

JOÃO LUIZ ANDREOTTI DAGOSTIN

**AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DE
QUEIJO MINAS FRESCAL ELABORADO A PARTIR DE LEITE CARBONATADO**

CURITIBA

2011

JOÃO LUIZ ANDREOTTI DAGOSTIN

**AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DE
QUEIJO MINAS FRESCAL ELABORADO A PARTIR DE LEITE CARBONATADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr.^a Maria Lucia Masson

CURITIBA

2011

Dagostin, João Luiz Andreotti

Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo minas frescal elaborado a partir de leite carbonatado / João Luiz Andreotti Dagostin. – Curitiba, 2011.

79 f. : il.; graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Maria Lucia Masson

1. Queijo minas frescal - Carbonatação. I. Masson, Maria Lucia. II. Título.

CDD 637.356

JOÃO LUIZ ANDREOTTI DAGOSTIN

AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL ELABORADO A PARTIR DE LEITE CARBONATADO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. MARILDE TEREZINHA BORDIGNON LUIZ
Centro de Ciências Agrárias, UFSC


Prof.^a. Dr.^a. MARCIA REGINA BEUX
Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2011.

À Danielle, minha esposa, e meus irmãos queridos.
Aos meus pais Luiz e Maria Aparecida pelo amor, carinho e incentivo.
Aos amigos que apesar de longe, sempre estiveram comigo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e por estar comigo em cada instante da minha vida.

À minha toda família, pelos conselhos que me fizeram acreditar em meus passos, por estarem sempre comigo, pelo amor e imenso carinho, que me faz sentir a pessoa mais especial deste mundo.

À minha esposa Danielle, por me dedicar todo seu amor e compreensão nos momentos bons e nos momentos difíceis, por me agradecer com sua inteligência e auxílio com o desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho e companheirismo que tenho todos os dias. Te levo em meu coração!

À Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Masson por todo seu apoio, pela amizade, ensinamento e confiança no trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia e à Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Beux por participarem da banca do exame de qualificação e pelas sugestões no trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marilde Terezinha Bordignon Luiz e novamente à Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Beux por aceitarem o convite para participar da banca de defesa e correções deste trabalho.

Ao secretário do PPGTA, Paulo Krainski, pela paciência e auxílio durante o mestrado.

Aos amigos e colegas do PPGTA, pelos momentos de alegria, pela amizade, pelo apoio e consideração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR pela oportunidade concedida.

À APCBRH/PARLPR, em especial a Darlene Venturini Moro, por possibilitar a realização das análises do leite.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Aos demais, que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

Meus mais sinceros e profundos agradecimentos!

RESUMO

A estocagem de leite cru na fazenda é considerada etapa fundamental na preservação de sua qualidade pré e pós-processamento. Muitos estudos têm sugerido o uso da acidificação do leite cru por CO_2 , pois este processo resulta em efeitos bacteriostáticos. O queijo Minas Frescal é um produto fresco, de curta vida de prateleira e susceptível à rápida deterioração microbiológica. Desta forma, surgiu o interesse de adequar a adição de CO_2 ao leite destinado à fabricação do Minas Frescal. Os objetivos deste trabalho foram determinar o efeito da carbonatação do leite pasteurizado destinado à produção do queijo Minas Frescal, sob parâmetros texturais, microbiológicos e físico-químicos, comparando com o método de acidificação direta. Um queijo controle (pH 6,8), dois carbonatados e dois outros queijos por acidificação direta (pH 6,4 e 6,0) foram produzidos e comparados. A acidificação do leite promoveu a multiplicação de bactérias ácido lácticas nos queijos produzidos por ambos os processos. Micro-organismos psicrotóxicos, psicrotóxicos proteolíticos e psicrotóxicos lipolíticos resultaram em menores contagens a faixas de pH mais baixas nos dias 4 e 8 de armazenamento. Os queijos elaborados com CO_2 apresentaram maior dureza, independente do pH. A umidade e o pH diminuíram com o armazenamento, devido à sinérese e a produção de ácido láctico, respectivamente. Os queijos processados por acidificação direta mostraram maior acidez do que aqueles adicionados de CO_2 . De acordo com os dados obtidos, leite pasteurizado acidificado com CO_2 pode ser satisfatoriamente usado na fabricação de queijo Minas Frescal, substituindo o processo de acidificação direta.

Palavras-chave: CO_2 . Queijo. Minas Frescal. Carbonatação.

ABSTRACT

The storage of raw milk on the farm is considered a crucial step in preserving its pre and post-processing quality. Many studies have suggested the use of raw milk acidification by CO₂, since this process results in bacteriostatic effects. Minas cheese is a fresh product, with a short shelf life and susceptible to rapid microbiological spoilage. Thus, the interest of add CO₂ to milk appeared as a suitable alternative for the manufacture of Minas Frescal. Our objectives were to determine the effect of carbonation of pasteurized milk for the production of Minas cheese, on textural, microbiological and physico-chemical parameters, compared to the direct acidification method. A Control cheese (pH 6.8), two carbonated cheeses and other two produced by direct acidification (pH 6.4 and 6.0) were compared. Acidification of milk promoted the growth of lactic acid bacteria in cheeses produced by both processes. Psychrotrophic microorganisms, proteolytic psychrotrophs and lipolytic psychrotrophs had lower scores at lower pH ranges on days 4 and 8. Cheeses elaborated with CO₂ had higher hardness, regardless of pH. Moisture and pH decreased with storage due to syneresis and the production of lactic acid, respectively. The direct acidification cheeses showed higher acidity than those treated with CO₂. According to the data collected, pasteurized milk acidified with CO₂ can be satisfactorily used in the manufacture of Minas Frescal cheese, replacing the direct acidification process.

Key words: CO₂. Cheese. Minas Frescal. Carbonation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO: CARBONATAÇÃO E PROCESSAMENTO DO LEITE	36
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL	37
FIGURA 3 - SISTEMA DE ACIDIFICAÇÃO DO LEITE COM DIÓXIDO DE CARBONO	41
FIGURA 4 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS <i>VERSUS</i> TEMPO DE ARMAZENAMENTO	54
FIGURA 5 – CURVA TÍPICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	55
FIGURA 6 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS <i>VERSUS</i> TEMPO DE ARMAZENAMENTO	58
FIGURA 7 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS <i>VERSUS</i> TEMPO DE ARMAZENAMENTO	60
FIGURA 8 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS <i>VERSUS</i> TEMPO DE ARMAZENAMENTO	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE CRU	48
TABELA 2 – PH DOS QUEIJOS DURANTE ARMAZENAMENTO.....	50
TABELA 3 – UMIDADE DOS QUEIJOS DURANTE ARMAZENAMENTO.....	51
TABELA 4 – EVOLUÇÃO DOS PSICROTRÓFICOS AERÓBIOS TOTAIS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM.....	53
TABELA 5 - EVOLUÇÃO DOS PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM.....	56
TABELA 6 - EVOLUÇÃO DOS PSICROTRÓFICOS LIPOLÍTICOS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM.....	59
TABELA 7 - EVOLUÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM	62
TABELA 8 - DUREZA E COESIVIDADE DOS QUEIJOS PRODUZIDOS.....	65
TABELA 9 - ELASTICIDADE, MASTIGABILIDADE E GOMOSIDADE DOS QUEIJOS PRODUZIDOS.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	15
2.2 QUEIJOS - DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO	16
2.3 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL.....	17
2.4 ETAPAS DE FABRICAÇÃO DO MINAS FRESCAL	19
2.4.1 Obtenção do leite.....	19
2.4.2 Pasteurização.....	20
2.4.3 Acidificação e coagulação.....	21
2.4.4 Coagulação	23
2.4.5 Salga.....	24
2.5 MICROBIOLOGIA DO QUEIJO MINAS FRESCAL	25
2.5.1 Contaminação de Produtos Lácteos	25
2.5.2 Bactérias Lácticas.....	27
2.5.3 Micro-organismos Psicrotróficos	27
2.6 ALTERAÇÕES QUÍMICAS DO QUEIJO	29
2.7 ACIDIFICAÇÃO POR DIÓXIDO DE CARBONO.....	30
2.8 PROPRIEDADES TEXTURAIIS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL.....	36
3.2 CARBONATAÇÃO	40
3.2.3 Análises físico-químicas.....	42

3.2.3.1 Leite cru	42
3.2.3.2 Queijo Minas Frescal	43
3.2.4 Análises Microbiológicas	45
3.2.4.1 Contagem total de psicrotróficos	45
3.2.4.2 Contagem de psicrotróficos proteolíticos	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU	48
4.2 pH, UMIDADE E ACIDEZ TITULÁVEL DOS QUEIJOS	49
4.3 MICROBIOLOGIA DOS QUEIJOS	51
4.3.1 Contagem de Psicrotróficos Aeróbios Totais	51
4.3.2 Contagem de psicrotróficos proteolíticos	56
4.3.3 Contagem de psicrotróficos lipolíticos	59
4.3.4 Contagem de bactérias lácticas	61
4.4 PROPRIEDADES DE TEXTURA	64
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Os queijos são alimentos de alto valor nutricional, ricos em proteínas, lipídeos, carboidratos, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio e vitaminas (A, D e complexo B). Existem mundialmente mais de 1.000 tipos de queijos, considerando a espécie de animal o qual o leite é proveniente e os diferentes processos de produção, conferindo assim diferentes formas, texturas, sabores e odores (PERRY, 2004; SPREER, 1991).

Em 2004 o Brasil produziu cerca de 470.000 toneladas de queijos. Destes, aproximadamente 29.000 toneladas corresponderam à produção da variedade Minas Frescal, sendo assim um dos queijos mais produzidos no país (EMBRAPA, 2010). Suas principais características são sabor agradável e ligeiramente ácido, de aroma leve e delicado. Este queijo é do tipo fresco, de alta umidade e pH maior que 5,0. Estas características somadas à manipulação durante a fabricação tornam-no um meio propício à contaminações microbiológicas e reações bioquímicas.

A qualidade dos queijos é determinada pela qualidade da matéria-prima, além de processamento e armazenamento adequados. O leite como matéria-prima principal, deve ser de boa procedência e de baixa contaminação microbiológica, razão pela qual a seleção do mesmo deve estar baseada principalmente na qualidade desejada para o produto final.

A adoção da estocagem do leite cru em temperaturas de refrigeração nas propriedades rurais reduziu as perdas do leite provocadas pela atividade de bactérias mesofílicas, que acidificavam o leite não refrigerado. Entretanto, a manutenção do leite cru sob refrigeração, por períodos prolongados, favorece a seleção de micro-organismos psicrótróficos, que são capazes de se multiplicar a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento (COUSIN, 1982; ARCURI, 2003).

A carbonatação é o nome dado ao processo que envolve o emprego de dióxido de carbono (CO₂) em meios aquosos, o que resulta na formação de ácido carbônico. Estudos mostram que a acidificação por dióxido de carbono é uma tecnologia promissora para a manutenção da qualidade microbiológica do leite cru

armazenado sob refrigeração, por possuir ação bacteriostática (MA *et al.*, 2003; HOTCHKISS *et al.*, 2006; SHIRAI, 2010).

A inativação microbiana por CO₂ depende de vários parâmetros, como temperatura, pressão e umidade. Estas condições podem contribuir ou não com a efetividade do tratamento, pois afetam diretamente na difusividade do CO₂ (LIN *et al.*, 1992). Com certos limites, uma maior duração da exposição ao dióxido de carbono permite melhor redução microbiana (BALLESTRA, 1996). Alguns trabalhos mostraram que o ajuste do leite a pH próximo de 6,0 através da carbonatação, melhora consideravelmente a estabilidade microbiológica quanto a organismos psicrotróficos (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996; SHIRAI, 2010).

O prolongamento do armazenamento sob refrigeração do leite na fazenda permite um acúmulo de quantidades consideráveis de leite para a fabricação de queijos. Este procedimento pode oferecer incentivos econômicos e convenientes em fazendas que produzem alguns litros de leite diariamente para produção própria de queijo ou para o fornecimento de leite para as queijarias (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1998).

O emprego eficaz da tecnologia de acidificação por CO₂ na conservação do leite pode tornar-se ferramenta muito útil no aumento da vida-de-prateleira de derivados, como o queijo Minas Frescal. Utilizando-se uma planta pré-existente de carbonatação do leite, o custo de adequação do sistema para utilização em derivados seria reduzido. Como resultado, existiriam menores perdas do leite na fazenda ou indústria, e maior qualidade no leite e produtos lácteos. A utilização do processo de carbonatação poderia, portanto, oferecer benefícios em termos de qualidade microbiológica em relação a métodos pré-existentes como o de acidificação direta, que é um processo muito utilizado na fabricação deste e muitos outros queijos.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a acidificação por CO₂ como tecnologia de redução de determinados grupos bacterianos em queijo Minas Frescal, em função do tempo de armazenamento e avaliar sua influência sobre atributos de qualidade, comparando com o método de acidificação direta.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver a tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal a partir de leite pasteurizado carbonatado.
- Analisar as propriedades físico-químicas do leite cru como matéria-prima e do queijo como resultado de seu processo de fabricação.
- Avaliar o efeito da carbonatação sobre a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos e bactérias lácticas em queijo Minas Frescal comparado ao processo de acidificação direta a cada 4 dias, durante armazenamento total de 20 dias.
- Estudar os parâmetros de textura dos queijos produzidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

O leite é um dos produtos naturais mais valiosos e é desde milênios, um dos constituintes fundamentais da alimentação humana. Como se trata de uma substância muito complexa, para ser transformada em seus múltiplos derivados, é necessária a aplicação de tecnologias próprias para cada produto (SPREER, 1991).

