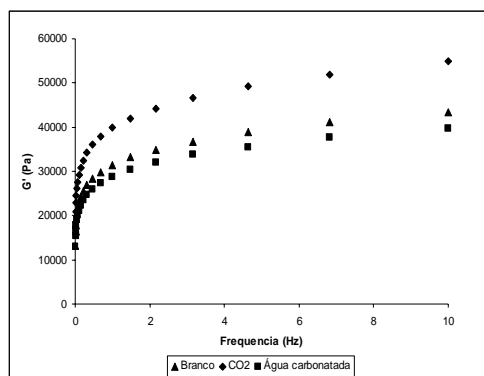
Os queijos, como outros produtos alimentícios, possuem propriedades reológicas que são importantes para a sua qualidade e aceitabilidade pelo consumidor, tais como firmeza e textura. Tais propriedades estão relacionadas diretamente com a composição e microestrutura do produto, assim como o estado físico-químico desses componentes, força de interação entre os elementos estruturais e a microestrutura (FOX et al., 2000).

A  $\tan \delta$  indica a predominância da propriedade elástica ou viscosa na amostra. Não houve diferença entre os tratamentos em relação à  $\tan \delta$  ( $p > 0,05$ ) durante o período de armazenamento. Portanto, a  $\tan \delta$  não foi afetada pelo método de incorporação de CO<sub>2</sub> na faixa de frequência estudada.

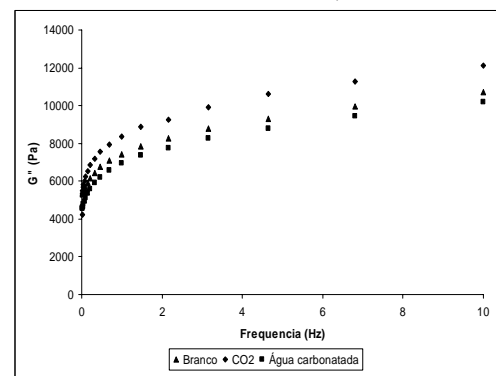
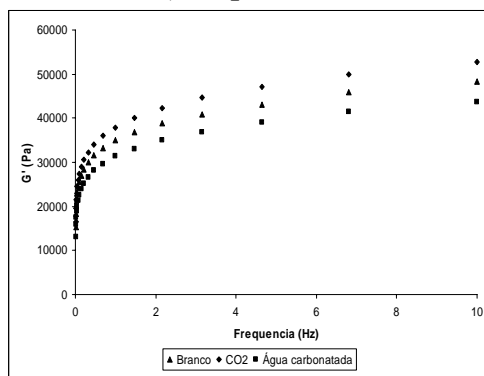
O efeito dos diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub> sobre o atributo reológico  $G'$  dos queijos Minas Frescal em função da temperatura, são apresentados na Figura 16. Para todos os queijos os valores de  $G'$  diminuíram com o aumento da temperatura até aproximadamente 35 °C. Após essa temperatura,  $G'$  permanece praticamente constante. A temperaturas inferiores a 20 °C, o queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou maior valor de  $G'$  do que o controle e o queijo tratado com água carbonatada. Com o aumento da temperatura, as diferenças entre os tratamentos foram menos pronunciadas. Durante o período de estocagem,  $G'$  foi superior a  $G''$  para todos os tratamentos, não havendo cruzamento das curvas (*crossover*) com o aumento da temperatura. A propriedade elástica predominou sobre componente viscoso em toda faixa de temperatura estudada, sendo assim o queijo Minas Frescal dos diferentes

tratamentos não apresenta derretimento mesmo em temperaturas elevadas como 85 °C. O ponto de cruzamento entre as curvas de  $G'$  e  $G''$  representa a transição do queijo de um comportamento elástico ( $G' > G''$ ) para um comportamento mais viscoso ( $G'' > G'$ ), o que caracteriza o ponto de derretimento (*melting*) em queijos (LUCEY et al., 2003).

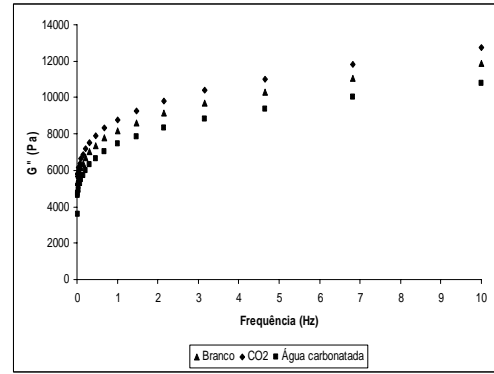
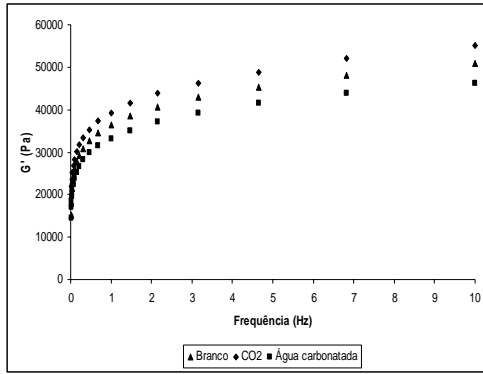
Na Figura 15, mostra-se a varredura de frequência na avaliação dos componentes de viscoelasticidade ( $G'$  e  $G''$ ) dos queijos Minas Frescal ao longo do período de estocagem.



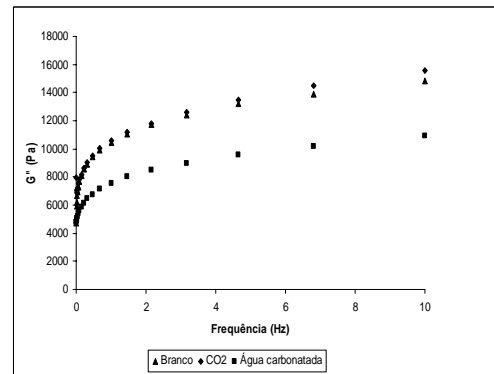
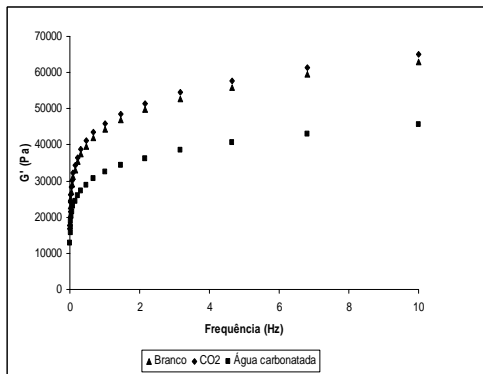
(componentes de viscoelasticidade  $G'$  e  $G''$  aos 7 dias)



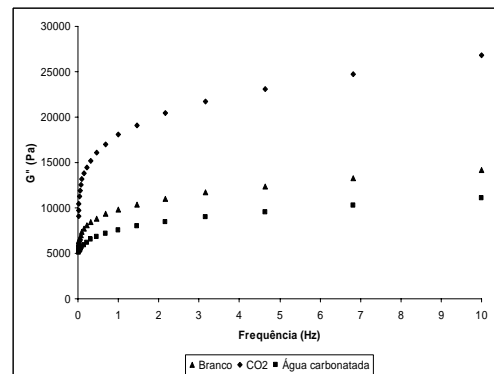
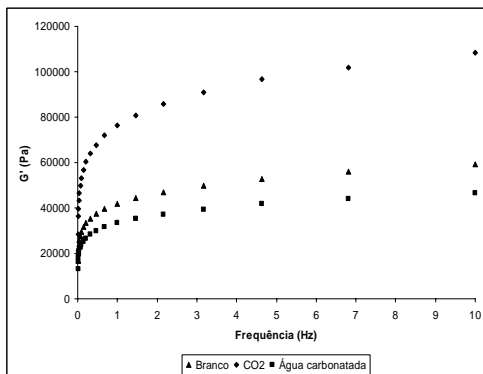
(componentes de viscoelasticidade  $G'$  e  $G''$  aos 14 dias)



(componentes de viscoelasticidade  $G'$  e  $G''$  aos 21 dias)

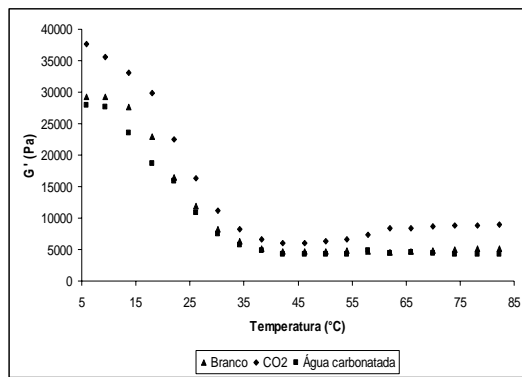


(componentes de viscoelasticidade  $G'$  e  $G''$  aos 28 dias)

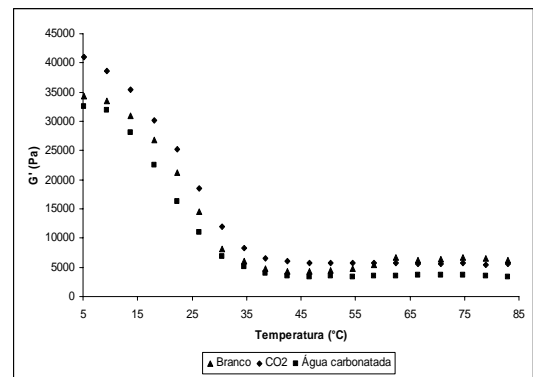


(componentes de viscoelasticidade  $G'$  e  $G''$  aos 35 dias)

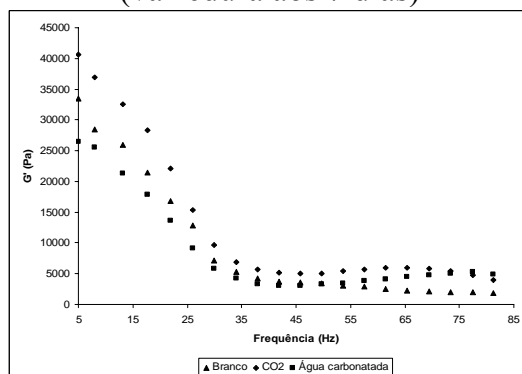
Figura 15 – Varredura de frequência na avaliação dos componentes de viscoelasticidade ( $G'$  e  $G''$ ) dos queijos Minas Frescal ao longo do período de estocagem.



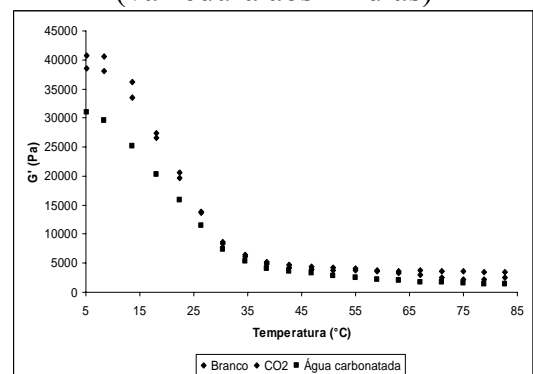
(varredura aos 7 dias)



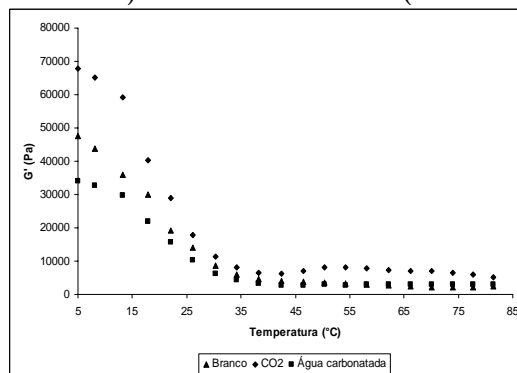
(varredura aos 14 dias)



(varredura aos 21 dias)



(varredura aos 28 dias)



(varredura aos 35 dias)

Figura 16 – Varredura de temperatura em função de  $G'$  dos queijos Minas Frescal ao longo do período de estocagem.