O leite é o líquido secretado pelas glândulas mamárias, tanto do ser humano, como dos animais mamíferos, cujo fim é servir de alimento ao recém-nascido. Leite cru é o produto obtido por uma ou mais ordenhas higiênicas do úbere de uma ou mais vacas, com posterior refrigeração e sem adição ou subtração de qualquer substância. Quando se trata de leite de outras espécies, deve-se indicar o animal de procedência deste leite (SINGH e BENNET, 2002).

Queijo é o nome genérico para um grupo de produtos alimentares à base de leite, produzidos ao longo de todo o mundo em uma grande diversidade de aromas, texturas, e formas. Acredita-se que foi desenvolvido no Crescente Fértil entre os rios Tigre e Eufrates, há 6.000 anos, quando alguns animais começaram a ser domesticados como fonte de alimentos. Tradicionalmente, todos os queijos eram feitos de leite cru, uma prática que permaneceu difundida até a década de 1940. Ainda hoje, uma parte significativa de queijos é feita de leite cru na Europa. A utilização de leite cru é indesejável por oferecer perigos para a saúde pública e pela presença de micro-organismos deteriorantes, o que pode causar defeitos no sabor e/ou textura (JENSEN e KROGER, 2000; FOX *et al.*, 2000).

Quando queijo era produzido a partir de leite fresco em fazendas ou em pequenas fábricas locais, o crescimento de contaminação por micro-organismos era mínimo, mas conforme as fábricas tornaram-se maiores, o armazenamento do leite por períodos mais longos se tornou necessário e, por conseguinte a qualidade microbiológica do leite tornou-se variada. Por razões de saúde pública, se tornou cada vez mais popular desde o início do século passado a pasteurização do leite líquido para consumo (FOX *et al.*, 2000).

Todo o leite utilizado na produção de queijos frescos precisa ser de boa qualidade e, tanto quanto possível, livre de contaminação bacteriana ou de agentes químicos como antibióticos, herbicidas, pesticidas, etc. No caso dos antibióticos, se forem administrados ao gado a ser ordenhado, estes serão transmitidos ao leite e poderão inibir a sua coagulação ou alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica (PERRY, 2004).

O consumo de queijo varia de modo extensivo no mundo sendo ele, juntamente com os leites fermentados, o principal produto em crescimento no setor do leite. Há muitas razões para o aumento do consumo de queijos, incluindo a imagem dietética, comodidade e flexibilidade de utilização, e a grande diversidade de sabores e texturas. Pode ser considerado como um alimento conveniente pela sua ampla utilização: como um dos principais componentes de uma refeição, como uma sobremesa, ou como um ingrediente de outros alimentos; pode ser consumido sem preparação ou ser submetido a diversos processos térmicos (JENSEN e KROGER, 2000).

Os tratamentos podem transformar as características químicas e físicas de tal maneira, que o produto final seja muito distinto do produto cru inicial. Estes processos consistem em separar frações não desejadas no produto final ou em incrementar ou reduzir o conteúdo de substâncias nutritivas dos alimentos (SPREER, 1991).

2.2 QUEIJOS - DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO

O queijo é elaborado com leite integral, creme de leite, leite desnatado, ou uma mistura destes produtos. É considerado um dos alimentos mais nutritivos que se conhece: um queijo com 48 % de gordura contém aproximadamente 23 – 25 % de proteína. Comparativamente, isto significa que 210 gramas desse produto equivalem a 300 gramas de carne, em quantidade proteica (PERRY, 2004; JENSEN e KROGER, 2000). Quimicamente, é uma mistura de caseína, gordura láctea e outros componentes do leite que se separa das matérias-primas por técnicas adequadas.

Este processo de separação é favorecido adicionando-se enzimas, acidificando e/ou por aquecimento (JENSEN e KROGER, 2000; SPREER, 1991).

A classificação dos queijos baseia-se em características decorrentes do tipo de leite utilizado, do tipo de coagulação, da consistência da massa, do teor de gordura, do tipo de casca, do tempo de cura, entre outros (PERRY, 2004).

Para a elaboração do queijo, geralmente a mistura láctea passa por moldagem, salga, prensagem e adição de culturas fungicas ou bacterianas. Em muitos casos são acrescentados também corantes, especiarias ou outros alimentos não lácteos. O queijo pode ser consumido fresco ou em diferentes graus de maturação (SPREER, 1991).

A elaboração de queijo é seguramente a forma mais antiga de processamento do leite. A produção de leite sempre esteve unida à intenção do homem pela conservação da proteína do leite. Os diferentes procedimentos de fabricação do queijo, que implicam numa série de transformações bioquímicas, fazem com que a caseína, a princípio insípida, adquira um sabor agradável e característico para cada tipo de queijo (SINGH e BENNET, 2002; SPREER, 1991).

2.3 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

Segundo a Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997), através da Resolução MERCOSUL nº 145/96 (BRASIL, 1996a), o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas na forma de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. É classificado como queijo semigordo de alta umidade a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5 Kg.

O Ministério da Agricultura, em março de 2004, por meio da Instrução Normativa nº 44 (BRASIL, 2004) corrigiu a classificação da umidade, considerando o Minas Frescal como queijo semigordo (de 25 a 44 % de gordura no extrato seco) de **muito alta** umidade (não inferior a 55 %).

O Minas Frescal é um dos queijos não curados mais populares no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2008). É originário do estado de Minas Gerais, ocupando o lugar de 3º queijo mais produzido no país (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Produzido de leite de vaca, é caracterizado por sua massa branca, consistência mole, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, sabor suave a levemente ácido (BRASIL, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009). Queijos macios, brancos, frescos que estão sujeitos a processo mínimo antes de empacotar, são altamente perecíveis e assim têm uma vida de prateleira curta, até mesmo sob refrigeração (SILVA *et al.*, 2003). Segundo a Resolução RDC nº145/96 do MAPA - Brasil, (1996a), o queijo Minas Frescal deve ser acondicionado a temperaturas não superiores a 8 °C e embalado em embalagens plásticas ou acondicionado em embalagens bromatologicamente aptas.

As características próprias deste queijo – pH acima de 5,0, baixo conteúdo de sal (1,4 – 1,6 %) e ausência de conservantes - favorecem reações bioquímicas e microbiológicas que afetam a qualidade (CARVALHO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008). No entanto este queijo não foi um produto muito bem definido quando às suas propriedades físicas e químicas por não ter sido consolidada uma padronização do queijo e pela diversidade de processos de fabricação (ABIQ, 2011; FURTADO e LOURENÇO-NETO, 1994).

De acordo com Furtado e Lourenço-Neto (1994), as características normais do queijo Minas Frescal seriam a umidade de 55 % a 58 % e gordura de 17 % a 19 %. Alves (2010) avaliou a composição centesimal do queijo Minas Frescal por acidificação direta e obteve os seguintes resultados (aproximados): 64,6 % de umidade, 4,1 % de cinzas, 16,7 % de proteínas e 18,9 % de gordura. Sangaletti (2007), estudando a vida de prateleira de queijos Minas Frescal disponíveis no mercado, encontrou valores médios no 1º dia de análise sendo: 21,2 % gordura e 21,3 % proteína.

2.4 ETAPAS DE FABRICAÇÃO DO MINAS FRESCAL

2.4.1 Obtenção do leite

A obtenção do leite de vacas sadias, em condições higiênicas adequadas, e o seu resfriamento imediato a 4 °C são as medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e a segurança do leite e seus derivados (ARCURI *et al.*, 2006).

Leite cru contaminado com patógenos nativos constitui um risco a saúde humana se usado sem pasteurização para a produção de queijos. Glândulas mamárias infectadas por mastite stafilocócica clínica ou subclínica (infecção no úbere) são a principal fonte de contaminação do leite cru. Deste modo, para evitar a contaminação do leite cru na fazenda, boas práticas de higiene são essenciais para prevenir o acúmulo, sobrevivência, e transmissão de patógenos (CHAMBERS, 2002; FOX, 2000).

A ação das bactérias ou de suas enzimas sobre os componentes lácteos causa várias alterações no leite e seus derivados. Esses defeitos incluem sabores e aromas indesejáveis, diminuição da vida de prateleira, interferência nos processos tecnológicos e redução do rendimento, especialmente de queijos (CHAMPAGNE *et al.*, 1994).

A adoção do processo de conservação pelo frio do leite cru reduziu as perdas do leite nas indústrias de laticínios provocadas pela atividade de bactérias mesofílicas fermentadoras de lactose, que acidificavam o leite não refrigerado. Entretanto, mesmo a temperatura estando a 4 °C, não ocorre o impedimento para a proliferação de micro-organismos psicrótróficos. A manutenção do leite cru em refrigeração por períodos prolongados favorece a seleção destes micro-organismos os quais representam um problema para as indústrias de laticínios (COUSIN, 1982; SANTOS e FONSECA, 2001; ARCURI, 2003).

2.4.2 Pasteurização

Seu objetivo principal é a destruição completa dos micro-organismos patógenos que em determinadas circunstâncias podem estar presentes no leite; por esta razão está legalmente estabelecido pelo Decreto nº 66.183, de 05 de fevereiro de 1970 (BRASIL, 1970), que todo o leite que será comercializado deve ser ao menos pasteurizado. A redução da carga microbiana constitui a base para os posteriores processos de transformação do leite na elaboração de queijos e garantir a conservação suficiente da maior parte dos leites de consumo (SPREER, 1991).

O sistema de pasteurização alta (HTST – *High Temperature Short Time*) oferece custo relativamente baixo dos equipamentos e possibilita a recuperação de 80-90% do calor por regeneração, tornando-se o procedimento mais rentável de pasteurização (SPREER, 1991). A tecnologia envolve um tratamento térmico do leite na faixa de temperatura de 72 a 75 °C durante 15 a 20 segundos, seguindo-se de resfriamento imediato em aparelhagem adequada até temperatura igual ou inferior a 4 °C, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002). Nestas condições de operação, a enzima fosfatase alcalina é inativada e a peroxidase não se desnatura (SPREER, 1991; BRASIL, 2002).

Na pasteurização lenta (63 °C por 30 minutos) o efeito térmico não é tão eficiente quando o número inicial de micro-organismos é elevado. O custo dos equipamentos é, em comparação com seu rendimento, muito elevado (SPREER, 1991).

A refrigeração é o processo que segue imediatamente após o tratamento térmico. O leite é refrigerado a temperaturas consideravelmente baixas em relação às de pasteurização, para assim estar situado fora da zona de perigo térmico. A temperatura final a ser escolhida deve estar em função do destino do leite o qual será refrigerado. Caso sofra tratamentos posteriores, basta ser refrigerado de 10 – 25 °C (SINGH e BENNET, 2002; SPREER, 1991).

O processo de pasteurização causa alterações no equilíbrio salino do leite. O tratamento térmico tende a diminuir a potencialidade coagulante do leite, pois ocorre uma precipitação do cálcio, antes solúvel. Uma solução para corrigir o problema é através do emprego CaCl_2 , que aumenta o teor de cálcio no leite, repondo o cálcio

insolubilizado durante a pasteurização. O CaCl_2 acelera a coagulação da caseína, reduzindo o tempo de coagulação e aumenta a firmeza do coágulo (WONG, 1988).

2.4.3 Acidificação e coagulação

A acidificação é geralmente realizada através da produção *in situ* de ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) através da fermentação da lactose por bactérias lácticas. Inicialmente, o propósito da microbiota endógena do leite era a produção de ácido, mas uma vez que esta microbiota tornou-se variável, a taxa e extensão de acidificação também mudaram, resultando em queijos de qualidade duvidosa (FOX *et al.*, 2000).

O queijo minas pode ser produzido industrialmente através de três processos diferentes: o método tradicional que leva a introdução de uma cultura láctica, a acidificação direta por ácido láctico, e pelo emprego da ultrafiltração.

Processamento Tradicional

No processamento tradicional, culturas lácticas específicas são adicionadas ao leite, as quais liberam ácido láctico como subproduto de seu metabolismo. Com isto, o pH é reduzido gradativamente, o que torna o queijo menos propício ao desenvolvimento de uma microbiota indesejável e ainda, melhora a atividade coagulante e a expulsão do soro (FOX *et al.*, 2000).

O queijo minas é produzido pela coagulação enzimática do leite pasteurizado, complementado pela ação de uma cultura iniciadora mesofílica ácido láctica do tipo 'O' contendo *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. No entanto, o uso desta cultura pode causar uma acidificação excessiva do queijo durante o armazenamento (BURITI *et al.*, 2005a).

Culturas iniciadoras contribuem ao desenvolvimento de aroma e sabor durante o armazenamento, por meio do metabolismo de carboidrato, proteólise e, em menor grau, a lipólise (CANDIOTI *et al.*, 2002). A proteólise é a mais complexa

das três reações durante o armazenamento do queijo e é provavelmente a mais importante para o desenvolvimento de sabor, aroma e textura (BURITI *et al.*, 2005b).

Processo da acidificação direta

O processo de acidificação direta surgiu como substituto da adição de culturas lácticas por meio do emprego de ácido láctico. Neste caso, o ácido que seria produzido pelas bactérias é adicionado diretamente durante a fabricação do queijo Minas Frescal, reduzindo o tempo necessário para o produto atingir determinado pH e evitando que o produto se torne tão ácido após dias de armazenamento. Todavia, o uso de acidificação direta resulta em queijos com alto pH (em relação ao uso de culturas lácticas) e umidade em torno de 50 – 70 % (m/m), os quais são mais susceptíveis a deterioração por micro-organismos contaminantes por não existir uma microbiota iniciadora que predomine (FURTADO, 2005)

A técnica de acidificação direta resulta em maior rendimento dos queijos e reduz alterações físico-químicas durante a vida de prateleira. Outro fator importante é a proximidade do pH do valor de 4,6 – o ponto isoelétrico da caseína -, ponto onde ocorre a precipitação de proteínas, que leva a um aumento significativo da firmeza do queijo. Este fenômeno pode ser observado pela na produção de queijos de coagulação ácida, nos quais não existe enzima como agente coagulante, mas sim o ácido adicionado ou produzido por bactérias (CARVALHO *et al.*, 2007).

Porém, o uso do processo de acidificação direta pode produzir queijos com maior susceptibilidade de proliferação de bactérias deteriorantes e patogênicas, pois as culturas iniciadoras garantem uma produção permanente de ácido láctico e, em alguns casos, a produção de compostos antimicrobianos (BURITI *et al.*, 2005b; NALDINI *et al.*, 2009). Além de acidificação, as bactérias iniciadoras realizam funções muito importantes no amadurecimento do queijo (maturação), e por isso a acidificação direta é utilizada principalmente para as variedades de queijo onde a textura é mais importante do que a produção de sabor e aroma (FOX *et al.*, 2000).

2.4.4 Coagulação

Segundo Spreer (1991), o passo essencial para a fabricação de todas as variedades de queijos envolve a coagulação das caseínas do sistema proteico do leite para formar um gel que aprisiona a gordura, quando presente. A coagulação pode ser alcançada por:

- Proteólise limitada por proteinases selecionadas (coalhos);
- Acidificação a pH 4,6;
- A acidificação a pH superior a 4,6 (aproximadamente 5,2) em combinação com aquecimento (aproximadamente 90 °C).

A coagulação por acidificação envolve a adição de ácido ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,6). Neste pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam. Esse método fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático (PERRY, 2004).

A coagulação da caseína presente no leite envolve a utilização de coalho enzimático. Os primeiros coalhos utilizados foram de origem animal, proveniente do estômago de ruminantes, principalmente bezerros e porcos. Outro coalho muito utilizado é de origem microbiana (quimosina), que possui características bastante semelhantes aos de origem animal (PERRY, 2004).

A grande maioria das variedades de queijos (que representam cerca de 75 % do total da produção) são produzidas por coagulação enzimática, mas algumas variedades de coagulação ácida, tais como Quarg e queijo Cottage, são da maior importância. Os queijos de coagulação ácida com tratamento térmico são de relativamente menor importância. Eles são geralmente produzidos com soro de leite ou uma mistura de soro e leite desnatado, sendo que provavelmente surgiu como um instrumento para a recuperação das proteínas do soro que seriam perdidas. Algumas variedades de queijos onde se utiliza tal processo são a ricota (Itália) e afins, como o anari (Chipre) e manouri (Grécia) (FOX *et al.*, 2000).

A caseína contém grande quantidade de aminoácidos essenciais, assim como também uma considerável quantidade de minerais e de biocatalisadores (SPREER, 1991). Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a

textura do queijo. O soro representa de 85 – 90 % do volume de leite utilizado na fabricação de queijos, retendo aproximadamente 55 % dos nutrientes do leite. Grande parte deste é eliminada durante o processo de fabricação do queijo e aproveitada como matéria-prima na fabricação de produtos como iogurtes e ricota, dentre outros (PERRY, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2001).

A coalhada enzimática ou ácida são géis bastante estáveis se mantidos em descanso, mas ao serem cortados ou partidos, eles rapidamente sofrem sinérese, expulsando soro. A taxa e extensão da sinérese são influenciadas pela composição do leite, especialmente as concentrações de Ca^{2+} e caseína; o pH do soro; a temperatura de cozimento; a taxa de mexedura da mistura coalhada-soro; e o tempo (FOX *et al.*, 2000).

A enzima atua hidrolisando ligações peptídicas da κ -caseína, transformando-a em para-caseína, que precipita em presença de íons Ca^{+2} formando, então, a coalhada. Durante a formação da coalhada pode ser adicionado o CaCl_2 , aumentando assim o teor de íons Ca^{+2} no leite, acelerando a coagulação da caseína e ajudando a firmar o coágulo (PERRY, 2004).

A composição do queijo pronto é fortemente determinada pelo grau de sinérese. Em menor ou maior grau, ela é uma etapa primordial de diferenciação entre as variedades de queijo, embora o tipo e composição do leite, a quantidade e tipo cultura iniciadora, e a quantidade e tipo de enzima também serem significativos (FOX *et al.*, 2000).

2.4.5 Salga

Grande parte das variedades de queijo é salgada por imersão em salmoura ou pela aplicação de sal seco na superfície. A salga pode ser feita também diretamente no leite ou na massa previamente dessorada. A salga é a última etapa de produção, ela promove a sinérese de modo sutil, portanto, não é um método satisfatório para o controle da umidade da coalhada. A umidade pode ser melhor

assegurada garantindo que o grau de acidificação, aquecimento, e mexedura no tanque sejam adequados para a variedade do queijo. (FOX *et al.*, 2000).

2.5 MICROBIOLOGIA DO QUEIJO MINAS FRESCAL

2.5.1 Contaminação de Produtos Lácteos

Segundo Spreer (1991), o leite e derivados constituem um meio nutritivo ideal para os micro-organismos, pois contém todos os nutrientes necessários para seu crescimento. Conforme sua ação e as correspondentes transformações tecnológicas que provocam no leite e nos produtos lácteos, pode-se estabelecer a classificação dos micro-organismos em três grupos:

- a) Micro-organismos benéficos para a indústria: têm uma grande importância na indústria leiteira já que são necessários para as fermentações, a formação de aroma e de gases, assim como para precipitar proteínas na elaboração de queijos.
- b) Micro-organismos prejudiciais para a indústria: provocam transformações indesejadas nos processos tecnológicos, por exemplo, coagulação do leite, variações de cor e de sabor e degradação das proteínas.
- c) Micro-organismos causadores de enfermidades (patógenos): podem originar nos animais e seres humanos doenças pela produção de toxinas.

Fatores ambientais como a temperatura, o pH e o oxigênio do ar – além dos nutrientes e da água como solvente – são de extrema importância para o crescimento, a reprodução e o metabolismo microbiano (SPREER, 1991).

Infecções e intoxicações alimentares estão se tornando cada vez mais comuns em todo o mundo. Tais problemas de saúde pública e o crescimento microbiano em alimentos podem ser minimizados pela escolha cuidadosa das matérias-primas, produção correta, e armazenagem adequada. O controle da carga

microbiológica e a determinação do tipo de micro-organismo em particular são de extrema importância para laticínios (IRKIN, 2010).

Os queijos frescos de coalho possuem tipicamente um alto teor de umidade, baixa acidez e textura macia. Estas características favorecem o desenvolvimento de bactérias que, em adição da vida de prateleira limitante deste produto, pode torná-lo perigoso à saúde dos consumidores (NALDINI *et al.*, 2009). Desta forma, as características do Minas Frescal aumentam o risco potencial da incidência de bactérias patogênicas, que estão frequentemente associadas a surtos de doenças alimentares. Contaminações por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* podem ser encontradas neste produto (CARVALHO *et al.*, 2007; LITTLE *et al.* 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Produtos lácteos têm, por vezes, representado um importante veículo de infecção gastrointestinal no mundo. Muitas espécies enteropatogênicas foram encontradas em leite e queijo armazenado sob temperaturas de refrigeração e consumidos sem aquecimento (ARAÚJO *et al.*, 2002). Contaminação pós-pasteurização, durante a fabricação e manipulação, em equipamentos, temperaturas irregulares durante o transporte e más condições de armazenamento podem resultar em altos níveis de micro-organismos patogênicos em queijo (BRUM, 2004; REIBNITZ *et al.* 1998).

Os tipos de organismos no leite e queijo podem ser aumentados tanto pela contaminação quanto pelo crescimento dos micro-organismos já presentes. Os métodos de produção, manipulação e manufatura devem ser muito bem delineados para evitá-los. As mais importantes fontes de contaminação são as superfícies de contato com o leite e as mãos dos trabalhadores da indústria leiteira, embora a cultura láctea iniciadora, o cloreto de cálcio, o coalho e a salmoura possam também exercer alguns efeitos sobre a qualidade do queijo (ROBINSON e TAMIME, 2002).

As contaminações microbianas são analisadas com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para grupos de micro-organismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogênicos. Os micro-organismos encontram no alimento um substrato ótimo para o desenvolvimento e até mesmo a liberação de substâncias nocivas à saúde humana (FRANCO e ALMEIDA, 1992).

2.5.2 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas são denominadas assim em função de sua preferência em utilizar lactose como fonte de carbono, transformando a lactose em ácido láctico sendo responsáveis pela acidificação “espontânea” do leite (RAPACCI e VAN DENDER, 1997). O grupo inclui seis gêneros de bactérias produtoras de ácido láctico, Gram positivas e microaerófilas: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (SILVA, 1997).

A maior parte das bactérias lácticas é destruída pelo aquecimento a 70 °C. A multiplicação de alguns destes micro-organismos é acompanhada pela liberação de enzimas proteolíticas capazes de degradar a caseína. A multiplicação desses micro-organismos pode ser minimizada resfriando-se o leite rapidamente logo após a ordenha ou pasteurizando-o imediatamente. As principais fontes de contaminação são os utensílios e equipamentos utilizados durante a ordenha e o transporte, além das práticas de higiene pessoal do ordenhador (RAPACCI e Van DENDER, 1997).

2.5.3 Micro-organismos Psicotróficos

O termo psicotróficas é dado às bactérias que crescem em temperaturas de refrigeração, ou seja, de 2 a 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento (HAYES e BOOR, 2001; ROBINSON, 2002; VARGAS, 1979). É possível encontrar diversos organismos deste tipo no leite cru, sendo que diversos gêneros têm sido isoladas do leite, incluindo *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, e *Achromobacter* (HAYES e BOOR, 2001).

Profissionais e pesquisadores da indústria leiteira reconhecem que a presença da atividade dos psicotróficos no leite cru causa um impacto tanto no aroma e qualidade quanto no rendimento da coalhada. No entanto, as boas práticas de fabricação podem ajudar a assegurar um fornecimento de leite de qualidade pela

prevenção do crescimento bacteriano e da contaminação microbiológica (CHAMBERS, 2002).

A presença dessas bactérias no leite indica contaminação ambiental. O efeito detrimental da atividade das bactérias psicrotróficas na qualidade do leite ou dos produtos derivados, é de grande significância para a indústria de laticínios. Essa atividade é decorrente da síntese, seguida pela liberação extracelular, das enzimas peptídicas e éster hidrolases (VARGAS, 1979). Entre as enzimas extracelulares termorresistentes produzidas por psicrotróficos, proteases e lipases são as que possuem maior impacto na qualidade do leite e derivados (CROMIE, 1992).

Os psicrotróficos podem multiplicar-se em leite cru, criando sabor e aroma desagradáveis e degradando os constituintes químicos do leite. Muitas enzimas termoestáveis produzidas por psicrotróficos também podem sobreviver à pasteurização e degradar o produto acabado, diminuindo a vida de prateleira dos produtos lácteos e afetando o rendimento de produtos fermentados (COUSIN, 1982).

Psicrotróficos formadores de esporo podem sobreviver à pasteurização e afetar a qualidade do leite e seus derivados. Desta forma, eles podem acabar germinando e multiplicando em condições de refrigeração à qual os produtos são armazenados (BOOR *et al.*, 1998).

As bactérias psicrotróficas que mais deterioram os produtos lácteos pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Estes micro-organismos são termosensíveis, e facilmente destruídos pela pasteurização, porém produzem enzimas extracelulares (lipases e proteases) que são termorresistentes, permanecendo no leite após a pasteurização (FOX *et al.*, 2000; MOURA, 1997).

O *Bacillus* spp. psicrotrófico sobrevive à pasteurização, limitando a vida útil do leite durante a estocagem. Alguns micro-organismos patogênicos isolados do leite são psicrotróficos, entre eles o que se destaca é a *Listeria monocytogenes* que consiste em sério problema para as indústrias de laticínios principalmente em queijo produzido com leite cru (FRANK *et al.*, 1992). Algumas espécies do grupo das bactérias coliformes são psicrotróficas e constituem 10-30% da total de coliformes isolados em leite cru a 57°C. A maior parte destes coliformes pertence ao gênero *Aerobacter* spp. (THOMAS e DRUCE, 1972).

2.6 ALTERAÇÕES QUÍMICAS DO QUEIJO

O Minas Frescal é um produto fresco, com vida-de-prateleira em torno de 20 dias (utilizando processos tradicionais). Durante o período de armazenamento refrigerado deste produto, um número de reações bioquímicas ocorre, como a proteólise e a lipólise (CUNHA *et al.*, 2006).