#### 4.1.12.1. Características mecânicas (TPA)

A avaliação do perfil de textura dos queijos é de grande importância, pois está diretamente relacionada com a aceitabilidade sensorial por parte dos consumidores.

A análise de variância indicou diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para os tratamentos em relação às variáveis: firmeza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade. Para as variáveis coesividade e elasticidade, essas diferenças não foram constatadas ( $p > 0,05$ ). Foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao tempo de armazenamento somente para a variável firmeza, que apresentou crescimento linear em função do tempo, segundo a equação:  $y = 14,6 + 0,19x$ . Houve variação de 7 a 35 dias. A interação entre tratamento e tempo de armazenamento, segundo a análise de variância, apresentou diferença não significativa ( $p > 0,05$ ) para todas as variáveis estudadas no perfil de textura.

O tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  apresentou firmeza superior ( $p \leq 0,05$ ) ao longo do tempo de armazenamento em relação aos tratamentos com adição de água carbonatada e o controle que, por sua vez, não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Observou-se maior firmeza para tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  ao longo do tempo ( $p \leq 0,05$ ), provavelmente, por causa da maior porosidade do queijo, que apresentou maior dessoramento e conseqüente diminuição da umidade, aumentando, assim os valores dessa variável (ECK, 1987; FOX et al., 2000 e PINTO et al., 2009). O pH é uma variável importante no processo de fabricação de queijos que afeta não somente a formação do coágulo, como também a sinérese da massa e, conseqüentemente, a umidade e a textura do queijo (FOX et al., 2000).

Buriti et al. (2007) também observaram incrementos nos valores de firmeza em queijos Minas Frescal adicionados de ácido láctico e cultura probiótica durante a estocagem por 21 dias a 5-7 °C. Por outro lado, os queijos Minas Frescal adicionados de fermento láctico homofermentativo apresentaram redução nos valores de firmeza após 7 dias de estocagem nas mesma temperatura.

Stampanoni e Noble (1991) também observaram aumento dos valores de firmeza e redução do teor de umidade dos queijos. Alguns autores citam que a penetração de sal na matriz proteica e o aumento do teor de proteína devido à concentração provocada pela perda de umidade estão correlacionados ao aumento da firmeza dos queijos.

Na Tabela 14 é mostrada a diferença de tratamentos apresentada na análise, sendo as médias gerais de todos os tempos, que representa o efeito principal de tratamento.

Tabela 14 – Valores médios de perfil de textura (TPA) para os tratamentos para o queijo Minas Frescal

Variáveis	Tratamentos					
	CO <sub>2</sub>		Água Carbonatada		Controle	
Firmeza	21,824	a	15,925	b	18,202	b
Fraturabilidade	14,706	a	10,643	b	11,678	b
Mastigabilidade	117,57	a	85,59	b	95,38	ab
Coesividade	0,6759	a	0,6820	a	0,6435	a
Gomosidade	11,755	a	8,552	b	9,536	ab
Elasticidade	8,1447	a	8,1052	a	8,1085	a

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à variável fraturabilidade, o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> superou ( $p \leq 0,05$ ) os tratamentos com adição de água carbonatada e o controle que, por sua vez, não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

Para a variável mastigabilidade, o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> no leite superou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o tratamento com adição de água carbonatada, porém não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) do controle. Esse, por sua vez, também não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) do tratamento com adição de água carbonatada.

Com relação à variável gomosidade, os tratamentos com injeção de CO<sub>2</sub> e o controle não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), assim como os tratamentos com adição de água carbonatada e controle também não diferiram entre si. No entanto, o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> apresentou gomosidade significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao tratamento com adição de água carbonatada.

Na Tabela 15, apresenta-se a média de cada tratamento dentro de cada tempo para o perfil de textura dos queijos Minas Frescal tratados pelos diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub>.

Tabela 15 – Perfil de textura ao longo do tempo de estocagem dos queijos Minas Frescal tratado com os diferentes métodos de incorporação de CO<sub>2</sub>

Idade do queijo (dias)	Tratamento	Firmeza* (N)	Fraturabilidade* (N)	Mastigabilidade* (N)	Coesividade* (Taxa)	Gomosidade* (N)	Elasticidade* (mm)
7	CO <sub>2</sub>	18,6493	12,9687	100,2893	0,7007	10,0270	8,1665
	Controle	16,7699	10,8587	85,5023	0,6608	8,5485	8,1381
	Água carbonatada	12,3534	9,1630	71,9040	0,7483	7,1883	8,2746
14	CO <sub>2</sub>	20,2562	14,1202	110,4434	0,6981	11,0421	8,1186
	Controle	17,1208	11,1307	89,6926	0,6535	8,9675	8,0489
	Água carbonatada	14,5967	10,0464	82,2418	0,7017	8,2126	8,1694
21	CO <sub>2</sub>	21,8630	15,2717	120,5974	0,6954	12,0573	8,0707
	Controle	17,4717	11,4027	93,8828	0,6462	9,3864	7,9598
	Água carbonatada	16,8400	10,9299	92,5796	0,6550	9,2370	8,0642
28	CO <sub>2</sub>	22,5018	14,7426	123,4696	0,6463	12,3445	8,1691
	Controle	19,2990	12,8009	108,1436	0,6611	10,8122	8,4291
	Água carbonatada	17,7946	11,5605	86,0523	0,6496	8,6035	7,9074
35	CO <sub>2</sub>	25,8514	16,4285	133,0719	0,6392	13,3045	8,1985
	Controle	20,3498	12,1965	99,6951	0,5957	9,9675	7,9667
	Água carbonatada	18,0404	11,5175	95,1860	0,6553	9,5166	8,1103

\* média de cada tratamento dentro de cada tempo; N = Valor em Newton.



## 4.2. Efeito do uso de CO<sub>2</sub> na fabricação de queijo Minas Padrão

### 4.2.1. Composição físico-química do leite

Os resultados das análises físico-químicas do leite utilizado nas fabricações dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Composição físico-química média do leite utilizado para a fabricação dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos					
	CO <sub>2</sub>		Água carbonatada		Controle	
	(média ± DP)		(média ± DP)		(média ± DP)	
Gordura (% m/v)	3,00 ± 0,00	a	3,00 ± 0,05	a	3,00 ± 0,05	a
EST (% m/v)	11,65 ± 0,31	a	11,44 ± 0,58	a	11,39 ± 0,57	a
Proteína (% m/v)	3,45 ± 0,16	a	3,49 ± 0,16	a	3,49 ± 0,16	a
Densidade (g/mL)	1,0312 ± 0,0012	a	1,0312 ± 0,0005	a	1,0308 ± 0,0008	a
Acidez* (% m/v)	0,22 ± 0,01	b	0,15 ± 0,01	a	0,15 ± 0,01	a
pH	6,33 ± 0,08	b	6,85 ± 0,05	a	6,80 ± 0,09	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

As amostras dos leites utilizados para a fabricação dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos apresentaram composições físico-químicas muito semelhantes para a maioria das variáveis. Tal fato foi esperado porque, assim como no experimento com o queijo Minas Frescal, para o queijo Minas padrão utilizou-se o leite do mesmo tanque de estocagem de leite cru. O leite do tratamento com adição de água carbonatada também foi analisado antes da incorporação da água. Sendo assim, sua composição não difere estatisticamente ( $p > 0,05$ ) da composição do leite utilizado no tratamento controle.

O leite do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> foi analisado após o processo de injeção de CO<sub>2</sub>, pelo fato de o gás ser adicionado no leite a 32 °C na linha de leite pasteurizado, logo após a sessão de resfriamento do pasteurizador. Segundo a análise de variância, a injeção do gás resultou em diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na acidez titulável e no pH do leite que obteve valor médio de 0,22 % (m/m) e pH

de 6,39 em relação ao leite utilizado para os demais tratamentos, que não diferiram entre si. O pH desejado do leite, na faixa de 6,3, foi atingido através da incorporação de aproximadamente 1,6 g/L de CO<sub>2</sub>.

A adição de CO<sub>2</sub> para obtenção de um pH no leite acima de 6,0 foi usada por CALVO et al. (1993) e Mc CARNEY et al., (1995) para inibir a multiplicação de microrganismos esporulados em leite cru antes da fabricação de queijos. Outros autores (MONTILLA et al., 1995; St-GELAIS et al., 1997) têm relatado que leites pré-acidificados com CO<sub>2</sub>, para pH de 6,0 e 6,56, respectivamente, coagularam de uma maneira similar aos controles, porém, com 75 % e 30 % menos coagulante, respectivamente. Para Fox e Mc Sweeney (1998), a importância da composição do leite está ligada à coagulação enzimática, firmeza da coalhada, sinérese e textura do queijo.

#### 4.2.2. Composição físico-química do queijo após a fabricação

A Tabela 17 apresenta a composição físico-química dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos.

Tabela 17 – Composição físico-química média dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos					
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)		Água carbonatada (média ± DP)		Controle (média ± DP)	
Umidade (% m/m)	48,24 ± 0,23	a	48,46 ± 1,59	a	48,23 ± 1,24	a
Gordura (% m/m)	26,56 ± 0,31	a	25,56 ± 1,39	a	25,94 ± 1,71	a
GES	51,31 ± 0,56	a	50,23 ± 1,63	a	50,07 ± 2,45	a
NaCl (% m/m)	1,51 ± 0,16	a	1,57 ± 0,42	a	1,70 ± 0,19	a
S/U (% m/m)	3,12 ± 0,32	a	3,18 ± 0,77	a	3,53 ± 0,38	a
RMF (% m/m)	3,83 ± 0,29	a	3,97 ± 0,26	a	4,21 ± 0,23	a
Proteína (% m/m)	23,13 ± 0,51	a	23,13 ± 0,32	a	23,62 ± 0,53	a
pH	5,07 ± 0,03	a	5,16 ± 0,06	a	5,13 ± 0,05	a
Cálcio inorgânico total (% m/m)	0,54 ± 0,03	a	0,52 ± 0,04	a	0,57 ± 0,05	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão; GES = Gordura no Extrato Seco, S/U = Sal na Umidade; RMF = Resíduo Mineral Fixo.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis estudadas na composição do queijo Minas Padrão (pH, umidade, gordura, extrato seco total, sal, sal na umidade, RMF, proteína e teor de cálcio total). A ausência de diferença significativa com relação ao pH dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos foi esperada devido ao efeito da acidificação da cultura láctica adicionada que produziu ácido láctico durante o período de fermentação da massa, o que igualou o pH final dos queijos. Outro fator importante é que essa similaridade na composição dos queijos indica que o processo de fabricação e o método empírico de detecção do ponto pela consistência da coalhada apresentaram boa precisão e reprodutibilidade nas diferentes fabricações.