A proteólise provoca problemas tecnológicos como a redução no rendimento de queijos pela degradação, principalmente, da caseína (LUCEY e KELLY, 1994). É um dos eventos bioquímicos principais no desenvolvimento de sabor e aroma que ocorrem durante o armazenamento da maioria das variedades de queijo. Ela contribui na formação de sabor amargo do queijo devido à produção de peptídeos e aminoácidos livres, provenientes da degradação da caseína (COUSIN, 1982; FOX *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2001; ANTUNES, 2006).

A proteólise do queijo envolve a ação integrada de enzimas proteolíticas, como a plasmina (proveniente do leite) e quimosina residuais, sobre a caseína intacta da coalhada (primeira fase da maturação) seguida da quebra de grandes peptídeos e oligopeptídeos em pequenos peptídeos e aminoácidos pela proteinase celular e a peptidase das bactérias ácido-láticas (MARTÍNEZ-CUESTA *et al.*, 2001).

Existem várias esterases que podem hidrolisar ésteres de ácidos graxos no leite. Mas a principal enzima lipolítica do leite de vaca é a lipoproteína lipase, que libera ácidos graxos dos tri e diglicerídeos e é ativa somente na interface óleo-água. No leite, a lipólise provoca um sabor desagradável de ranço e sabão (COUSIN, 1982; WALSTRA, WOUTERS E GEURTS, 2006).

As lipases causam sabor prejudicial de ranço ou saponificado, principalmente em queijos de longa maturação. Estes compostos podem interferir, diminuindo o desenvolvimento das culturas láticas no leite e nos queijos durante a fermentação. Elas são mais prejudiciais ao sabor que as proteases, pois enquanto as proteases são hidrossolúveis e se perdem em boa parte no soro, as lipases são lipossolúveis e permanecem ligadas à massa do queijo (COUSIN, 1982).

2.7 ACIDIFICAÇÃO POR DIÓXIDO DE CARBONO

A indústria do leite conta apenas com a refrigeração para manter a qualidade de leite cru durante armazenamento e transporte. Limitada pelo crescimento de bactérias psicrotróficas, a vida de prateleira do leite cru de boa qualidade é normalmente menor que 5 dias (LAW, 1979; COUSIN, 1982).

Segundo Hotchkiss *et al.* (2006), quando se dilui o dióxido de carbono (CO₂) em água, é formado o ácido carbônico (H₂CO₃). Nestas condições o CO₂ é instável, mantendo um equilíbrio:



Alguns trabalhos mostraram que o ajuste de pH em aproximadamente 6,0 através da carbonatação, melhora consideravelmente a estabilidade microbiológica quanto a organismos psicrotróficos (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996; SHIRAI, 2010).

As *Pseudomonas* são encontradas frequentemente no leite, sendo capazes de produzir enzimas hidrolíticas como proteinases e lipases (FOX *et al.*, 2000). A adição de dióxido de carbono em leite a 10-30 mm L⁻¹ inibe o crescimento do organismo psicrotrófico deteriorante *Pseudomonas fluorescens*, prorrogando a vida de prateleira do leite refrigerado (MUIR, 1996).

Um procedimento para evitar a proliferação de micro-organismos inclui a adição de CO₂ em leite cru refrigerado (ROBERTS e TORREY, 1988; RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996). Este é um método barato para prolongar armazenagem a frio do leite na própria fazenda. A acidificação a pH 6,2 com ajustes periódicos de pH pelo borbulhamento de gás, provou ser eficiente, estendendo a aproximadamente 12 dias o armazenamento a frio do leite cru. Faz-se necessária a degaseificação a vácuo antes da pasteurização do leite para torná-lo aceitável para o consumo em sua forma *in natura* (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996).

A inativação microbiana por CO₂ é dependente de vários parâmetros, como temperatura, pressão e umidade. Estas condições podem contribuir ou não com a efetividade do tratamento, pois afetam diretamente na difusividade do CO₂ (LIN *et*

al., 1992). Com certos limites, uma maior duração da exposição ao dióxido de carbono permite melhor redução microbiana (BALLESTRA, 1996).

Diversos autores propuseram mecanismos que levam à inibição ou retardamento da proliferação de determinados micro-organismos através do emprego de CO₂. Uma das primeiras hipóteses abordadas por autores foi se a acidificação, como consequência da carbonatação, seria a barreira para o desenvolvimento microbiano. Butler (1982) estudou o emprego de ácidos variados, comparado ao ácido carbônico na redução de grupos de micro-organismos. De acordo com os resultados obtidos, houve inibição devido aos ácidos em estudo, mas não houve o mesmo efeito bacteriostático como o do ácido carbônico.

Daniels *et al.* (1985) relacionou o CO₂ como um agente que desloca o oxigênio, substituindo-o. Desta forma os micro-organismos estariam limitados a uma atmosfera anaeróbia ou microaeróbia, sendo que quando este foi substituído por N₂, o mesmo efeito bacteriostático não ocorreu.

No trabalho de Hendricks e Hotchkiss (1997) foi estudado o efeito de atmosferas modificadas contendo CO₂ sobre o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* (aeróbio) e *Listeria monocytogenes* (anaeróbio facultativo) em solução nutritiva. Para isto foram utilizadas diferentes concentrações de O₂ (0 a 40 %) e CO₂ (0 a 80 %), em balanço com N₂ numa atmosfera que fluía constantemente. De acordo com os resultados obtidos, o CO₂ retardou o crescimento destes micro-organismos mesmo quando a quantidade de O₂ na atmosfera foi mantida constante (20%), sendo que o meio de cultura não sofreu alteração de pH.

O dióxido de carbono é altamente solúvel em materiais hidrofóbicos, como lipídios, e ao se aproximar da superfície da célula bacteriana, o CO₂ aquoso pode se difundir para o interior da membrana celular e acumular dentro da camada lipofílica interna (fosfolipídeos) (STRETTON *et al.*, 1996; ISENSCHMID *et al.*, 1995). Através do emprego de altas pressões (de 6 a 30 MPa) o poder penetrante do CO₂ nas células microbianas - cerca de 30 vezes mais rápido que o oxigênio - na fase lipídica, pode causar uma desordem estrutural e funcional na membrana celular devido a uma perda da ordem da cadeia lipídica. Isto acarreta o aumento da fluidez e, portanto, da permeabilidade da membrana (HONG e PYUN 2001; ISENSCHMID *et al.*, 1995; SEARS e EISENBERG, 1961).

De acordo com Hutkins e Nannen (1993) e Wolfe (1980), com o aumento da permeabilidade da membrana, o CO₂ pressurizado pode facilmente penetrá-la e se acumular no citoplasma das células bacterianas. A fim de manter um pH citoplasmático próximo do constante (que é essencial para a viabilidade e atividade celular ideal), as concentrações de CO₂ aquoso e HCO₃⁻ estão, em primeira instância, controladas pelo pH interno como resultado da homeostase celular. Se muito CO₂ dissolvido entra no citoplasma, as células podem ser incapazes de expulsar todos os H⁺ e o pH interno começará a diminuir. Se este diminuir muito, a célula desidrata e sua permeabilidade a íons é aumentada, o que desbalanceia o meio intracelular. Além disso, como resultado do pH externo menor, as células também podem ser incapazes de manter o gradiente de pH resultante.

Muitos aspectos da estrutura e função celulares são influenciados pelo pH interno, sendo que a atividade catalítica das enzimas é especialmente sensível. O CO₂ intracelular pode estimular "ciclos fúteis"; reações de carboxilação e descarboxilação, podem não dar retornos positivos, resultando em um gasto energético desnecessário e perda de ATP. Assim, o CO₂ pode interferir diretamente sobre os processos enzimáticos necessários dentro das células (STRETTON *et al.*, 1996). Além disso, toda atividade enzimática é máxima num determinado pH ótimo, sendo que esta atividade diminui drasticamente quando pende para ambos os lados do ótimo. Assim, a redução do pH interno pode causar a inibição e/ou inativação de enzimas essenciais para processos metabólicos e reguladores, tais como a glicólise, transporte de aminoácidos e peptídeos, transporte ativo de íons e translocação de prótons (HUTKINS E NANNEN, 1993).

Em leite inoculado com espécies psicrótróficas de *Pseudomonas* e *Enterobacter*, a presença de dióxido de carbono resultou em menor número relativo de bactérias em etapas pós-processamento como consequência do aumento da fase lag bacteriana e redução da taxa de crescimento bacteriano, quando armazenado em 6,1 °C. A embalagem contribuiu para esses efeitos. A adição de CO₂ a 8,7 mM e 21,5 mM nos produtos embalados prorrogou o prazo necessário para a contagem bacteriana chegar a 10⁶ UFC.mL⁻¹ de 6,4 dias (controle) para 9,7 e 13,4 dias, respectivamente (HOTCHKISS *et al.*, 1999).

Ruas-Madiedo *et al.* (1998) utilizaram acidificação por CO₂ a pH 6,2 para a produção do queijo espanhol Afuega'l Pitu. Calvo *et al.* (1993) verificaram que a

acidificação do leite cru por CO₂ na faixa de pH 6,0 – 6,5 reduziram as contagens de bactérias psicrotróficas, melhorando o rendimento dos queijos.

2.8 PROPRIEDADES TEXTURAIIS

Assim como a boa parte dos alimentos sólidos e semi-sólidos, os queijos em geral são materiais viscoelásticos. As propriedades reológicas dos queijos dependem de sua composição, microestrutura, do estado físico-químico de seus componentes, da força das interações entre os elementos estruturais que o compõe e de sua macroestrutura (FOX *et al.*, 2000).

As propriedades físicas do queijo (corpo/textura, derretimento/extensão, e cor) são influenciadas pela composição inicial do leite, processos de fabricação, e condições de maturação. Duas das propriedades mais importantes que influenciam estas propriedades são as condições das partículas de caseína no queijo (por exemplo, interações entre as moléculas, bem como a quantidade de Ca associado com estas partículas) e a extensão da proteólise (LUCEY, 2003). De acordo com Lawrence *et al.* (1987), a textura de queijos é dependente da relação caseína intacta com a umidade e do pH.

A utilização de métodos físicos para avaliação da textura de queijos em substituição à análise sensorial são de grande interesse por eliminar a subjetividade deste método. De acordo com Gunasekaran e Ak (2003) e Van Vliet (1991), no estudo de textura instrumental, é comum utilizar-se de um texturômetro para a determinar-se o perfil de textura (*TPA – Texture Profile Analysis*). A análise de TPA vem sendo empregada numa grande variedade e amostras de queijos; no entanto, ela possui elementos de arbitrariedade em seu delineamento, que vão variar pelo tipo, tamanho e qualidades da amostra, e configurações de operação do texturômetro (POLLARD *et al.*, 2003).

Nesta avaliação, a amostra é submetida a dois ciclos de compressão, sendo que os dados obtidos resulta num gráfico onde as curvas geradas levam à determinação de atributos de interesse, são eles:

- Dureza (*Hardness*): Força necessária para atingir determinada deformação;
- Coesividade (*Cohesiveness*): Resistência das ligações internas que compõem o corpo do produto;
- Mastigabilidade (*Chewiness*): Energia necessária para mastigar uma amostra até estar pronta para engolir;
- Elasticidade (*Springiness*): é a velocidade com que um material deformado volta a sua condição original após ser retirada a força deformante;
- Adesividade (*Adhesiveness*): é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor a forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este;
- Gomosidade (*Gumminess*): é a energia requerida para se desintegrar um alimento semi sólido ao ponto de ser engolido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR.

Os equipamentos utilizados constam comumente em laboratórios de análises de alimentos e pequenas unidades produtoras de derivados lácteos.

O leite cru foi coletado da Fazenda Experimental da UFPR, localizada na cidade de Pinhais – PR. O leite foi obtido por meio de ordenha mecânica, respeitando-se as boas práticas de fabricação. Após ordenhado foi imediatamente resfriado em tanque de expansão provido de sistema de agitação e controle de temperatura.

No momento do recebimento do leite, foi realizada imediatamente a pasteurização, sendo que uma alíquota de 200 mL foi reservada para a caracterização físico-química. A pasteurização foi realizada em processo de batelada sob condições controladas (item 3.1), seguida da carbonatação do leite com CO₂ (item 3.2).

A partir do leite pasteurizado padrão, e o leite acidificado, foram produzidos queijos Minas Frescal. Para avaliação do CO₂ como agente bacteriostático, o leite pasteurizado padrão foi submetido a uma acidificação por ácido láctico até atingir o mesmo pH do leite carbonatado.

O armazenamento dos queijos foi feito a 7 °C durante um período de 20 dias (FURTADO e LOURENÇO-NETO, 2006). O processo resumido está exemplificado por meio da Figura 1.

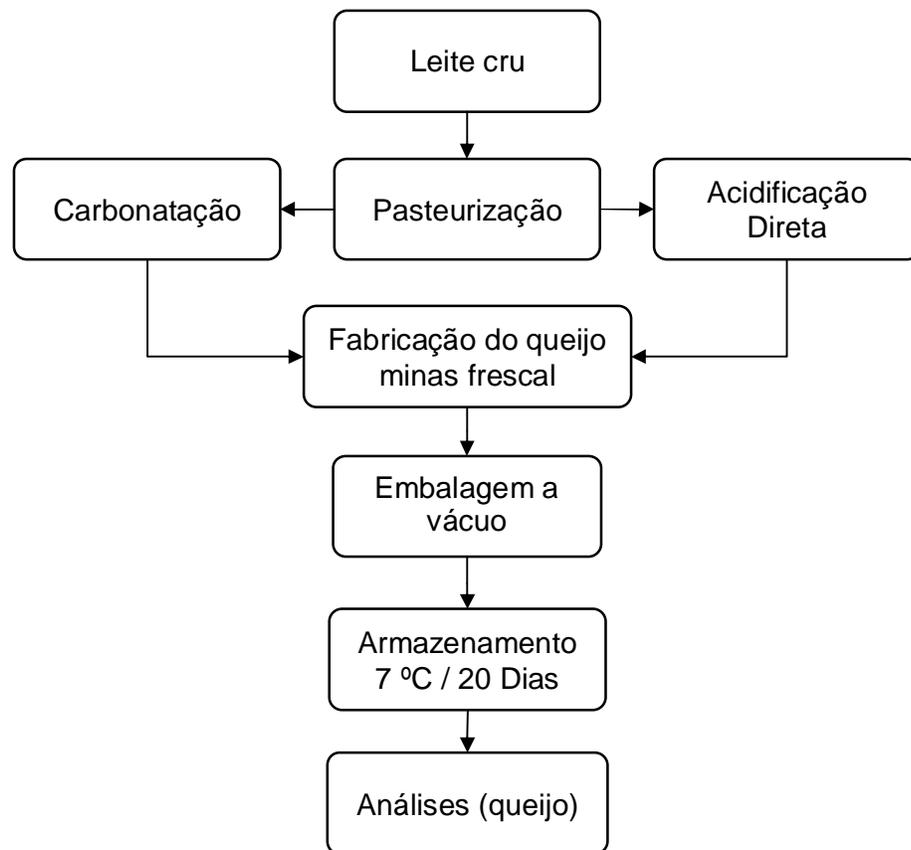


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO: CARBONATAÇÃO E PROCESSAMENTO DO LEITE

3.1 FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

A Figura 2 apresenta o fluxograma com as etapas de fabricação do queijo Minas Frescal, sendo que a tecnologia empregada está descrita nos itens a seguir.

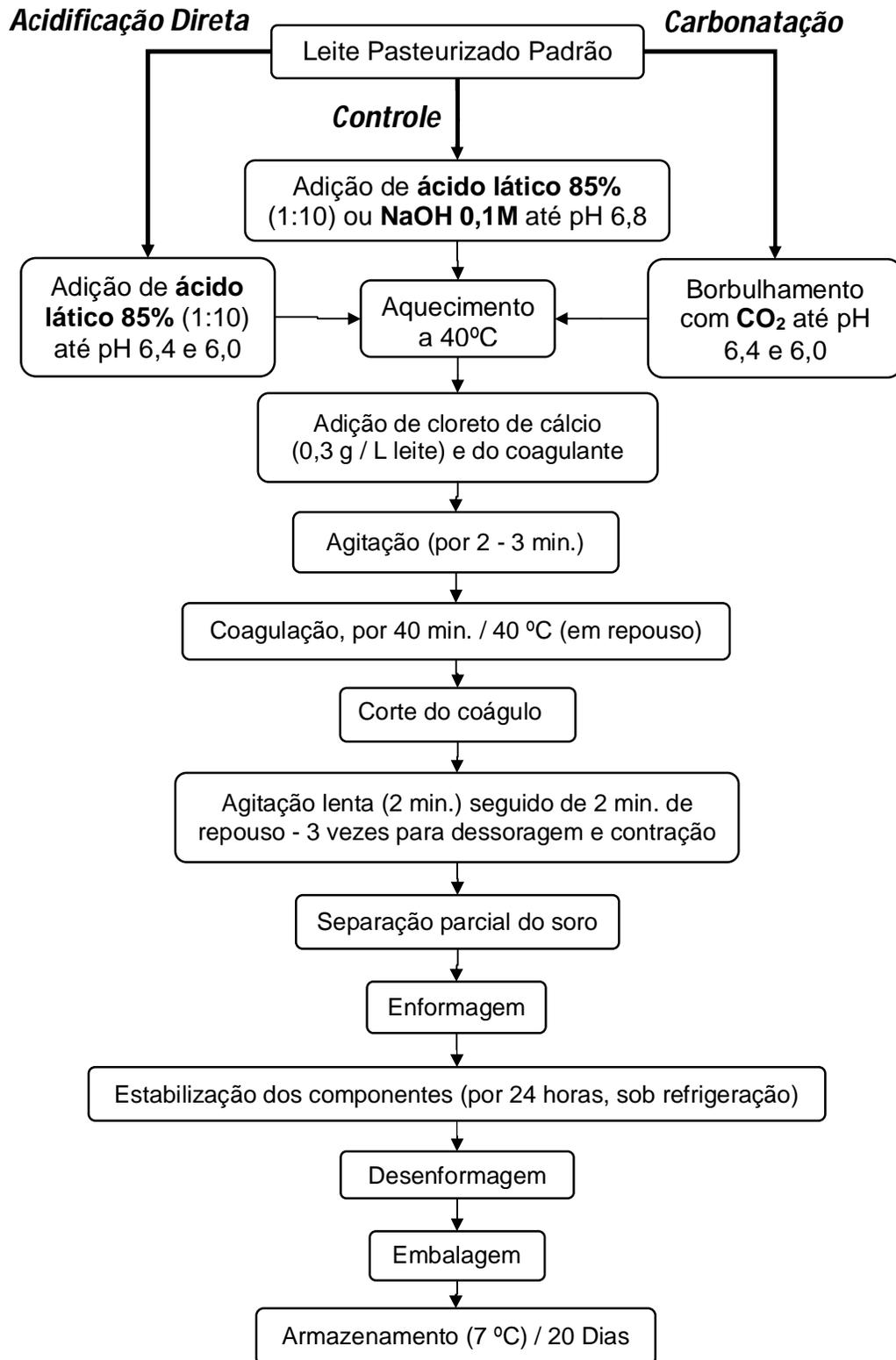


FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

FONTE: DORNELLAS, 1997

Pasteurização

A pasteurização do leite foi realizada em tacho de aço inoxidável com área interna de 15 cm de diâmetro x 30 cm de altura. Os tachos foram submersos em um recipiente maior, contendo água em altura suficiente a cobrir o mesmo nível do leite, que foi colocado sob aquecimento.

De modo a assegurar maior homogeneidade térmica, o leite foi submetido à agitação manual com auxílio de uma colher de aço inoxidável. A leitura da temperatura foi realizada mediante introdução de um termopar digital (PT 100) no leite. Para a termolização de microrganismos, o leite foi aquecido gradualmente até 72 °C e mantido a 15 s.

O leite foi imediatamente resfriado em banho, até atingir temperatura entre 4 e 7 °C. O leite foi particionado e destinado à fabricação do Minas Frescal controle, acidificado por ácido láctico e acidificado por CO₂.

Foram utilizados os testes indicadores da presença de fosfatase e peroxidase para verificar a eficiência da pasteurização. A fosfatase é inativada quando submetida ao binômio tempo/temperatura da pasteurização (61 °C / 30 min. ou mesmo 72 °C / 15 s.). A peroxidase é inativada a temperaturas maiores que 80 °C. Somente foi utilizado leite que atendeu resultado negativo para fosfatase e positivo para o teste de peroxidase.

Acidificação

1. Minas Frescal Padrão

O leite para a produção do Minas Frescal controle recebeu, após a pasteurização, ácido láctico 85 % (diluído a 1:10) ou NaOH 0,1 M em quantidade suficiente até atingir o nível de pH 6,8. Para o tratamento por acidificação direta foram utilizadas 2 faixas de pH: 6,4 e 6,0. O pH foi medido através do método potenciométrico com o pHmetro MetroHm 826, acoplado com um sensor de H⁺ próprio para meio proteicos (MetroHm 6.0235.200). A escolha da faixa de pH se deu dentro de valores que podem ser utilizados na produção de Minas Frescal, obedecendo as dificuldades de baixar o pH a valores menores devido às condições

da operação de carbonatação (temperatura em aproximadamente 5 °C e pressão atmosférica).

2. Minas Frescal Carbonatado

O dióxido de carbono utilizado na acidificação do leite foi adquirido da White Martins, acondicionado na sua forma liquefeita em cilindro de aço, tipo T, com capacidade para 33 m³ e pressão de vapor de 58,3 kgf cm⁻². O grau analítico de pureza deste gás foi de 99,99 % na fase líquida.

Para a produção de queijo carbonatado o leite foi borbulhado com CO₂ até pH 6,4 e 6,0. Logo após a acidificação estar completa, o leite carbonatado, bem como o leite acidificado por ácido láctico, receberam os mesmos tratamentos quanto sua transformação em queijo.

Coagulação

O leite foi aquecido a 40 °C. Foram dissolvidos 0,3 g CaCl₂ / L leite (Farmanilquima, grau alimentício) em 100 mL de água destilada. Nesta mesma solução, foi adicionado 8 mL / L leite (coagulante Estrella à base de quimosina, Christian-Hansen). A solução de CaCl₂ e coalho foi despejada no leite e a mistura foi agitada durante 2 a 3 minutos.

Após o término da mistura o tacho foi tampado e aguardou-se 40 min. / 40 °C para a formação de uma massa firme e gelatinosa. Foi feito o corte da coalhada em cubos de 2 cm com o auxílio de uma faca. Isto possibilita que o soro seja drenado dos pedaços individuais de coalhada.

Procedeu-se uma agitação lenta e cuidadosa por 2 min. intercalada por 2 min. de repouso. Este processo foi realizado por 3 vezes, para uma boa dessoragem e contração da massa.

Enformagem

Foi retirada uma parcela de soro correspondente a 1/5 do total de leite utilizado. Utilizando uma escumadeira os cubos de massa coalhada foram retirados cuidadosamente e dispostos numa forma perfurada composta de 9 divisórias de tamanho 6 x 6 x 10 cm, formando 9 pequenos queijos. Esta forma foi armazenada sob refrigeração (4 °C / 24 horas) para a dessoragem do queijo. Após 24 horas os queijos foram retirados das formas e pesados.

Salga e embalagem

Foi realizada a salga seca (salga por superfície). Cada queijo foi salgado com o correspondente a 2 % de NaCl em massa. O sal foi esfregado cuidadosamente pela superfície do queijo, o qual é absorvido internamente durante o armazenamento. Foi descartada a possibilidade de salga diretamente no leite, pois em testes preliminares verificou-se um grande desprendimento de gás, o que é indesejável, já que neste trabalho pretendeu-se manter o CO₂ o máximo possível no queijo. Esta perda de gás resultou em aumento do pH devido ao equilíbrio entre o ácido carbônico e o CO₂, além de resultar em uma coalhada porosa e resistente ao corte. A salga direta ao leite gera produtos mais homogêneos, mas com grande perda de sal no soro, que é, geralmente, utilizado pelas indústrias em sua forma não salgada. A embalagem utilizada foi do tipo termoselável, dentro das quais o queijo foi submetido a vácuo utilizando aparelho VC999 K3 / CH 9100 Herisau. Os queijos foram então armazenados durante 20 dias a 7 °C.

3.2 CARBONATAÇÃO

A carbonatação foi realizada no Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA) da UFPR. O processo de foi realizado segundo Shirai (2010) com pequenas modificações. A Figura 3 exemplifica o sistema utilizado.

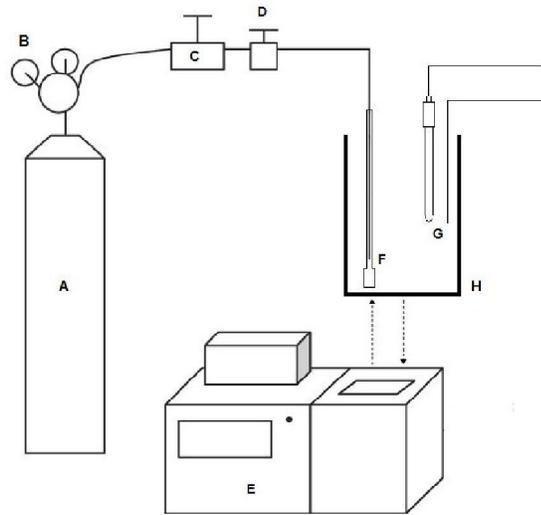


FIGURA 3 - SISTEMA DE ACIDIFICAÇÃO DO LEITE COM DIÓXIDO DE CARBONO
 FONTE: SHIRAI (2010)

Neste sistema, o gás fluiu através de um canal metálico próprio para este fim. Na saída do cilindro (A) existia uma válvula reguladora de vazão (B), dotada de medidor de pressão do cilindro e da saída (B). Em linha existia uma válvula esfera que permitiu a passagem ou bloqueio do CO_2 (C) e uma válvula agulha (D) que permitiu maior precisão na regulação da vazão.

Ao final da linha, foi acoplado com o auxílio de uma rolha perfurada, um dispersor de gás em líquido do tipo L (F), contendo uma placa de vidro sinterizado com porosidade média de $35 \mu\text{m}$. O vidro poroso permite que o gás seja disseminado como pequenas bolhas, de forma mais homogênea pelo leite. Este procedimento faz com que haja um aumento da superfície de contato e maior interação gás-líquido, permitindo uma maior absorção e taxa reativa, utiliza-se menos gás e o decréscimo de pH acontece num tempo mais curto.