#### 4.2.3. Composição físico-química do soro

Os resultados das análises físico-químicas do soro obtido das fabricações dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Composição físico-química média do soro obtido das fabricações dos queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos					
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)		Água Carbonatada (média ± DP)		Controle (média ± DP)	
pH	6,37 ± 0,05	b	6,51 ± 0,06	a	6,71 ± 0,12	a
Acidez* (% m/v)	0,16 ± 0,015	b	0,11 ± 0,01	a	0,10 ± 0,013	a
EST (% m/v)	5,94 ± 0,20	a	5,82 ± 0,28	a	6,03 ± 0,24	a
Gordura (% m/v)	0,16 ± 0,05	a	0,20 ± 0,00	a	0,24 ± 0,05	a
Densidade (g/mL)	1,0270 ± 0,0009	a	1,0259 ± 0,0008	a	1,0264 ± 0,0003	a
Proteína (% m/v)	0,75 ± 0,05	b	0,86 ± 0,05	a	0,88 ± 0,07	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

Pode-se observar pelos resultados obtidos que o soro do queijo Minas Padrão fabricado com injeção de CO<sub>2</sub> no leite apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) de pH, acidez titulável e teor de proteína em relação aos tratamentos

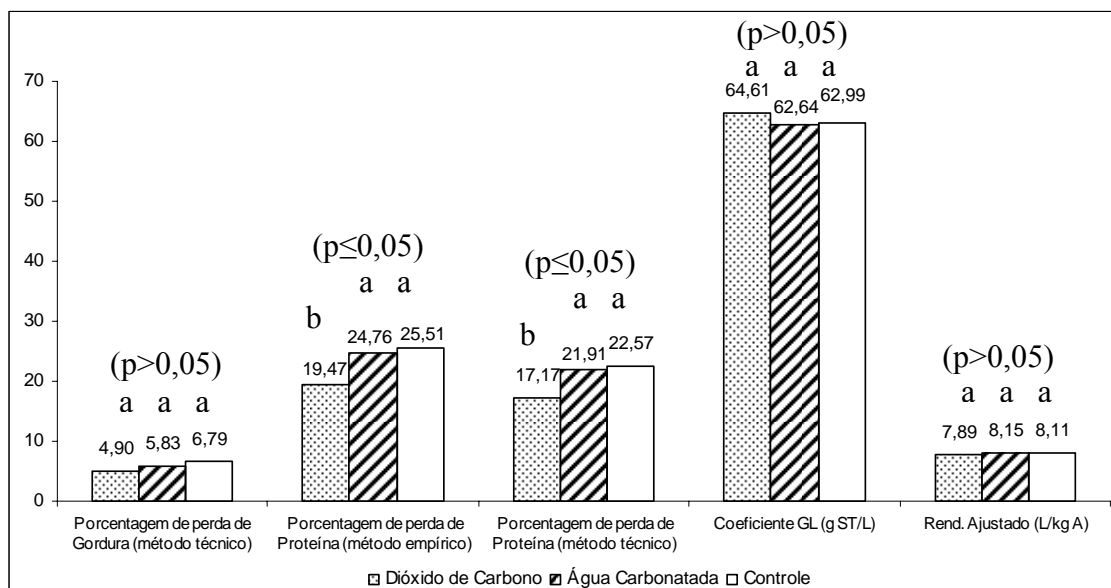
com adição de água carbonatada e controle, que não diferiram entre si ( $p>0,05$ ). Para as demais variáveis avaliadas, tal diferença não foi constatada. A diferença no pH e na acidez titulável foi certamente por causa da presença de  $\text{CO}_2$  no soro, que diminuiu o seu pH e aumentou a acidez. O menor teor de proteína encontrado no soro do queijo do tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  indica maior recuperação desse componente no queijo, o que foi também registrado pelos índices de porcentagem de perda de proteína pelos métodos empírico e técnico na avaliação de rendimento.

Dias e Gigante (2009), ao avaliarem o efeito da pré-acidificação do leite com  $\text{CO}_2$  no rendimento e nas características físico-químicas do queijo Minas Frescal, encontraram diferenças significativas para pH, acidez titulável e teor de gordura do soro do tratamento com  $\text{CO}_2$  em relação ao soro do tratamento controle. Nelson et al. (2004), avaliando o impacto da pré-acidificação do leite com  $\text{CO}_2$  na composição e rendimento de queijo Cheddar, também encontraram menor valor de pH do soro durante a etapa de drenagem no tratamento com  $\text{CO}_2$  em comparação ao tratamento controle. Os valores obtidos para a composição físico-química do soro do queijo Minas Padrão são muito semelhantes, exceto no teor de gordura, aos valores encontrados por Teixeira e Fonseca (2008) ao avaliarem o perfil físico-químico de soro de queijos Minas Padrão produzido em diversas regiões do estado de Minas Gerais. Esses autores relataram valores médios de pH de 6,3, acidez de 0,13 % (m/v), EST de 6,28 % (m/v), gordura de 0,68 % (m/v), proteína de 0,80 % (m/v) e densidade de 1,0249 (g/mL).

#### **4.2.4. Análise de rendimento**

Na Figura 17, são mostrados os diferentes métodos de avaliação de rendimento utilizados no experimento para o queijo Minas Padrão.

A análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) em relação às variáveis “Porcentagem de perda de gordura pelo método técnico”, “Coeficiente GL” e “Rendimento Ajustado” para os queijos dos diferentes tratamentos.



Letras iguais indicam médias semelhantes a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Figura 17 – Métodos de avaliação de rendimento utilizados no experimento para o queijo Minas Padrão.

No entanto, a análise de variância registrou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis “Porcentagem de perda de proteína pelo método empírico” e “Porcentagem de perda de proteína pelo método técnico”. Para ambas as variáveis avaliadas, o queijo tratado com injeção de  $\text{CO}_2$  no leite apresentou menor porcentagem de perda de proteína em relação aos demais tratamentos, mas isso não influenciou nas variáveis “Coeficiente GL” e “Rendimento Ajustado”.

O tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  apresentou porcentagem de perda de proteína mais baixa ( $p \leq 0,05$ ). Esse fato pode ser atribuído a uma melhor formação da coalhada que permitiu maior aprisionamento desse constituinte na rede proteica. Porém, com relação às variáveis “Coeficiente GL” (g ST/L) e “Rendimento Ajustado”, (L/kg A) o tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) dos demais tratamentos. Tal fato pode ser explicado pelo menor pH da coalhada no tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$ , o que poderia resultar em menor grau de ligações entre cadeias de caseína favorecendo a formação de uma estrutura mais porosa e aberta (FOX et al., 2000), como constatado nas micrografias da microscopia eletrônica de varredura. No caso de

maior porosidade da massa, resultaria em maior expulsão de soro da coalhada no tanque e nas etapas posteriores, e com isso uma produção final em kg de queijo que não seria estatisticamente maior. Nas variáveis “Coeficiente GL” e “Rendimento Ajustado”, a produção final em kg de queijos é considerada para o cálculo.

No caso do experimento com o queijo Minas Padrão, o ponto final de fabricação no tanque foi medido de maneira empírica por meio da sensibilidade tátil manual da consistência da coalhada, diferentemente do experimento com o queijo Minas Frescal que foi medido em função do tempo (20 min de mexedura). Esse fator contribuiu muito para o melhor aproveitamento de sólidos na coalhada por litro de leite trabalhado, principalmente com relação ao aproveitamento de proteína. Tal fato refletiu também no “Coeficiente GL” (g ST/L) e menor porcentagem de perda de gordura no soro para o tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>, apesar de não apresentar diferença significativa.

#### 4.2.5. Efeito do uso de CO<sub>2</sub> nos tempos de fabricação

Na Tabela 19 são apresentadas as médias dos tempos de fabricação para o queijo Minas Padrão em função dos diferentes tratamentos.

Tabela 19 – Tempos de fabricação para os diferentes tratamentos para o queijo Minas Padrão. Médias das três repetições

Variáveis	Tempo gasto (min)			Redução do tempo (min) Tratamento vs. Controle		Redução do tempo (%) Trat. vs. Controle	
	CO <sub>2</sub> (média ± DP)	Água Carbonatada (média ± DP)	Controle (média ± DP)	CO <sub>2</sub>	Água Carbonatada	CO <sub>2</sub>	Água Carbonatada
Coagulação	19 ± 2 b	33 ± 6 a	34 ± 6 a	15	1	45	5
Mexedura	32 ± 3 b	40 ± 4 a	43 ± 5 a	10	3	25	7
Adição do coagulante até o ponto	51 ± 6 b	73 ± 9 a	77 ± 10 a	26	4	34	6
Tempo total de fabricação	71 ± 6 b	93 ± 6 a	97 ± 10 a	26	4	27	5

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. DP = Desvio Padrão.

O tempo entre a adição de coagulante e o corte da coalhada foi 45 % menor para o tratamento com CO<sub>2</sub> e 5 % menor para o tratamento com adição de água carbonatada em comparação ao tratamento controle, conforme apresentado na Tabela 19. O efeito do CO<sub>2</sub> foi visualmente aparente na redução do tempo de coagulação para o queijo Minas Padrão. A pré-acidificação do leite com injeção de CO<sub>2</sub> produziu um coágulo mais firme que pode ser detectado pelo toque e pela resistência da coalhada ao ser cortada com as liras. Tal fato pode ser explicado pelo menor pH do leite antes da coagulação, que se aproximou do pH ótimo de ação da enzima coagulante (pH 6,0), resultando em maior firmeza da coalhada e reduzindo o tempo de coagulação (FOX et al., 2000).

Outro fator importante a ser considerado é a quantidade de cálcio solúvel que pode ser maior no leite tratado com CO<sub>2</sub>, sendo que, quanto maior a quantidade de cálcio solúvel presente no meio, mais rápida será a formação do coágulo e maior a sua firmeza (NELSON et al., 2004). O menor pH do leite favorece o aumento da velocidade de agregação das micelas, aumentando a firmeza do gel durante a coagulação. Esse aumento na agregação micelar decorre da diminuição da estabilidade das micelas por neutralização das cargas negativas e pela migração de fosfato de cálcio intracelular para a fase aquosa, aumentando a disponibilidade de íons cálcio em solução (FOX et al., 2000).

A adição de água carbonatada no leite para a fabricação do queijo Minas Padrão teve pouco efeito na redução do tempo de coagulação (5 %) em comparação ao tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (45 %). Para esse tipo de queijo, a adição de água carbonatada apresentou menor efeito na redução do tempo de coagulação em comparação à utilização desse tratamento para o queijo Minas Frescal que apresentou 16 % de redução no tempo de coagulação. Outro fator importante a ser considerado é a perda do CO<sub>2</sub> durante a etapa de pré-maturação e do leite com fermento e aquecimento da massa durante a mexedura para o queijo Minas Padrão além da ausência de adição de ácido láctico, fatores que diminuíram o efeito do CO<sub>2</sub> nos tempos de fabricação.

O efeito do tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> foi também aparente na redução do tempo de mexedura (25 %) em comparação ao tratamento controle.

Tal fato pode ter surgido do menor pH do leite antes da coagulação, que favoreceu a formação de um coágulo mais poroso e com maior capacidade de expulsão de soro. Esse apresentou maior dessoramento e a obtenção do ponto foi possível em menor tempo. Para o experimento com o queijo Minas Padrão, foi utilizada a determinação empírica, por meio de toque da coalhada, para visualização da consistência da mesma, o que não foi possível para o queijo Minas Frescal, para o qual foi fixado o tempo de 20 min de mexedura. Tal procedimento pode ter ajudado a contrabalancear o maior dessoramento provocado por uma estrutura mais porosa, dado o menor pH do leite no tratamento com injeção de CO<sub>2</sub>. O tratamento com adição de água carbonatada apresentou leve redução no tempo de mexedura (7 %) em relação ao tratamento controle.

O tempo total entre a adição do coagulante até o ponto foi 34 % menor com o leite pré-acidificado com injeção de CO<sub>2</sub> em comparação ao controle. Isso foi possível principalmente pela diminuição do tempo de coagulação e do tempo de mexedura necessário para obtenção do ponto que, para o queijo Minas Padrão, foi detectado empiricamente pela ligeira consistência dos grãos ao serem tocados com a mão. O tratamento com adição de água carbonatada apresentou redução no tempo de 6 % em relação ao tratamento controle para essa variável.