O recipiente contendo leite (H) foi imerso em banho ultra-termostático (SOLAB SL-152/6) controlado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. A baixa temperatura do leite foi adotada tanto para manutenção da baixa contagem microbológica, quanto por permitir maior solubilidade do gás no meio líquido. Durante este processo, o pH foi monitorado através da introdução de um eletrodo de vidro (G) específico para amostras contendo proteína (Metrohm 6.0235.200) conectado ao pHmetro portátil digital (MetroHm 826). O borbulhamento com CO_2 foi realizado a pressão ambiente e em

sistema aberto até o momento em que o leite atingiu o pH desejado para o processo. Após a carbonatação o leite foi processado imediatamente para a produção dos queijos.

De modo a proporcionar maior permanência possível do CO₂ disperso no queijo, não foi realizada a degaseificação do leite e nem do queijo.

3.2.3 Análises físico-químicas

3.2.3.1 Leite cru

pH

O pH do leite foi determinado pelo método potenciométrico conforme Brasil (2003). O pHmetro utilizado foi um modelo portátil marca Metrohm, modelo 826 com eletrodo MetroHm 6.0235.200.

Composição e Contagem de Células Somáticas

Teores de gordura, sólidos totais, proteína e lactose do leite cru, foram determinados usando a técnica de absorção em infravermelho por meio de um analisador de leite Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, EUA). A contagem de células somáticas (CCS) foi determinada pelo equipamento de citometria de fluxo Somacount 500 (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, EUA). Todas as amostras para composição do leite e contagem de células somáticas foram determinadas em triplicata. As amostras do leite cru coletado foram preservadas com o uso de Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) até o momento da análise, utilizando método de Horst (2001).

Testes Enzimáticos

Foram realizados, para as amostras de leite pasteurizado, os testes de fosfatase alcalina e peroxidase a fim de assegurar a eficiência da pasteurização. Para estes testes, foram utilizados os kits de fosfatase alcalina e peroxidase em tiras (específico para leite) da marca Laborclin.

3.2.3.2 Queijo Minas Frescal

Umidade

A umidade foi determinada por gravimetria, através da secagem de aproximadamente 10 g de amostra em estufa a 105 °C por 24h ou até peso constante, segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

Acidez Titulável

A acidez titulável do queijo foi determinado através de metodologia padrão da AOAC (CUNNIFF, 1995), na qual o queijo foi ralado e misturado com água (40 °C), a solução foi filtrada e então titulada com NaOH 0,1 M. O resultado foi expresso em % de ácido láctico (%AL) segundo a Equação 1.

$$\%AL (g/g) = \frac{V \times F \times M \times MM_{AL}}{10 \times W \times n} \quad (1)$$

Sendo:

V = volume de NaOH gasto na titulação (mL)

M = molaridade da solução de NaOH

W = massa da amostra (g)

MM_{AL} = Massa Molar de ácido láctico (g mol⁻¹)

n = número de hidrogênios ionizáveis

F = fator de correção para a solução de NaOH.

Como os resultados são expressos em porcentagem de ácido láctico, a acidez dos queijos carbonatados foi encontrada subtraindo o valor da acidez do queijo Controle e corrigindo o restante em porcentagem de ácido carbônico. Isto foi feito usando a Equação 2, que exprime a acidez em % de ácido orgânico:

$$\% \text{Ácido Carbônico} = (\%AL_{CO_2} - \%AL_{Controle}) \times \frac{MM_{AC} \times n_{AL}}{MM_{AL} \times n_{AC}} \quad (2)$$

Sendo:

$\%AL_{CO_2}$ = amostra carbonatada titulada como % de ácido láctico

$\%AL_{Controle}$ = amostra Controle titulada como ácido láctico (%)

n_{AL} = número de hidrogênios ionizáveis do ácido láctico = 1

n_{AC} = número de hidrogênios ionizáveis do ácido carbônico = 2

Desta forma, presume-se que os ácidos em menor quantidade são quantificados como ácido láctico, sendo que o ácido carbônico é quantificado como puro. Estes valores são somados e tratados como % de ácidos orgânicos. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

pH

O pH dos queijos foi determinado por método potenciométrico (Metrohm 826 com eletrodo MetroHm 6.0235.200), com a inserção do eletrodo diretamente na amostra a ser analisada.

Análise de Perfil de Textura

O comportamento reológico dos queijos foi avaliado após 5 dias de armazenamento refrigerado, através de Análise de Perfil de Textura (TPA). As análises foram realizadas em um texturômetro Brookfield CT3, ajustado com uma célula de carga de 25 kg.

O preparo das amostras foi realizado segundo Cunha (2002) com modificações. Para a análise dos queijos foram retirados cilindros de 15 mm diâmetro x 25 mm altura, não sendo utilizados o centro e as bordas. Estas amostras foram então acondicionadas em recipiente plástico tampado e com gelo, de modo que a temperatura interna ficou em 10 °C e o gelo não entrou em contato com os queijos. As amostras permaneceram por 30 minutos neste recipiente antes do início dos testes. Os cilindros foram comprimidos por um cilindro de acrílico (sonda TA 11/1000 padrão AOAC) de 25,4 mm de diâmetro por 35 mm de comprimento, com massa de 21 g. O instrumento foi operado por meio do software TexturePro CT V1.1 Build 7 (Brookfield Eng. Labs, Inc.), a uma velocidade de sonda de 0,5 mm.s⁻¹ até uma deformação final de 35 %.

3.2.4 Análises Microbiológicas

A efetividade do controle microbiológico foi verificada pela diferença entre a contagem microbiana da amostra controle (Minas Frescal pH 6,8) e a contagem microbiológica das variações (acidificação direta e carbonatação) em intervalos de 4 dias, até completar 20 dias de estocagem. Os resultados de todas as análises foram expressos em log UFC.g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por grama de queijo).

3.2.4.1 Contagem total de psicotróficos

O método utilizado foi o de plaqueamento em superfície de Agar Padrão para Contagem – PCA (marca HIMEDIA) (SILVA *et al.*, 1997). Neste, alíquotas de diluições seriadas da amostra são espalhadas sobre o meio de cultura, sendo incubadas a 7 °C por 10 dias.

3.2.4.2 Contagem de psicrotróficos proteolíticos

Foi determinado em Agar para contagem padrão – PCA (marca HIMEDIA) suplementado com 10% de leite em pó desnatado, por meio do método de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias (FRANK *et al.*, 1992). As colônias características de bactérias proteolíticas apresentam halos translúcidos, que resultam da hidrólise da caseína.

3.2.4.3 Contagem de psicrotróficos lipolíticos

Para o crescimento de micro-organismos lipolíticos, foi realizado um plaqueamento em superfície de ágar base tributirina (marca HIMEDIA) adicionado da gordura tributirina (Sigma) com incubação a 7 °C por 10 dias (FRANK *et al.*, 1992). O meio de cultura foi elaborado da seguinte forma: após a fusão do agar, foi adicionado 1% de tributirina e a mistura foi submetida a agitação mecânica por meio de liquidificador por 3 minutos (DAGOSTIN *et al.*, 2007). Desta forma conseguiu-se uma melhor homogeneização do meio com a tributirina. Realizou-se então autoclavagem a 121 °C por 15 min. As colônias características de bactérias lipolíticas apresentam halos translúcidos em virtude da hidrólise da tributirina.

3.2.4.4 Contagem de bactérias lácticas

Para a enumeração de bactérias lácticas das amostras, foi utilizado o meio de enriquecimento Ágar de Man, Rogosa & Sharpe - Ágar MRS (marca HIMEDIA). A amostra foi plaqueada em profundidade, sendo realizado um recobrimento da superfície do meio, como alternativa de criar uma atmosfera microaerófila (SILVA *et al.*, 1997).

3.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental para as amostras foi inteiramente casualizado em blocos, sendo que os dados foram submetidos à análise de variância do programa Statistica versão 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK), e as diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. O fator estudado foi o pH do leite para fabricação do queijo, utilizando dois tratamentos: ácido láctico e carbonatação, com três níveis de variação (6,8, 6,4 e 6,0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU

A caracterização físico-química do leite cru foi realizada com o intuito de verificar se o leite utilizado estava dentro dos padrões aceitáveis para a produção do queijo Minas Frescal. Foi necessário realizar três coletas de leite para a fabricação dos queijos, respeitando o tempo necessário para realização de cada análise. Os queijos produzidos por leite da Coleta 1 foi utilizado nas análises de psicrotróficos totais e bactérias lácticas; os queijos da Coleta 2 foram destinados às análises de psicrotróficos proteolíticos e lipolíticos; e para a Coleta 3 foram realizadas análises de pH, umidade, acidez e perfil de textura. As análises foram realizadas em triplicata, sendo que os resultados (expressos em % mássica) desta caracterização encontram-se na Tabela 1. Nesta mesma tabela encontram-se os requisitos físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº51 de 2002 do MAPA (BRASIL, 2002). Também nesta legislação encontra-se a quantidade máxima (75×10^4 células.mL⁻¹ leite) de células somáticas permitidas no leite cru. Na análise de células somáticas as Coletas 1, 2 e 3 obteve-se valores dentro da faixa permitida, correspondendo a $1,2 \times 10^4$, $54,3 \times 10^4$ e $39,9 \times 10^4$ células.mL⁻¹ leite, respectivamente.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE CRU

Análise	Coleta 1 (%)	Coleta 2 (%)	Coleta 3 (%)	Padrões da legislação (%)*
Proteína	3,56 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,37 ± 0,04	Mín. 2,9
Gordura	1,27 ± 0,01	4,55 ± 0,02	3,90 ± 0,01	Mín. 3,0
Lactose	4,42 ± 0,01	4,32 ± 0,01	4,03 ± 0,01	-
Sólidos Totais	10,23 ± 0,02	13,29 ± 0,02	11,98 ± 0,02	-

* BRASIL (2002)

Todos os parâmetros físico-químicos analisados encontraram-se de acordo com o estabelecido pela IN nº 51/2002 do MAPA, exceto o teor de gordura da Coleta 1. Neste caso a coleta da amostra foi realizada após o transporte, onde não houve correta homogeneização do leite. Isto provavelmente influenciou negativamente na resposta obtida (1,27 % de gordura), já que grande parte da gordura permaneceu como uma camada sobrenadante nas bombonas de transporte. De qualquer forma, este leite pôde ser aproveitado para a fabricação de queijo minas pois os requisitos para o crescimento dos micro-organismos em análise não foi afetado.

4.2 pH, UMIDADE E ACIDEZ TITULÁVEL DOS QUEIJOS

A Tabela 2 mostra o pH e acidez titulável dos queijos Controle, tratados com ácido Lático e CO₂ em diferentes tempos de armazenamento. O pH dos queijos carbonatados mostrou uma tênue diferença (diferença máxima de 0,04) no prazo de 14 dias, enquanto para os demais tratamentos houve uma diferença maior (mínima de 0,09 para o queijo ácido láctico pH 6,0, e máxima de 0,14 para o queijo controle). Este comportamento dos queijos carbonatados pode ter ocorrido devido à perda de CO₂, - o que afetaria o equilíbrio da solubilização do ácido carbônico e o gás - e a produção simultânea de ácido láctico por bactérias do ácido láctico, o que manteve a estabilidade do pH.

Foram realizadas somente análises de acidez titulável no tempo 0. Não foram feitas mais análises ao longo do armazenamento, pois os erros experimentais obtidos foram maiores que os erros provenientes da leitura de pH. Estes erros (no segundo número significativo) resultaram na igualdade entre as médias obtidas pelo teste de Tukey (95 % de confiança) para a acidez titulável. Enquanto isso, os valores da leitura de pH resultaram numa variância que influenciou apenas na terceiro número significativo, aproximando melhor a média de um valor exato. Os dados da acidez titulável foram, então, utilizados para comparação com demais autores.

Buriti *et al.*, (2005b) relataram um comportamento de pH em Minas Frescal produzido por acidificação direta que é semelhante ao dos queijos carbonatados

deste trabalho. No mesmo estudo, eles encontraram uma acidez titulável de 0,096 (% m/v) no dia 0 de armazenamento. Ruas-Madiedo *et al.* (1998) encontraram valores de 0,16 e 0,19 (% m/v) na análise de acidez titulável em leite comum e tratados com CO₂ (pH 6,2) no dia 0 dia, logo após a pasteurização.

TABELA 2 – PH DOS QUEIJOS DURANTE ARMAZENAMENTO

Tratamentos	Acidez Titulável (% m/m)		pH			
	Tempo (dias)					
	0	0	7	14	20	
Controle	0,097 ± 0,017 ^a	6,68 ± 0,02 ^a	6,62 ± 0,01 ^a	6,54 ± 0,02 ^a	6,25 ± 0,03 ^a	
Ácido Lático pH 6,4	0,114 ± 0,028 ^a	6,51 ± 0,02 ^b	6,48 ± 0,02 ^b	6,40 ± 0,03 ^{bc}	6,18 ± 0,05 ^{ab}	
Ácido Lático pH 6,0	0,142 ± 0,022 ^a	6,26 ± 0,04 ^c	6,23 ± 0,03 ^c	6,17 ± 0,03 ^d	5,91 ± 0,01 ^c	
CO ₂ pH 6,4	0,106 ± 0,017 ^a	6,53 ± 0,03 ^b	6,55 ± 0,02 ^{ab}	6,51 ± 0,03 ^{ab}	6,20 ± 0,02 ^{ab}	
CO ₂ pH 6,0	0,127 ± 0,020 ^a	6,32 ± 0,03 ^c	6,32 ± 0,03 ^c	6,30 ± 0,01 ^c	6,08 ± 0,03 ^b	

Notou-se que a umidade e o nível de pH dos queijos diminuiu com o tempo de armazenamento. Os teores de umidade variaram entre os tratamento de 64,4 a 72,3 no dia 0 e de 59,9 a 67,1 no dia 20, conforme a Tabela 3. Segundo Walstra *et al.* (2006), maior acidez e, conseqüentemente, menores níveis de pH, podem levar a um aumento na sinérese e, assim, diminuir o teor de água do queijo. Se a taxa de acidez é mantida constante por meio de medidas adicionais, um pequeno efeito sobre a umidade persiste, como por exemplo, menos de 0,1 unidade de pH.

Nascimento *et al.*, (2008) usaram culturas bacteriocinogênicas como coadjuvantes em Minas Frescal e não perceberam mudanças significativas no teor de umidade, que variaram de 65,10 a 66,15 %. Naldini *et al.*, (2009) observaram que o teor de umidade dos queijos produzidos por acidificação direta e através de cultura láctica foram 64,1 e 65,8 %, respectivamente. Buriti *et al.* (2005b) encontraram valores de umidade de 67,2 - 68,8 % no queijo Minas Frescal produzido com diferentes tipos de processos e culturas iniciadoras.

TABELA 3 – UMIDADE DOS QUEIJOS DURANTE ARMAZENAMENTO

Tratamentos	Umidade em base úmida (%)			
	Tempo (dias)			
	0	7	14	20
Controle	72,3 ± 0,3 ^a	69,7 ± 0,1 ^a	66,5 ± 0,3 ^a	67,1 ± 0,0 ^a
Ácido Láctico pH 6,4	66,4 ± 0,1 ^b	63,5 ± 0,4 ^{bc}	61,8 ± 0,1 ^b	61,2 ± 0,1 ^b
Ácido Láctico pH 6,0	64,4 ± 0,2 ^c	61,7 ± 0,1 ^c	60,3 ± 0,1 ^b	59,9 ± 0,1 ^b
CO ₂ pH 6,4	65,8 ± 0,2 ^{bc}	63,0 ± 0,6 ^{bc}	61,8 ± 0,2 ^b	61,0 ± 0,4 ^b
CO ₂ pH 6,0	66,6 ± 0,5 ^b	64,0 ± 0,1 ^b	61,1 ± 0,6 ^b	60,4 ± 0,4 ^b

4.3 MICROBIOLOGIA DOS QUEIJOS

4.3.1 Contagem de Psicotróficos Aeróbios Totais

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos nas contagens de micro-organismos psicotróficos aeróbios totais em queijos Minas Frescal em seus diferentes tratamentos (Controle, Ácido Láctico e Carbonatado) e níveis de pH (6,8, 6,4 e 6,0), sua variância e diferença pelo teste de Tukey a 95 % de confiança durante o período de armazenamento. As contagens iniciais (0 dias) dos queijos envolvendo todos os tratamentos foram em média $2,09 \pm 0,10 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Através da ANOVA a 95 % de confiança foi possível verificar que as populações iniciais de psicotróficos aeróbios não diferiram estatisticamente entre si. Desta forma foi possível concluir que não houve efeito inibitório imediato nos queijos por nenhum dos tratamentos utilizados. Este efeito ocorre quando o processo de carbonatação é realizado pelo emprego de CO₂ sob altas pressões (HONG e PYUN 2001; HUTKINS e NANNEN 1993; ISENSCHMID *et al.*, 1995). Ruas-Madiedo *et al.*, (1998) encontraram resultados similares para leite pasteurizado carbonatado, no qual a média do leite controle e do

leite carbonatado diferiram em 0,1 log, sendo o desvio padrão das médias maior que esta diferença. Shirai (2010) estudou diferentes níveis de carbonatação a pressão atmosférica sobre os psicotróficos de leite cru utilizando e não encontrou diferenças significativas entre os níveis mais alto e mais baixo de carbonatação (pH 5,8 e pH 6,4) no dia 0 de armazenamento.

A manutenção dos queijos durante 20 dias a 7 °C possibilitou um aumento final na população de psicotróficos na ordem de $8,08 \pm 0,07 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em média entre os tratamentos. Como esta carga microbiana é de caráter deteriorante, esta quantidade é considerada elevada para o consumo (CARVALHO, 1999)

Não existe nenhuma lei no Brasil hoje que delimite a quantidade de micro-organismos psicotróficos presente em leite e derivados. Isso provavelmente se deve à dificuldade na separação e quantificação dos micro-organismos “benéficos” dos deteriorantes no produto final. O que se preconiza por lei é um limite para Coliformes (30 e 40 °C) e *Staphylococcus* coagulase positiva, ou ausência de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em 25 g de queijo Minas Frescal (BRASIL, 1996b).

A partir de 4 dias após a fabricação dos queijos, as respostas para os tratamentos utilizados diferiram estatisticamente a 95 % de confiança pela ANOVA. Cada análise foi realizada comparando-se os dados relativos ao mesmo período de armazenamento, como mostra a Tabela 4.

Observando as colunas referentes ao tempo de armazenamento, existe uma heterogeneidade demonstrada pelas letras seguidas das médias pelo teste de Tukey a 95 % de confiança. Esta heterogeneidade é maior nos primeiros dias de estocagem e vai se perdendo conforme chega ao dia 20.

TABELA 4 – EVOLUÇÃO DOS PSICOTRÓFICOS AERÓBIOS TOTAIS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM

Tratamento	Contagem de psicotróficos aeróbios totais (log UFC.g ⁻¹)					
	Tempo (dias)					
	0	4	8	12	16	20
Controle pH 6,8	2,09 ± 0,09 ^a	5,15 ± 0,05 ^a	6,93 ± 0,02 ^a	7,86 ± 0,01 ^a	7,94 ± 0,03 ^a	8,30 ± 0,02 ^a
Ácido Láctico pH 6,4	1,89 ± 0,11 ^a	4,28 ± 0,03 ^b	6,23 ± 0,05 ^b	7,10 ± 0,02 ^c	7,89 ± 0,05 ^{ab}	8,08 ± 0,00 ^{abc}
Ácido Láctico pH 6,0	2,41 ± 0,05 ^a	3,29 ± 0,05 ^c	5,76 ± 0,06 ^c	6,94 ± 0,02 ^d	7,43 ± 0,03 ^c	7,94 ± 0,04 ^c
CO ₂ pH 6,4	2,33 ± 0,19 ^a	4,50 ± 0,04 ^b	6,66 ± 0,08 ^a	7,46 ± 0,04 ^b	7,99 ± 0,06 ^a	8,23 ± 0,02 ^{ab}
CO ₂ pH 6,0	1,98 ± 0,13 ^a	2,30 ± 0,00 ^d	5,60 ± 0,00 ^c	7,23 ± 0,02 ^c	7,66 ± 0,04 ^{bc}	8,00 ± 0,07 ^{bc}

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância; letras iguais representam igualdade.

Ma *et al.*, (2003) avaliaram a carbonatação de leite cru em diferentes níveis, comparada à acidificação por HCl e uma amostra controle. Os autores registraram uma população inicial muito similar entre os tratamentos, sendo que em 21 dias de armazenamento o leite tratado com CO₂ apresentou uma contagem de 1 a 2 log menor que os tratamentos ácido e controle.

No estudo de Dias (2009), foram produzidos queijos Minas Frescal por acidificação direta e carbonatação, dos quais as contagens de micro-organismos psicotróficos não diferiram entre si durante o período analisado (25 dias). Neste mesmo trabalho, foi constatado que os queijos destes diferentes tratamentos apresentaram contagens crescentes, até atingirem valores de 7,00 a 8,00 log UFC.g⁻¹ no 25º dia, sendo que, quanto maior o período de armazenamento, mais próximas tornaram-se as contagens populacionais. A diminuição na contagem dos psicotróficos foi atribuída à diminuição do pH e não ao tratamento utilizado.

Para uma melhor análise, foi criado um gráfico que representa a contagem dos psicotróficos em seus diferentes tratamentos, variando com o tempo de armazenamento (Figura 4).

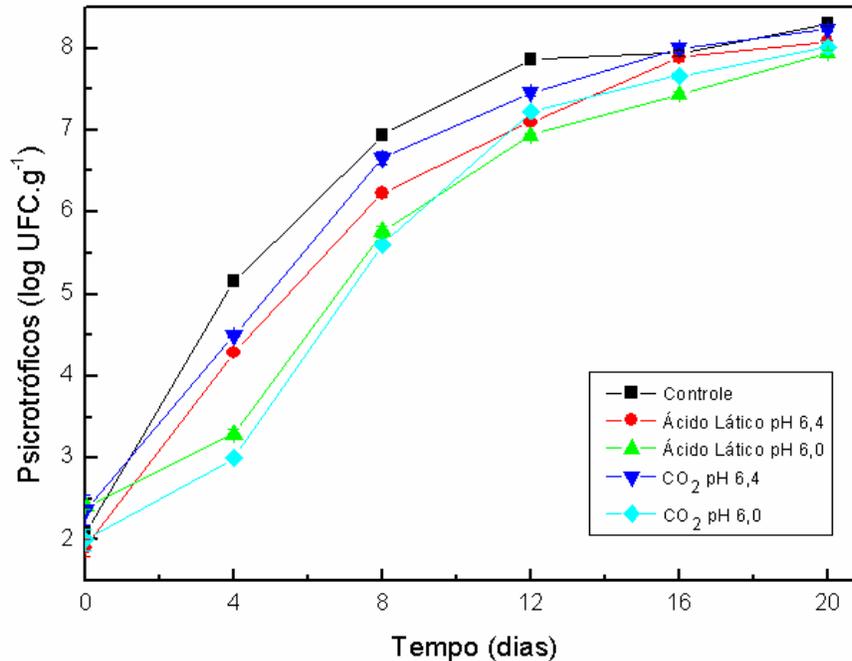


FIGURA 4 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS *VERSUS* TEMPO DE ARMAZENAMENTO.

Uma curva típica de crescimento microbiano apresenta 4 fases principais:

- **Fase Lag** - período de adaptação dos micro-organismos às condições próprias e adversas do meio;
- **Fase Logarítmica (Log)** - período em que os micro-organismos aumentam exponencialmente. A velocidade de crescimento depende do tipo de microrganismo e condições de crescimento, como temperatura, pH e composição do meio;
- **Fase Estacionária** – período em que a taxa de crescimento é igual a taxa de morte dos micro-organismos;
- **Fase de Declínio** – período em que a multiplicação é menor que a taxa de morte de micro-organismos. Ocorre devido à presença de subprodutos inibidores, falta de nutrientes, competição ou demais efeitos adversos.

A Figura 5 ilustra um exemplo de curva típica de crescimento microbiano indicada com as fases do desenvolvimento de um micro-organismo qualquer. Ao observar esta figura é possível verificar, através de uma comparação, as fases obtidas na Figura 4. Houve um prolongamento da Fase Lag pronunciado para ambos os tratamentos ácido láctico e carbonatado de pH 6,0.

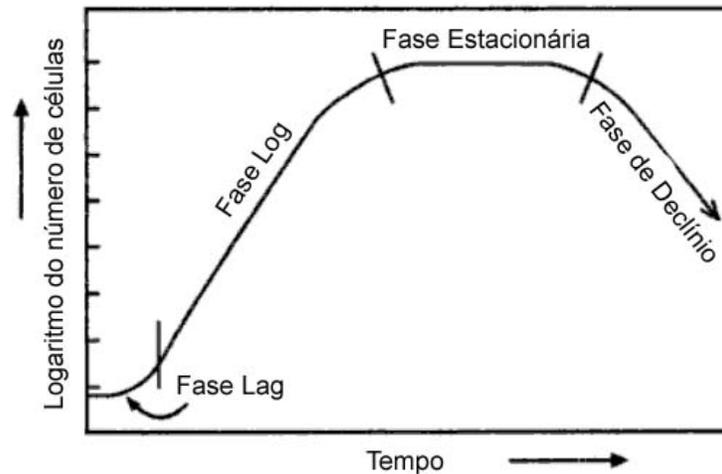


FIGURA 5 – CURVA TÍPICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.
FONTE: ULHAS *et al.*, (2008)

Do dia 0 ao dia 12 nenhuma das médias dos tratamentos a pH 6,0 mostrou ser estatisticamente igual aos demais tratamentos de pHs 6,4 e 6,8. Portanto, o fator pH reduziu o crescimento microbiano principalmente nos primeiros dias de armazenamento a pH 6,0 independente do tratamento utilizado. A concentração hidrogeniônica, que determina o pH dos alimentos, é um dos principais fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição dos microrganismos, que nele se encontram presente (SILVA, 2000).

4.3.2 Contagem de psicotróficos proteolíticos

As contagens de micro-organismos psicotróficos proteolíticos obtidos no dia 0 para os diferentes tratamentos dos queijos foi em média $2,17 \pm 0,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$. A Tabela 5 apresenta os dados com as médias de população e o resultado do teste de Tukey a 95 % de confiança. Os dados obtidos permitiram verificar que não existiu diferença significativa entre os grupos em estudo no primeiro dia de análise.