O tempo total de fabricação também foi consideravelmente menor com o leite pré-acidificado com injeção de CO<sub>2</sub> (26 min, 27 %) e ligeiramente menor para o tratamento com adição de água carbonatada (4 min, 5 %) em relação ao tratamento controle. Menor tempo total de fabricação foi observado por St-Gelais et al. (1997) para queijo Cheddar, fabricado com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> (pH 6,56). Entretanto, eles relataram um tempo similar do corte até a drenagem do soro em relação ao tratamento controle e 30 min menos no tempo de cheddarização. Nelson et al. (2004) encontraram menor tempo total de fabricação (15 min) e menor tempo entre a adição de coagulante e a drenagem do soro (10 min) para queijo Cheddar pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH de 5,93. A redução do tempo de coagulação também foi observada por Calvo et al. (1993) que registraram redução no tempo de coagulação enzimática de 80 % em queijos



espanhóis fabricados com leite pasteurizado, o pH do leite foi abaixado de 6,65 para 6,0 com adição CO<sub>2</sub>. Ruas-Madiedo et al. (2002) obtiveram redução de 60 % no tempo de coagulação na fabricação de um queijo espanhol de massa dura, após a redução de 0,5 unidades de pH através da adição de CO<sub>2</sub> no leite.

Dias e Gigante (2009) observaram redução de 80 % do tempo de coagulação com o abaixamento do pH em 0,6 unidades (de 6,8 para 6,2) no leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO<sub>2</sub>. Silveria et al. (2009) observaram que o abaixamento do pH foi acompanhado da redução da dose de coagulante necessária para coagulação do leite no mesmo tempo. Em pH 6,20, foi registrada a redução de aproximadamente 74 % de coagulante em relação ao leite controle. A necessidade de menor concentração de enzimas com o abaixamento de pH é consequência do aumento da atividade da quimosina, que está associado ao aumento da velocidade de quebra das ligações 105-106 da kappa-caseína (DALGLEISH, 1993).

Para Nelson et al. (2004), qualquer tratamento que possa reduzir o tempo de fabricação sem efeitos prejudiciais nas propriedades sensoriais e funcionais dos queijos pode ser atrativo para as indústrias de laticínio visando melhorar sua qualidade e competitividade.

#### **4.2.6. Perfil de pH durante a fermentação do queijo**

A evolução do pH ao longo do tempo para os três tratamentos no período de fermentação, após a pré-prensagem e durante a prensagem do queijo Minas Padrão, é mostrada na Figura 18.

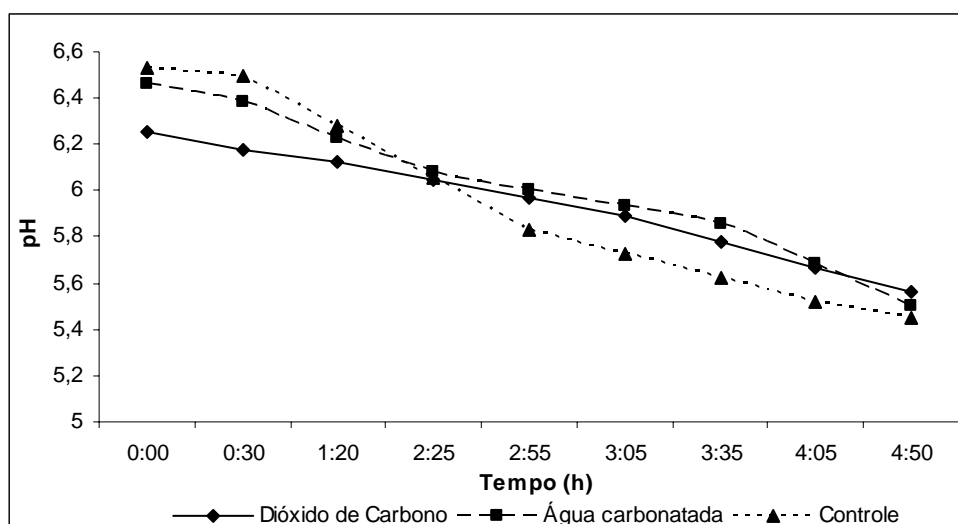


Figura 18 – Evolução do pH durante a fermentação do queijo Minas Padrão.

A função primária da cultura “starter” é a produção de ácido láctico a partir de lactose que é crucial para a fabricação da maioria dos queijos. O pH da massa decresce para próximo de 5,0 em um período de tempo entre cinco e vinte horas, dependendo da variedade do queijo a ser fabricado (FOX e Mc SWEENEY, 1998; WALSTRA et. al., 1999).

A produção de ácido é uma característica muito importante na fabricação do queijo Minas Padrão. Grande parte da lactose do leite é perdida no soro como lactose ou lactato de cálcio (aproximadamente 96 %) durante a drenagem do mesmo. Entretanto, a coalhada possui ainda uma quantidade de lactose residual, e a sua fermentação com a produção de ácido láctico e a desmineralização da coalhada influenciam diretamente na textura inicial do queijo. Durante a fermentação do queijo Minas Padrão, o pH normalmente deve baixar para 5,5, antes da etapa de salga em salmoura, para que a maturação ocorra normalmente e o queijo adquira as suas características sensoriais desejáveis, evitando a formação de uma massa com textura borrachenta, o que aconteceria no caso de um pH mais elevado. Quanto menor o tempo de fermentação, mais rapidamente a lactose residual será degradada e transformada em ácido láctico pelas bactérias do fermento adicionado, o que provocará um efeito inibidor sobre bactérias do grupo coliforme e com isso menores serão os riscos de estufamento precoce

(FURTADO, 2005). Qualquer modificação no processo ou na tecnologia de fabricação que possa prejudicar a atuação do fermento láctico, modificando o seu grau de acidificação seria prejudicial e, conseqüentemente, afetará a qualidade do queijo.

O pH da massa logo após a pré-prensagem foi menor ( $p \leq 0,05$ ) para o tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  que apresentou pH de 6,25, seguido pelo tratamento com adição de água carbonatada que apresentou pH de 6,46 e pelo tratamento controle com pH de 6,53. As curvas de fermentação dos queijos controle e dos queijos com adição de água carbonatada apresentaram um pH inicial mais elevado em razão da menor quantidade de  $\text{CO}_2$  dissolvido no meio. Durante a etapa de prensagem até 2h e 25 min o pH do tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  foi menor em relação aos demais tratamentos, quando então o tratamento controle passou a apresentar menor pH. Tal fato pode ser atribuído à produção de ácido láctico pela cultura láctica adicionada. A queda das curvas de pH ocorreu como esperado, apesar de apresentarem inclinações diferentes. Tal comportamento indica que os tratamentos não alteraram o perfil fermentativo da cultura láctica, que demonstrou produção de ácido normal no queijo Minas Padrão. As diferenças na inclinação das curvas podem ser atribuídas às diferenças encontradas na composição do queijo dos diferentes tratamentos que influenciam diretamente na capacidade tamponante da massa.

#### **4.2.7. Evolução do pH durante o tempo de armazenamento**

Na Figura 19 apresenta-se a evolução das médias de pH ao longo do armazenamento em função dos diferentes tratamentos utilizados para o queijo Minas Padrão.

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao pH do queijo Minas Padrão para os tratamentos, para os tempos de armazenamento que variam de 1 a 120 dias e para a interação entre tratamento e tempo de armazenamento.

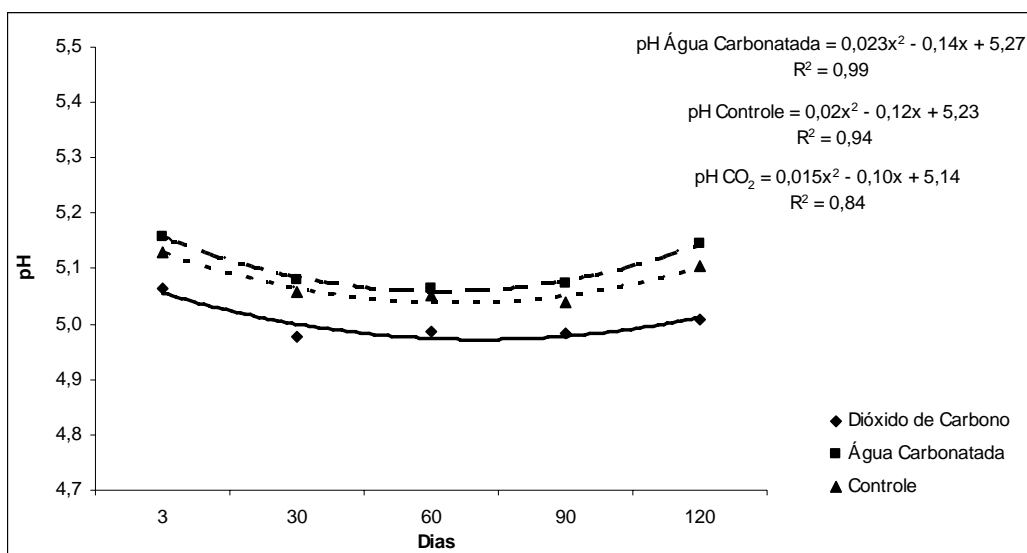


Figura 19 – Evolu\u00e7\u00e3o do pH ao longo do armazenamento do queijo Minas Padr\u00e3o em fun\u00e7\u00e3o dos diferentes tratamentos.

Esses valores m\u00e9dios de pH encontrados neste experimento foram ligeiramente superiores aos observados por Londo\u00f1o (1998) que obteve valores m\u00e9dios de pH variando de 4,91, nos tempos 3 a 5 dias, a 4,85, nos tempos 28 a 32 dias ao avaliar a composi\u00e7\u00e3o fisico-qu\u00edmica de sete marcas de queijos Minas Padr\u00e3o.

O pH dos queijos normalmente apresenta comportamento inverso ao teor de lactose na massa que, dependendo da variedade, \u00e9 consumida em, aproximadamente, duas semanas. Em queijos com alto teor de lactose, o pH continua decrescendo durante a maturaç\u00e3o. No entanto, aumento no pH \u00e9 comum em muitas variedades de queijos. Esse aumento pode ser atribu\u00eddo ao processo de degrada\u00e7\u00e3o do \u00e1cido l\u00e1tico presente na massa do queijo juntamente com a prote\u00f3lise e libera\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia a partir da degrada\u00e7\u00e3o de amino\u00e1cidos (FOX et al., 2000).

#### 4.2.8. Evolu\u00e7\u00e3o do teor de umidade durante o tempo de armazenamento

A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia n\u00e3o indicou diferen\u00e7a significativa ( $p > 0,05$ ) para os diferentes tratamentos, para o tempo de armazenamento e para a intera\u00e7\u00e3o entre

tratamento e tempo de armazenamento. Desse modo, os queijos dos diferentes tratamentos se comportaram de maneira similar, não modificando o seu teor de umidade ao longo do tempo de estocagem que variou de 1 a 120 dias.

Tal comportamento ocorreu como esperado, visto que os queijos Minas Padrão foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis a vácuo. A maioria das fábricas de queijos no Brasil utiliza embalagens em sistema de vácuo, por possuírem pouca permeabilidade ao vapor de água, ao oxigênio, e ao CO<sub>2</sub>. Esse tipo de embalagem protege o queijo contra contaminações, cria um ambiente anaeróbio e facilita o transporte e o empilhamento do produto durante a estocagem. A maturação dos queijos dentro da embalagem a vácuo é um fator importante na sua proteção e controle da qualidade (Mc SWEENEY, 2007). Com o uso dessa tecnologia, não é necessário o controle da umidade relativa do ar na câmara de maturação, pois a embalagem é impermeável e evita a perda umidade durante essa etapa.

#### **4.2.9. Extensão e profundidade da proteólise durante o tempo**

Na Figura 20, apresenta-se o comportamento da extensão da proteólise ao longo do armazenamento para o queijo Minas Padrão.

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à extensão da proteólise para os tratamentos no queijo Minas Padrão, assim como para a interação entre tratamento e tempo. Porém, para os tempos de armazenamento que variaram de três a cento e vinte dias, tal diferença foi registrada ( $p \leq 0,05$ ). Houve efeito significativo de tempo de armazenamento e a profundidade da proteólise apresentou uma tendência quadrática de crescimento ao longo do tempo através do modelo apresentado na Figura 20.

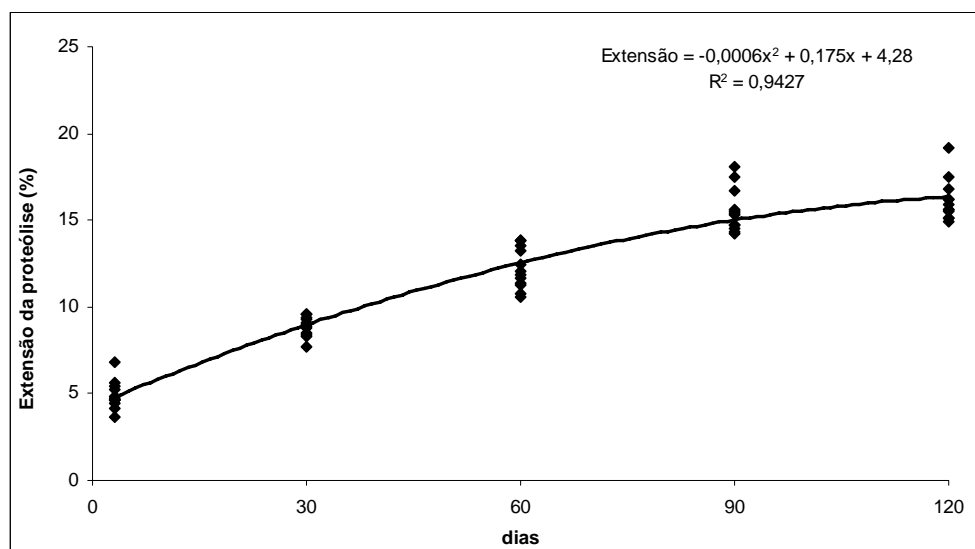


Figura 20 – Comportamento da extensão da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Minas Padrão.

Considerando-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas e que os modelos ajustaram-se adequadamente, eles foram agrupados em uma só curva, tanto para a extensão como para a profundidade da proteólise, possibilitando uma melhor visualização do efeito do tempo de armazenagem do queijo Minas Padrão sob as variáveis estudadas. Na Tabela 20, são mostrados os valores médios de extensão, ao longo do tempo de maturação para os tratamentos para o queijo Minas Padrão.

Tabela 20 – Valores médios de extensão ao longo do tempo para os queijos Minas Padrão dos três tratamentos.

Dias de estocagem	Extensão (%)
3	4,91 a
30	8,88 b
60	12,19 c
90	15,56 d
120	16,15 d

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na avaliação geral, os resultados médios para extensão da proteólise dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos apresentaram aumento desses índices ao longo do tempo de armazenamento. Houve efeito quadrático de tempo, conforme modelo e gráfico (Figura 20), ao longo do armazenamento com médias que variaram de 4,91 % a 16,15 % para os tempos de três a cento e vinte dias. Nos tempos a partir de noventa dias os valores de extensão foram bastantes superiores do que os encontrados no início da maturação. Tal comportamento foi esperado devido ao aumento da degradação da matriz proteica provocado possivelmente pela ação de coagulante residual, da atividade da plasmina e das enzimas proteolíticas da cultura lática e das bactérias não “starter” (NSLAB).

Os valores médios encontrados para extensão da proteólise neste experimento foram muito próximos aos observados por Londoño (1998) que obteve valores médios de índices de extensão variando de 7,92 %, nos tempos 3 a 5 dias, a 15,28 %, nos tempos 28 a 32 dias ao avaliar o padrão físico-químico de sete marcas de queijo Minas Padrão.

Na Figura 21, está apresentado o comportamento da profundidade da proteólise ao longo do armazenamento para o queijo Minas Padrão.

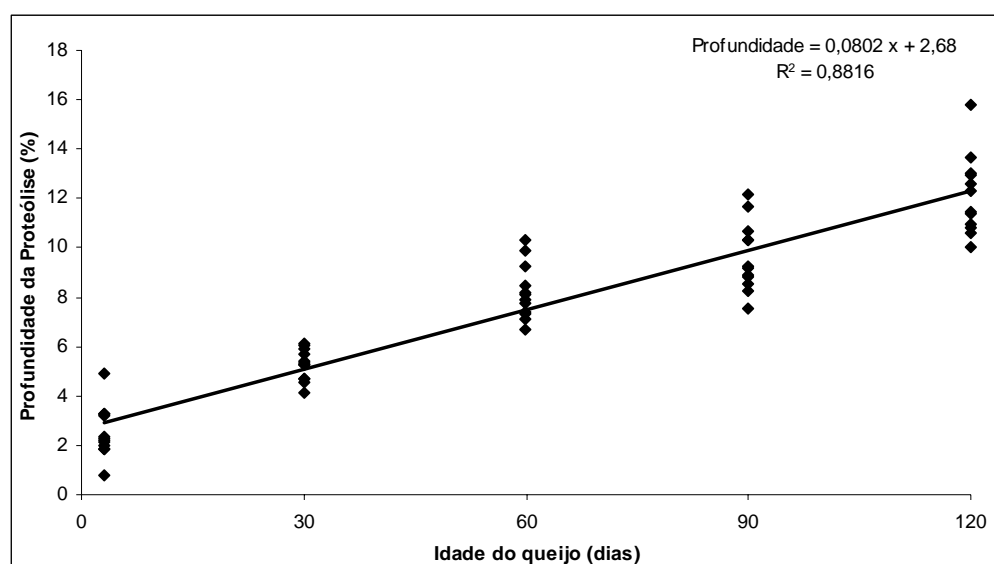


Figura 21 – Profundidade da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Minas Padrão dos diferentes tratamentos.

Em relação à profundidade da proteólise, a análise de variância também não indicou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para os diferentes tratamentos com o queijo Minas Padrão e para a interação entre tratamento e tempo. Porém, para os tempos de armazenamento (três a cento e vinte dias), tal diferença foi constatada ( $p \leq 0,05$ ). Houve efeito significativo de tempo de armazenagem, da seguinte forma: a profundidade da proteólise apresentou uma tendência linear de crescimento ao longo do tempo através do modelo apresentado na Figura 21.

Na Tabela 21 são mostrados os valores médios de profundidade ao longo do tempo de estocagem refrigerada para os tratamentos para o queijo Minas Padrão.

Tabela 21 – Valores médios de profundidade ao longo do tempo para os queijos Minas Padrão dos três tratamentos

Dias de estocagem	Profundidade (%)	
3	2,49	a
30	5,26	b
60	8,19	c
90	9,63	d
120	12,12	f

Letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A profundidade da proteólise apresentou tendência linear de crescimento com valores que variaram de 2,49 % a 12, 12% no período de três a cento e vinte dias. Os valores médios encontrados para profundidade da proteólise neste experimento foram muito próximos aos observados por Londoño (1998) que obteve valores médios de índices de profundidade variando de 5,92 %, nos tempos 3 a 5 dias, a 10,59 %, nos tempos 28 a 32 dias ao avaliar o padrão físico-químico de sete marcas de queijo Minas Padrão.

Esses índices apresentaram aumento ( $p \leq 0,05$ ) para os tempos de armazenamento (3 a 120 dias). Tal comportamento foi esperado, pois o queijo contém enzimas provenientes do coagulante, do leite, das bactérias lácticas adicionadas, das bactérias não starter (NSLABs) e de outros possíveis



microrganismos contaminantes presentes no meio. A degradação mais acentuada da matriz proteica do queijo com liberação de frações nitrogenadas de baixa massa molecular é provocada pela ação de enzimas como aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, principalmente após a lise das células.

Vários estudos têm demonstrado que as enzimas do coalho ou coagulante são as principais responsáveis pela proteólise inicial e pela produção de nitrogênio solúvel em pH 4,6. Entretanto, a produção de peptídeos pequenos e aminoácidos livres é proveniente, principalmente, da ação de enzimas originadas da cultura “starter” (FOX et al., 2000). O aumento dos índices de extensão e profundidade da proteólise durante a maturação do queijo Minas Padrão é muito importante, pois permite a modificação da textura e o desenvolvimento das características ideais de sabor e aroma.

Ao comparar os índices de maturação do queijo Minas Frescal com os do queijo Minas Padrão, observa-se que o Minas Frescal apresentou maior índice de extensão da proteólise com 30 dias de armazenamento em relação ao queijo Minas Padrão. Porém, para a profundidade da proteólise do queijo Minas Frescal apresentou menor valor com 30 dias de armazenamento em relação ao queijo Minas Padrão. Esse comportamento pode ser justificado, considerando-se o teor de umidade, que é maior para o queijo Minas Frescal. O coagulante é um dos maiores responsáveis pela proteólise na maioria dos queijos e está disperso na sua fase aquosa, de modo que, quanto mais umidade no queijo, maior será a atividade do coagulante na matriz proteica. Além disso, maior teor de umidade normalmente acelera a atuação de proteases como plasmina e, conseqüentemente, aumenta a extensão da proteólise do queijo. Já a profundidade é favorecida em queijos com adição de fermento láctico, como o Minas Padrão, e é resultado de uma degradação mais acentuada da matriz proteica do queijo provocada principalmente pela ação de enzimas desses microrganismos após a lise celular. Como no queijo Minas Frescal não foi adicionado fermento láctico era esperado que a profundidade da proteólise fosse menor em relação ao queijo Minas Padrão.

## **4.2.10. Análises microbiológicas**

### **4.2.10.1 Análises microbiológicas do leite**

Como o experimento com o queijo Minas Padrão foi realizado no mesmo dia do experimento para o queijo Minas Frescal, foi utilizado o mesmo leite para ambos os experimentos, sendo realizadas as mesmas contagens para o leite. Sendo a Contagem Padrão média para o leite utilizado nos diferentes tratamentos igual a 2,54 log UFC/mL. As amostras de leite pasteurizado não apresentaram contagens de coliformes a 30 °C ou a 45 °C e de fungos filamentosos e leveduras. Encontra-se, portanto, dentro do limite permitido pela Instrução Normativa n° 51 de 2002 para leite pasteurizado (BRASIL, 2002).

### **4.2.10.2 Análises microbiológicas dos queijos**

As amostras de queijos Minas Padrão dos diferentes tratamentos apresentaram ausência contagens de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra. As contagens de *Staphylococcus aureus* foram < 10 UFC/mL para todos os tratamentos. As amostras encontravam-se, portanto dentro do limite de tolerância para amostra indicativa conforme RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001).

### **4.2.10.3 Contagem de coliformes totais**

A Figura 21 apresenta as contagens de coliformes totais ao longo do tempo para os três tratamentos no queijo Minas Padrão.

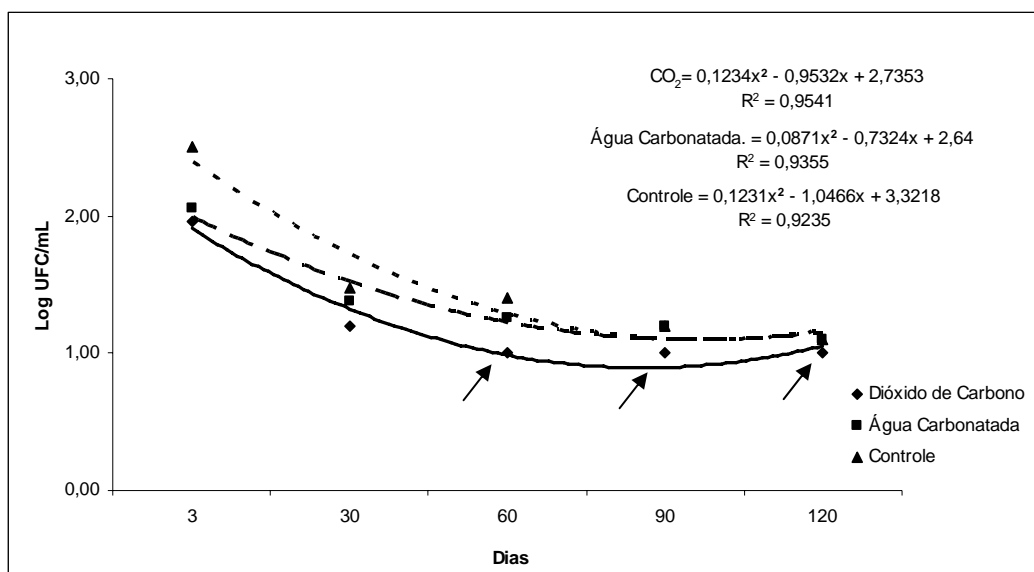


Figura 21 – Contagens de coliformes totais em função do tratamento e do tempo para o queijo Minas Padrão. As setas indicam contagens não detectáveis pela técnica utilizada.

A análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em relação às contagens de coliformes totais para os tratamentos e para a interação entre tratamento e tempo ( $p > 0,05$ ) para queijo Minas Padrão. Porém, para os tempos de armazenamento que variaram de 3 a 120 dias, tal diferença foi detectada ( $p \leq 0,05$ ).

Embora as condições adversas ao microrganismo estivessem aumentando ao longo do tempo, um leve efeito antimicrobiano poderia ser atribuído ao  $CO_2$  e não aos demais fatores, pelo fato de a composição físico-química do queijo e as condições de maturação terem sido similares nos três tratamentos. Segundo Daniels et al. (1985), uma das principais explicações para a adição de dióxido de carbono em alimentos é o fato de que ele desloca parte ou a totalidade do oxigênio viável necessário ao metabolismo bacteriano, diminuindo a multiplicação. O efeito combinado do  $CO_2$  e outras técnicas de conservação de alimentos como refrigeração, pasteurização ou embalagens impermeáveis tem sido demonstrado na literatura (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

#### 4.2.10.4 Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Na Figura 22, encontram-se os resultados das contagens de fungos filamentosos e leveduras em função dos tratamentos e do tempo para o queijo Minas Padrão.

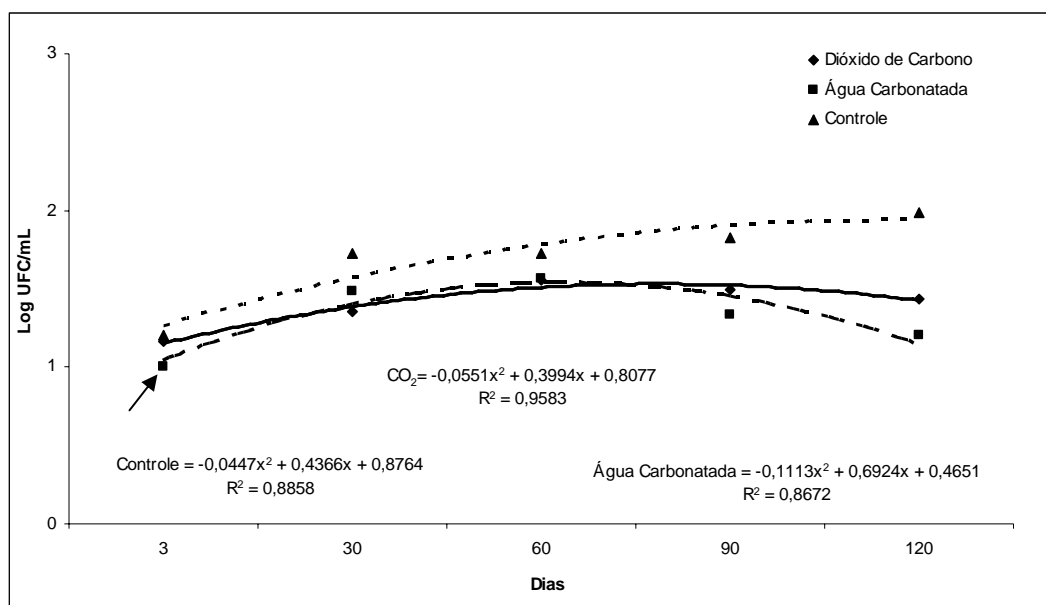


Figura 22 – Contagem de fungos filamentosos e leveduras em função do tratamento e do tempo para o queijo Minas Padrão. A seta indica contagem não detectável pela técnica utilizada.

A análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras para os queijos obtidos dos diferentes tratamentos, para os tempos de armazenamento, que variaram de 1 a 40 dias e para a interação tratamento e tempo ( $p > 0,05$ ).

Apesar de o queijo ter sido maturado dentro da embalagem a vácuo, o que criaria um ambiente anaeróbio desfavorável aos fungos filamentosos, algumas leveduras são anaeróbias ou suportam baixa concentração de oxigênio. Para esse grupo microbiano, assim como ocorreu nas contagens de coliformes, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, as contagens foram ligeiramente menores ao longo do tempo de

maturação para os queijos dos tratamentos com injeção de CO<sub>2</sub> e adição de água carbonatada em relação ao tratamento controle.

#### **4.2.11. Análise sensorial em função do tempo**

##### **4.2.11.1 Aceitação sensorial**

A análise de variância não indicou diferença significativa ( $p>0,05$ ) para os tratamentos, para os tempos de armazenamento ( $p>0,05$ ) e para a interação tratamento e tempo ( $p>0,05$ ) em relação à aceitação sensorial do queijo Minas Padrão.

Na avaliação geral os queijos dos diversos tratamentos obtiveram boa aceitabilidade sensorial com média de 7 pontos na escala hedônica de nove pontos, sendo classificado com o termo hedônico “gostei moderadamente”. Todos os tratamentos apresentaram um ligeiro aumento na aceitação sensorial ao longo do tempo de maturação que pode ser explicado pela modificação da textura e pelo desenvolvimento de sabor e aroma durante o período, porém esse aumento não foi significativo ( $p>0,05$ ). Esses resultados comprovam que os consumidores não demonstram aceitação diferenciada para o queijo Minas Padrão com tempo de maturação prolongado, o que está relacionado ao hábito de consumo do queijo novo.

Na Tabela 22, apresenta-se a pontuação média da aceitação sensorial do queijo Minas Padrão dos três tratamentos no intervalo de tempo de 3 a 120 dias de armazenamento.

Tabela 22 – Pontuação média da aceitação sensorial do queijo Minas Padrão dos três tratamentos ao longo do tempo avaliado

Dias	Tratamentos		
	CO <sub>2</sub>	Água Carbonatada	Controle
3	6,7 a	7,0 a	6,8 a
30	7,0 a	7,0 a	7,0 a
60	7,2 a	6,7 a	7,1 a
90	7,2 a	6,9 a	7,4 a
120	6,9 a	7,0 a	7,6 a

Nas linhas, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo teste Tukey.

#### 4.2.11.2 Análise de preferência

Com relação ao teste de ordenação para o queijo Minas Padrão, são mostrados na Tabela 23 os resultados das somas das ordens de cada tratamento para cada tempo estudado. Os pares de soma de ordens seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada tempo, nas linhas, não diferem entre si quanto à preferência, pelo teste de Friedman a 5 % de probabilidade (MINIM, 2006).

Pelos resultados apresentados, observa-se que não houve preferência significativa entre os tratamentos ao longo dos tempos avaliados (3, 30, 60, 90 e 120 dias), bem como para a interação tratamento e tempo.

Tabela 23 – Soma de ordens de preferência dos três tratamentos em cada tempo para o teste de ordenação

Dias	Tratamentos		
	Injeção de CO <sub>2</sub>	Controle	Água Carbonatada
3	64 a	66 a	50 a
30	57 a	63 a	60 a
60	61 a	53 a	66 a
90	59 a	55 a	66 a
120	62 a	54 a	64 a

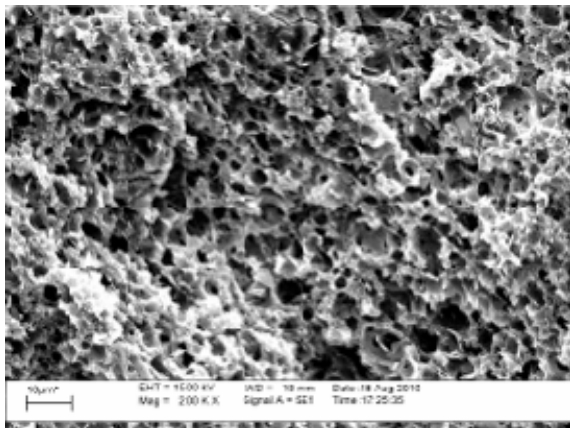
Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

#### 4.2.12. Análise microestrutural

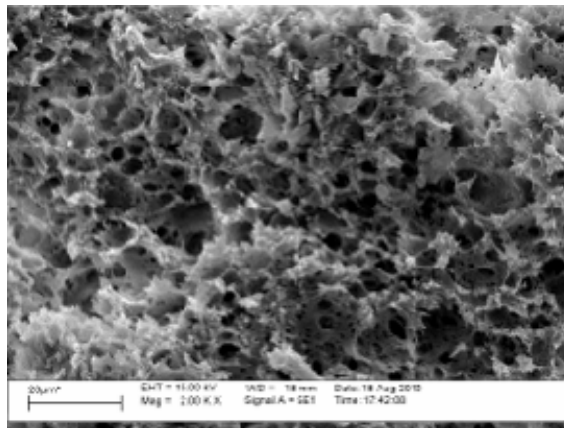
Para o queijo Minas Padrão aos 7 e 29 dias de armazenamento, na Figura 23 são apresentadas as micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos dos diferentes tratamentos. De forma semelhante ao queijo Minas Frescal, diferenças na microestrutura, aos 7 dias, foram observadas, onde a matriz proteica do queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub> (A-7) apresentou visualmente uma estrutura mais compacta, com maior número de poros de tamanho reduzido em comparação com a matriz proteica dos queijos dos demais tratamentos (B-7) e (A-7). O tratamento com adição de água carbonatada (C-7) apresentou visualmente uma microestrutura muito semelhante em comparação com o tratamento controle (B-7), porém com tamanho de poros um pouco maiores.

Aos 29 dias, também foram observadas diferenças entre as microestruturas dos queijos dos diferentes tratamentos. O tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (A-29) apresentou microestrutura mais bem definida e mais porosa em relação aos demais tratamentos. Ambas as estruturas mostraram-se mais intumescidas devido à proteólise da massa atribuída ao fermento adicionado. No entanto, o tratamento com adição de água carbonatada (C-29) apresentou microestrutura com grande desarranjo da matriz proteica. Tal fato pode ter decorrido da incorporação de 5 % de água no leite, o que poderia favorecer o processo de modificação biológica da matriz paracaseínica e alterar a sua estrutura, tornando-a fisicamente expandida.

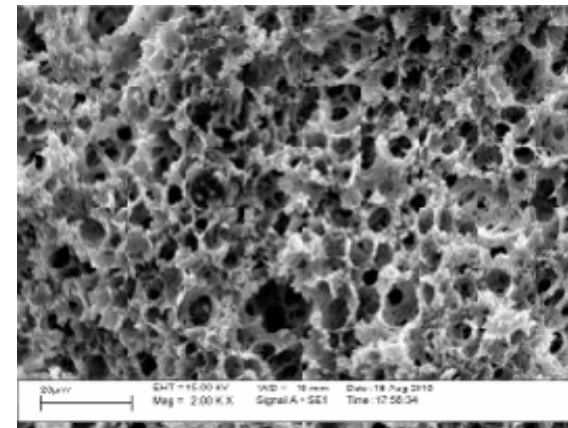
Várias mudanças físico-químicas ocorrem nos componentes estruturais da matriz proteica durante a maturação. Essas mudanças são promovidas por fatores como coagulante residual, microrganismos e suas enzimas e mudanças no equilíbrio mineral entre a fase contínua e a matriz paracaseínica. O tipo e a extensão das mudanças dependem da variedade, composição e das condições de maturação do queijo. O aumento da hidratação da paracaseína, que é acompanhado pela sua expansão física, é mediado por fatores como sua hidrólise, aumento do pH e solubilização do cálcio ligado à caseína (FOX et al., 2000).



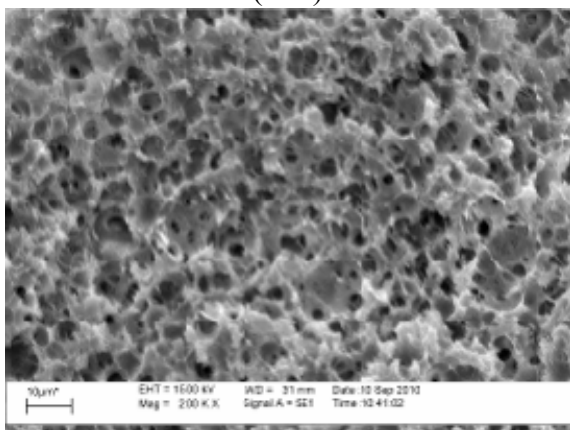
(A-7)



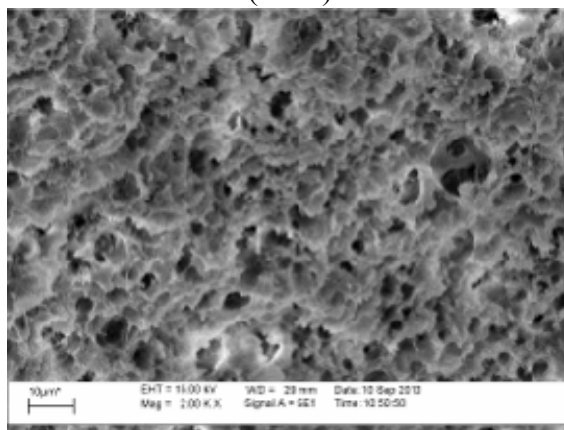
(B - 7)



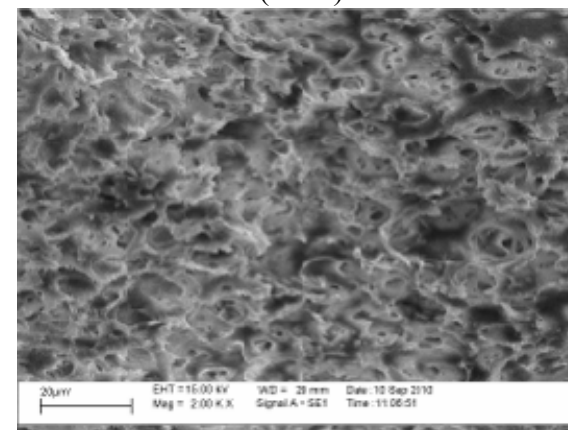
(C - 7)



(A-29)



(B - 29)



(C - 29)

Figura 23 – Micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos Minas Padrão submetidos aos diferentes tratamentos; (A-7) queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, aos 7 dias, (B-7) queijo do tratamento Controle, aos 7 dias, (C-7) queijo do tratamento com adição de água carbonatada, aos 7 dias; (A-29) queijo tratado com injeção de CO<sub>2</sub>, aos 29 dias, (B-29) queijo do tratamento Controle, aos 29 dias, (C-29) queijo do tratamento com adição de água carbonatada, aos 29 dias.



## 5. CONCLUSÃO

Com base nas condições empregadas neste experimento e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A acidificação do leite com injeção  $\text{CO}_2$ , até pH próximo de 6,3, otimizou o processo de fabricação dos queijos Minas Frescal e Minas Padrão por meio da redução dos tempos gastos para a fabricação de ambos os queijos.

- A adição de  $\text{CO}_2$  ao leite modificou a composição físico-química dos queijos Minas Frescal que apresentaram menor pH em relação ao tratamento controle. Ao longo do tempo avaliado, o queijo Minas Frescal tratado com injeção de  $\text{CO}_2$  ao leite apresentou menor pH e teor de umidade em relação aos queijos dos demais tratamentos, em virtude do maior dessoramento provocado pela sua microestrutura mais porosa.

- A injeção de  $\text{CO}_2$  ao leite aumentou a firmeza e a fraturabilidade dos queijos Minas Frescal. No entanto, ao longo do tempo, a firmeza aumentou em razão da maior porosidade e da consequente perda de umidade.

- Para o Minas Padrão, os tratamentos não influenciaram na composição físico-química, no perfil fermentativo da cultura láctica, na aceitabilidade e na preferência sensorial, bem como na evolução dos índices de extensão e profundidade da proteólise. Isso indica que o processo de fabricação e o método empírico de detecção do ponto pela consistência da coalhada apresentaram boa precisão e reprodutibilidade nas diferentes fabricações. Sendo assim pode-se

substituir o tratamento controle pelo tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> no leite para a fabricação do queijo Minas Padrão.

- A acidificação com CO<sub>2</sub> alterou a cifra de transição de proteína para o queijo. Os queijos tratados com injeção de CO<sub>2</sub> no leite apresentaram menor porcentagem de perda de proteína em relação aos demais tratamentos, para ambos os tipos, Minas Padrão e Minas Frescal. No entanto, o rendimento ajustado e o coeficiente GL não foram afetados.

- Os queijos Minas Frescal e Minas Padrão tratados com injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram visualmente microestrutura mais compacta e mais porosa em comparação aos demais tratamentos. A modificação na microestrutura dos queijos Minas Frescal alterou suas propriedades mecânicas e reológicas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os benefícios tecnológicos e econômicos gerados pela utilização do CO<sub>2</sub> são suficientes para justificar a sua aplicabilidade e incentivar as pesquisas, principalmente com relação à modificação do processo de fabricação dos queijos, visando melhorar as variáveis de rendimento. Modificações bem sucedidas serão necessárias para dar subsídios às indústrias de laticínios na tomada de decisão quanto à utilização de CO<sub>2</sub> dissolvido no leite para a fabricação de queijo.

Uma alternativa para melhorar os índices de rendimento seria a diminuição do tempo de mexedura, visando contrabalancear o maior dessoramento, juntamente com a utilização de CO<sub>2</sub>, porém, sem a acidificação com ácido láctico. Isto resultaria em pH final mais elevado e conseqüentemente diminuiria a dessoragem dos queijos.

Conforme relatos de indústrias que trabalharam com leite acidificado por meio de injeção de CO<sub>2</sub> para fabricação de queijos, somente as economias geradas com a diminuição de uso de coagulante seriam suficientes para garantir o retorno do investimento na implantação do sistema em apenas dois meses e meio.

O serviço de Inspeção Federal brasileiro atualmente proíbe a adição de dióxido de carbono ao leite para a fabricação de queijos e outros produtos lácteos. A justificativa contra a adição é que os possíveis efeitos microbiológicos relatados na literatura possam gerar algum tipo de negligência com relação às boas práticas de produção do leite e de fabricação dos produtos lácteos. No

entanto, os principais efeitos benéficos para os queijos Minas são de caráter tecnológico. Sendo assim, acredita-se, entretanto, que a legislação sobre o assunto possa avançar particularmente se houver interesse da indústria de laticínios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Queijos – mercado total brasileiro**. Compilado e organizado por Disney Criscione, São Paulo, 2010.

ANDRADE, N. J. DE. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela. 400p. 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. Pathogens in milk and milk products. 17ª ed. Washington: APHA. 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 14. ed. Arlington: Sidiney Willians. 1141 p. 1984.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, 2002. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2002.

BRASIL, 2003. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, Ministério da Agricultura. 2003.

BRASIL, 2006; Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006.

BRASIL 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 4, de 1 de Março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 de março de 2004.

BRASIL, 1996. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.

BURITI, F. C. A., OKAZAKI, T. Y., ALEGRO J. H. A., SAAD S. M. I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 57, n. 2, 2007.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n.2, p.173–180. 2005.

CALVO, M. M.; MONTILLA, M. M.; OLANO, A. Rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 56, nº 12, p. 1073-1076. 1993.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. Viçosa. MG. 43p. Dissertação de Mestrado, Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

CHANG, M. K., ZHANG, H. Carbonated Milk: Proteins. **Journal of Food Science**. v. 57, p. 880 – 882. 1992.

CHAVES, J. B. P., SPROESSER, R. L. **Práticas de Laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária. 81p. 1996.

CHEN, J. H., HOTCHKISS J. H. Effect of dissolved carbon dioxide organisms in cottage cheese on the growth of psychrotrophic. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 2941-2945. 1991.

CHIO, H. S., KOSIKOWSKI, F. V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. **Journal of Dairy Science**. v. 68, n. 613 – 6619, 1984.

CHURCH, I. J., PARSONS, A. L. Modified atmosphere packaging technology: A review. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 67, p. 143-152. 1995.

CORRAL, L. G., POST, L.S., MONTVILLE, T. J. Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 981– 982, 1988.

CRUZ, R. S. **Efeito da utilização de CO<sub>2</sub> no processamento de macarrão tipo massa fresca**. Viçosa. MG. 53p. Dissertação de Mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. 2000.

DALGLEISH, D.G. e LAW, A.J.R. pH-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles. II Mineral Solubilization and its Relation to Casein Release. **Journal of Dairy Research**. 56, 727 – 735. 1989.

DALGLEISH, D.G.. The enzymatic Coagulation of Milk. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. Ed. por FOX, P. F. v. 2, second edition. Ed Chapman & Hall, p 69 – 100. 1993.

DANIELS, J. A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S. S. H. A review of carbon dioxide effects on microbial growth and food quality. **Journal of food Protection**, v. 48, n. 6, p. 532-537. 1985.

DE LA FUENTE, M.A., OLANO, A., REQUENA, T. e JUÁREZ, M. Salt Balance and Rennet Clotting Properties of Cow's, Ewe's and Goat' Milks Preserved with Carbon Dioxide. **Journal of Food Protection**. 61, 66-72. 1998

DIAS, B. M. **Influência da adição de CO<sub>2</sub> ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal**. Dissertação de Mestrado, Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. SP. 108p. 2009.

DIAS, B. M., GIGANTE, M. L. Efeito da pré-acidificação do leite através da adição de CO<sub>2</sub> sobre o rendimento e as características físico-químicas do queijo Minas Frescal. **Anais do XXVI Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, Jul. de 2009.

DIEZ-GONZALEZ, F., JARVIS, G. N., ADAMOVICH, D. A., RUSSELL, J. B. (2000), Use of carbonate and alkali to eliminate Escherichia coli from dairy cattle manure, **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 1275–1279. 2000.

DIXON, N. M., KELL, D. B. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 109-136, 1989.

ECK, A. **O queijo**. Edição n. 137.024/5.141. v. 1, Coleção EUROAGRO, Portugal: Publicações Europa-América. 1987.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Estatísticas do Leite. Leite em Números**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. 2008.

ERKMEN, O. Effect of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 65, p. 131-135. 2001.

FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 1, p. 58-70, 1991.

FOX, P. F., Mc SWEENEY, P.L.H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, v.1, 617p. 2004.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., Mc SWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 544 p. 2000.

FOX, P. F., Mc SWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Published by Blackie Academic & Professional, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE1 8UK. First ed. 478p. 1998.

FREIRE, C. B. F. **Efeito da adição de *Bifidobacterium* Bb-12 e/ou do emprego da acidificação direta sobre as propriedades de queijo Minas Frescal**. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2009.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo, SP, Brasil, 200p. 2005.

FURTADO, M. M. **Quesos típicos de latinoamerica**, Fonte Comunicações e Editora, distribuição: Revista Indústria de Laticínios. São Paulo - SP. 192p 2005b.

GARCIA-GONZALEZ, L., GEERAERD, A.H., SPILIMBERGO S., ELST K., VAN GINNEKEN, L., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F., DEVLIEGHIERE F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology** v. 117. p. 1–28. 2007.

GASTALDI, E., LAGAUDE, A. e TARODO DE LA FUENTE, B. Micellar Transition State in Casein Between pH 5.5 and 5.0. **Journal of Food Science**. v. 61, p. 59-64. 1996.

GENIGEORGIS, C. Microbial and safety implications of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p. 237-251, 1985.



GEVAUDAN, S., LAGAÚDE, A., FUENTE, T., CUQ, L. Effect of treatment by gaseous carbon dioxide in the colloidal phase of skim milk. **Journal of Dairy Science**. 79: 1713 – 1721. 1996.

GILL, C. O., TAN, K.H. Effect of carbon dioxide on growth of spoilage bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. V.39, n. 2, p. 317 – 319, 1980.

GUILLAUME C., JIMENEZ, L., CUQ, J-L. MARCHESSEAU, S. An original pH-reversible treatment of milk to improve rennet gelation. **International Dairy Journal** v. 14. p. 305–31. 2004.

GREEN, M.L. e GRANDISON, A.S. Secondary (Non-enzymatic) Phase of Rennet Coagulation and Post-coagulation Phenomena. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol. 1: General Aspect (Fox, P.F., ed.), p. 101-140, Chapman & Hall, London, UK. 1993.

GUEIMONDE, M., L, DELGADO, T., BADA-GANCEDO, J. C., REYES-GAVILÁN. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO<sub>2</sub>-treated milk. **Food Research International**. v. p. 36, 43-48. 2003.

GUERREIRO, L. Utilização de CO<sub>2</sub> em laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Anais da XXXV Semana do Laticinista, n 300, Juiz de Fora, Jul/Dez de 1997, v. 52.

HOTCHKISS, J. H., CHEN, J. H., LAWLESS, T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensorial changes in pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 690–695. 1998.

ISEPON, J. S., OLIVEIRA, A. J. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas Frescal. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 50, n. 3, p 451-454, out./dez. 1993.

ISMAIL B., CHOI, L. H., WERE L. M., NIELSEN S. S. Activity and Nature of Plasminogen Activators Associated with the Casein Micelle. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 3285–3295. 2006.

JACOBS, M. B. Manufacture and analysis of carbonated beverages. **Chemical Publishing CO. INC** – NY, 212, 5<sup>a</sup> Avenue. 1959.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6<sup>o</sup> ed. Tradução: Eduardo César Tondo...[et al]. Porto Alegre: Artmed. 711 p. 2005.

JUAN, B., TRUJILLO A.J., GUAMIS, V., BUFFA, M. e FERRAGUT, V. Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese **International Dairy Journal**.v. 17, p. 248–254. 2007.

KAROUI, R., e DUFOUR, É. Dynamic testing rheology and fluorescence spectroscopy investigations of surface to centre differences in ripened soft cheeses. **International Dairy Journal**. Volume 13, Issue v. 12, p. 973-985, 2003.

KING, J. S., MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research**. v. 49, p. 439-447. 1982.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas Frescal em uma indústria de Laticínios**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. ESALQ/USP. Piracicaba – São Paulo. 61p. 2005.

LOBATO-CALLEROS, C., RAMIREZ-SANTIAGO, C., OSORIO-SANTIAGO, V. J., VERNON-CARTER, E. J. Microstructure and texture of Manchego cheese-light products Made with canola oil, lipophilic, and hydrophilic emulsifiers. **Journal of Texture Studies**, v.33, p.165–182, 2002.

LONDOÑO, M. M. D. **Determinação das características de fabricação, padrões físico-químicos, sensoriais e de comercialização do queijo Minas Meia-Cura e comparação com os queijos Minas Padrão e Prato**. Dissertação de Mestrado, Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras. MG. 53p. 1998.

LONDOÑO, M. M. D., FURTADO, M. M. ABREU, L. R. Comparação dos processos de fabricação, composição centesimal e sensorial do queijo Minas Meia Cura com os queijos Minas Padrão e Prato. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*. Jan/Fev, nº 306, v. 54, p. 20-22. 1999.

LOSS, C. R. AND HOTCHKISS, J. H. Use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. **Dairy Processing**. *Cornell University, USA*. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH England. v. 1, p. 391 – 410. 2003.

LUCEY, A., JOHNSON, M. E., E HORNE, D. S. J. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 2725–2743. 2003.

LUCEY, J.A., FOX, P.F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: a review. **Journal of Dairy Science**. v. 76. p. 1714-1724. 1992.

LUCEY, J.A., FOX, P.F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: a review. **Journal of Dairy Science**. v. 76. p. 1714-1724. 1992.

LUCEY, J.A., GORRY, C., O'KENNEDY, B., KALAB, M., TAN-KINITA, R. e FOX, P.F. Effect of Acidification and Neutralization of Milk on Some Physico-chemical Properties of Casein Micelles. **International Dairy Journal**. v. 6, p. 257-272. 1996.

MA, Y., BARBANO, D. M., J. HOTCHKISS, H., MURPHY, S., LYNCH, J. M. Impact of CO<sub>2</sub> Addition to Milk on Selected Analytical Testing Methods. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 1959–1968. 2001.

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

MADADLOU, A., KHOSROWSHAHI ASL, A., MOUSAVI, M. E., FARMANI J. The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian White cheese. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.330–335. 2007.

MARTIN, J. D., WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Effects of Carbon Dioxide on Bacterial Growth Parameters in Milk as Measured by Conductivity. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 1932–1940. 2003.

McCARNEY, T., W. M. A. MULLAN, and M. T. ROWE. Effect of carbonation of milk on Cheddar cheese yield and quality. **Milchwissenschaft**. v. 50, p. 670–674. 1995.

Mc SWEENEY, P. L. H. **Cheese problems solved**. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge CB21 6AH, England. 402p. 2007.

METZGER, L. E., D. M. BARBANO, M. A. RUDAN, and P. S. KINDSTEDT. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese. I. Composition and yield. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 648–658. 2000.

MINIM, V. P. R., **Análise sensorial estudos com consumidores**. Viçosa – MG: Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 225p. 2006.

MINITAB, **Meet MINITAB 14 (versão em Português), MINITAB Satatguide, MINITAB Help**. Minitab release 14.1 - Statistical Software. Minitab Inc., 2003.

MONTILLA, A., CALVO, M. M., OLANO, A. Manufacture of cheese made from CO<sub>2</sub>-treated milk. **Z. Lebensm Unters Forsch**. v. 200, p. 289-292. 1995.

NELSON, B. K., LYNCH, J. M., BARBANO, D. M. Impact of Milk Preacidification with CO<sub>2</sub> on the Aging and Proteolysis of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 3590–3600. 2004.

NORIEGA, L., GUEIMONDE, M., ALONSO, L., REYES-GAVILÁN, C. G., Inibition of *bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiology**. 20, 519-526. 2003.

PARK, Y. W., Kalantari, A., Frank, J. F. Changes in the microflora of commercial soft goat milk cheese during refrigerated and frozen-storage. **Small Ruminant Research**. v. 53, Issues 1-2, p 61-66. 2004.

PAULA, J. C. J. Aplicação de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) na Indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. Set/Out, n° 352, v. 61, p. 1-50. 2006.

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. Dissertação de Mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. . Viçosa. MG. 53p. 2005a.

PAULA, J. C. **Queijo Minas Padrão**. Roteiro de aulas práticas do curso técnico em Leite e Derivado do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Juiz de Fora – MG. 3p. 2005b.

PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., COSTA JÚNIOR, L. C. G., OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2.ed. ampl. e rev. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001. 234 p.

PESTANA, C. M. P. **Conservação de filetes de sardinha, *Sardina pilchardus*, sujeitos a estabilização com gás solúvel (SGS), embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada**. Dissertação de Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal. 2007.

PHILLIPS, C. A. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food and Technology**. v. 31, p. 463-479. 1996.

PINTO, M. S., CARVALHO A. F., PIRES, A. C. S., PAULA, J. C. J., SOBRAL, D., MAGALHÃES, F. A. R., Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**. v. 20, p. 1167–1170. 2009.

RAJAGOPAL, M., WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO<sub>2</sub> storage of raw milk: microbiological effects. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 3130–3138. 2005.

ROBERTS, R. F., TORREY, G. S. Inibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 52 – 60. 1988.

ROWE, M.T. Effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *pseudomonas fluorescens* B52. **International Journal of Food Microbiology**. v. 6, p. 51-56. 1988.

RUAS-MADIEDO, P., ALONSO, L., DE LLANO, D. G., REYES-GAVILÁN, C. G. de. Growth and metabolic activity of a cheese starter in CO<sub>2</sub>-acidified and non-acidified refrigerated milk. **Z. Lebensm Unters Forsch**, v. 206, p. 179-183, 1998b.

RUAS-MADIEDO, P., ALONSO, L., DELGADO, T., BADA-GANCEDO, J. C., REYES-GAVILÁN, C. G. Manufacture of Spanish hard cheeses from CO<sub>2</sub>-treated milk. **Food Research International**, v. 35, p. 681-690. 2002.

RUAS-MADIEDO, P., BADA-GANCEDO, J. C., ALONSO, L., REYES-GAVILÁN, C. G., Afuega'l Pitu cheese quality: carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. **International Dairy Journal**. n. 8, p. 951-958. 1998a

SABOYA, L. V., OLIVEIRA, A. J., FURTADO M. M., SAPADOTI, L. M. **Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas Frescal**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 18, n. 4, p. 368-378, out./dez. 1998.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. ESALQ/USP. Piracicaba – São Paulo. 80p. 2007.

SARANTÓPAULOS, C.I.G.L., ÁLVES, R.M.V., OLIVEIRA, de L.M., GOMES, T.C. **Embalagens com atmosfera modificada**. 2. ed. Campinas: CETEA, ITAL. 114p. 1998.

SILVA, I. M.M., ALMEIDA, R. C. C., ALVES, M. A. O., ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, J. D., QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos. Métodos Químicos e Biológicos**. 3ª Ed. Editora UFV. Viçosa-MG. p 213-218. 2002.

SILVERIA, A. C., DIAS, M. E. F., GIGANTE. M. L. Efeito da pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> sobre a dosagem de coagulante empregado na fabricação de queijos. **Anais do XXVI Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, Jul. de 2009.

SOUSA, M.J., ARDO, Y., Mc SWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**. v. 11, 327–345. 2001.

STAMPANONI, C. R., NOBLE, A. C. The influence of fat, acid and salt on the temporal perception of firmness, saltiness and sourness of cheese analogues. **Journal of Texture Studies**, v. 22, p. 381-392. 1991.

ST-GELAIS, D., CHAMPAGNE, C. P., BÉLANGER, G. Production of Cheddar cheese using milk acidified with carbon dioxide. **Milchwissenschaft**. v, 52, n. 11, p. 614-618. 1997.

TEIXEIRA, L.V., FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n.1, p.243-250, 2008.

VAN HOOYDONK, A.C.M., HAGEDOORN, H.G. and BOERRIGTER, I.J. pH Induced Physicochemical changes of Casein. Micelles in Milk and their Effect on Renneting. 1. Effect of Acidification on physico-chemical properties. **Netherlands milk and dairy journal**. v. 40, p. 281-296. 1986.

VIANNA, P. C. B. Adição de dióxido de carbono ao leite cru: efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT. Tese de doutorado, Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2010.

VINDEROLA, C. G., GUEIMONDE, M., DELGADO, T., REINHEIMER, J.A., REYES-GAVILÁN, C. G. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v. 10, p. 213-220. 2000.

VIOTTO, W. K., OLIVEIRA, A. N. Produção de Mussarela por acidificação direta usando pequena quantidade de coagulante. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.53, p.44-52. 1998.

VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. In P. Wallstra, & T. Van Vliet (Eds.), **bulletin of the International Dairy Federation**. n. 268, p. 49-61, 1991.

WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology - Principles of Milk Properties and Processes**. New York: Marcel Dekker. 727 p. 1999.

WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Effect of carbon dioxide on the growth of *Bacillus cereus* spores in milk during storage. **Journal of Dairy Science**. 85: 15–18. 2002.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise de queijo minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, n. 261/266, p. 50-54, 1989.