Da mesma forma que na análise de psicotróficos aeróbios totais, foi possível constatar que não houve efeito adicional do CO_2 no queijo no dia 0. Ao final de 20 dias de armazenamento a 7°C houve um aumento na contagem para $7,27 \pm 0,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em média. As médias das contagens de micro-organismos psicotróficos proteolíticos em apresentaram diferença estatística a 95 % de confiança pela ANOVA do dia 4 a 16 após a fabricação dos queijos. No dia 20 (último dia) todos os tratamentos mostraram ser iguais estatisticamente.

TABELA 5 - EVOLUÇÃO DOS PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM

Tratamento	Contagem de Psicotróficos proteolíticos ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)					
	Tempo (dias)					
	0	4	8	12	16	20
Controle (pH 6,8)	$2,12 \pm 0,12^a$	$4,65 \pm 0,02^a$	$6,45 \pm 0,03^a$	$7,02 \pm 0,06^a$	$7,12 \pm 0,07^a$	$7,28 \pm 0,07^a$
Ácido Láctico pH 6,4	$1,97 \pm 0,07^a$	$3,74 \pm 0,05^b$	$6,29 \pm 0,08^a$	$6,77 \pm 0,05^{ab}$	$7,06 \pm 0,02^{ab}$	$7,33 \pm 0,06^a$
Ácido Láctico pH 6,0	$2,02 \pm 0,06^a$	$3,63 \pm 0,03^b$	$6,12 \pm 0,01^a$	$6,06 \pm 0,10^c$	$7,00 \pm 0,06^c$	$7,23 \pm 0,05^a$
CO_2 pH 6,4	$2,33 \pm 0,10^a$	$3,75 \pm 0,05^b$	$5,80 \pm 0,10^b$	$6,44 \pm 0,19^{bc}$	$7,08 \pm 0,04^{ab}$	$7,38 \pm 0,05^a$
CO_2 pH 6,0	$2,39 \pm 0,19^a$	$3,34 \pm 0,06^c$	$6,29 \pm 0,06^a$	$6,31 \pm 0,01^{bc}$	$6,81 \pm 0,03^{bc}$	$7,14 \pm 0,06^a$

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância; letras iguais representam igualdade.

Os tratamentos mostraram ter comportamento similar no controle de psicotróficos proteolíticos quando comparado aos psicotróficos aeróbios totais. Em ambas as análises as populações dos tratamentos a pH 6,4 e 6,0 foram menores a partir de 4 dias em relação ao Controle, sendo que esta diferença diminuiu gradativamente até o último dia de estocagem.

A deterioração de alimentos pode ser causada pelo crescimento de micro-organismos deteriorantes, que leva as alterações sensoriais. Neste caso, números elevados são esperados e variam com o tipo de alimento e microrganismo presente. A maioria dos alimentos apresenta, quando essas alterações são detectáveis, populações superiores a 6 log UFC.g⁻¹ de alimento. Entretanto, há aqueles em que são necessários 7 log ou até mesmo 8 log UFC.g⁻¹ (CARVALHO, 1999). Santos e da Fonseca (2002) relatam que a quantidade de bactérias psicotróficas necessárias para que hajam alterações sensoriais perceptíveis, de natureza proteolítica ou lipolítica, seria quando esta atingisse a contagem de 7 log UFC.g⁻¹ alimento. Cousin (1982) evidencia que não existe atividade proteolítica ou lipolítica significativa quando a população de micro-organismos psicotróficos é menor do que 6 log UFC.mL⁻¹ ou g⁻¹ de alimento. Pinto *et al.* (2004) estudou o desenvolvimento de bactérias psicotróficas em leite cru. Neste trabalho o autor encontrou dados que indicam uma alta produção de proteases em leite cru por psicotróficos principalmente no final da fase logarítmica e início da fase estacionária de crescimento. Comparando este dado com as Figuras 5 e 6 é possível verificar que o final da fase log e início da fase estacionária das curvas obtidas está por volta do dia 12. Neste período foram obtidas contagens dentro dos 7 e 6 log UFC.g⁻¹ estipulados por Santos e da Fonseca (2002) e Cousin (1982), respectivamente.

Sangaletti (2007) estudou a vida de prateleira do queijo Minas Frescal comercial, através de análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais e concluiu que as bactérias mesofílicas, psicotróficas totais, psicotróficas proteolíticas, psicotróficas lipolíticas e bactérias lácticas tiveram crescimento constante no queijo durante o armazenamento. Foi constatado que mesmo sob refrigeração, a acidez aumentou durante o armazenamento. No entanto, o queijo não apresentou mudanças sensoriais perceptíveis.

A Figura 6 mostra as contagens de psicotróficos proteolíticos dos queijos Minas Frescal em relação ao tempo. É possível observar um comportamento semelhante ao da contagem de psicotróficos totais. Isto ajuda a deduzir que não houve inibição pelo CO_2 no metabolismo de proteases das bactérias presentes nas amostras.

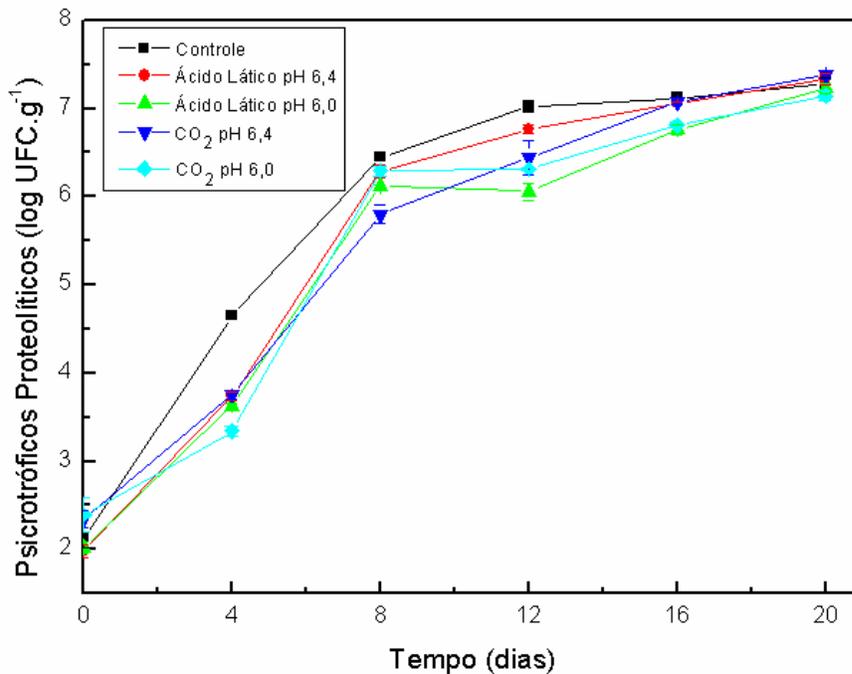


FIGURA 6 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS *VERSUS* TEMPO DE ARMAZENAMENTO

No dia 8 de armazenamento os tratamentos a pH 6,0 exibiram uma contagem muito grande e acima da contagem a 12 dias. Este resultado não condiz com o esperado e provavelmente ocorreu devido a um erro experimental. Em condições controladas o comportamento ideal seria de uma curva semelhante à dos demais tratamentos.

4.3.3 Contagem de psicotróficos lipolíticos

A população de psicotróficos lipolíticos foi estatisticamente igual a 95 % de confiança pela ANOVA no dia da fabricação dos queijos (dia 0), com uma média de $2,75 \pm 0,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$ entre os tratamentos. A Tabela 6 apresenta os dados obtidos, dos quais pôde-se constatar que não houve efeito inibitório adicional pelo emprego de CO_2 no metabolismo de micro-organismos lipolíticos no dia 0 de armazenamento.

Do dia 4 até o dia 16 os queijos diferiram entre si pela ANOVA a 95 % de confiança, sendo que no último dia de análise eles tornaram-se iguais estatisticamente. Ao final de 20 dias de armazenamento houve um crescimento expressivo na população, com $7,78 \pm 0,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em média.

TABELA 6 - EVOLUÇÃO DOS PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM

Tratamento	Contagem de psicotróficos lipolíticos ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)					
	Tempo (dias)					
	0	4	8	12	16	20
Controle (pH 6,8)	$2,80 \pm 0,09^a$	$4,10 \pm 0,03^a$	$6,33 \pm 0,03^a$	$7,28 \pm 0,03^a$	$7,64 \pm 0,06^a$	$7,93 \pm 0,03^a$
Ácido Láctico pH 6,4	$2,87 \pm 0,07^a$	$3,80 \pm 0,08^{ab}$	$5,68 \pm 0,10^b$	$6,87 \pm 0,07^{bc}$	$7,46 \pm 0,10^{ab}$	$7,81 \pm 0,04^a$
Ácido Láctico pH 6,0	$2,64 \pm 0,10^a$	$3,60 \pm 0,07^{bc}$	$5,12 \pm 0,12^c$	$6,73 \pm 0,04^c$	$6,99 \pm 0,07^c$	$7,63 \pm 0,06^a$
CO_2 pH 6,4	$2,63 \pm 0,06^a$	$3,96 \pm 0,07^{ab}$	$5,85 \pm 0,08^{ab}$	$7,08 \pm 0,02^{ab}$	$7,38 \pm 0,05^b$	$7,85 \pm 0,07^a$
CO_2 pH 6,0	$2,83 \pm 0,09^a$	$3,55 \pm 0,06^c$	$4,99 \pm 0,09^c$	$6,75 \pm 0,03^c$	$7,16 \pm 0,03^{bc}$	$7,70 \pm 0,06^a$

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância; letras iguais representam igualdade.

Os queijos tratados a pH inferior mostraram ser mais eficientes no controle de psicotróficos lipolíticos a partir do 4º dia de armazenamento. Verifica-se que apesar

dos queijos de pH 6,0 mostrarem maior população no tempo 0 de armazenamento, menores contagens foram detectadas nos dias subsequentes. Os tratamentos a pH 6,4 também resultaram em diferenças na contagem dos micro-organismos, mas estas são menos expressivas.

Na Figura 7 é possível observar a evolução dos psicotróficos lipolíticos, que foi também semelhante ao obtido na contagem de psicotróficos aeróbios totais e proteolíticos. Mais uma vez, podemos observar o pH ser o fator de maior influência sobre o crescimento dos psicotróficos. O efeito resultante de menores pHs foi o mesmo observado nas demais análises de psicotróficos: uma extensão da fase lag, que exibiu maior diferença na contagem em relação ao tratamento Controle nos dias 4 e 8.

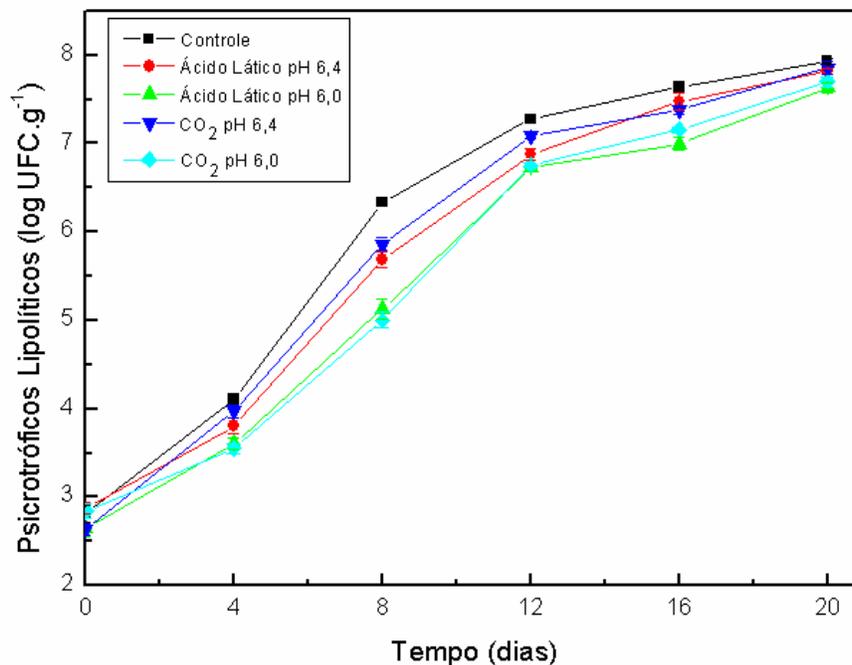


FIGURA 7 - CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS *VERSUS* TEMPO DE ARMAZENAMENTO

A produção de enzimas extracelulares ocorre em determinados psicotróficos, podendo estas ser lipases que contribuem para o desenvolvimento de sabor ranço, e as proteinases que degradam a caseína liberando compostos de sabor amargo

(CHAMBERS, 2002). Ma *et al.*, (2003) avaliaram a adição de CO₂ ao leite cru sobre a lipólise, comparada à acidificação por HCl, ambos à pH 6,2. Os autores detectaram que houve uma redução na lipólise, mas esta foi devida a uma redução do crescimento microbiano.

4.3.4 Contagem de bactérias lácticas

Houve diferença significativa entre as contagens de bactérias lácticas desde o dia em que os queijos foram fabricados (dia 0) até o último dia de análise (dia 20). A média da população inicial foi de $2,49 \pm 0,12 \log \text{UFC.g}^{-1}$. As médias das contagens populacionais estão na Tabela 7, juntamente com os níveis das diferenças obtidas pelo teste de TUKEY a 95 % de confiança. Dias (2009) estudou o comportamento de bactérias lácticas em queijo Minas Frescal carbonatado e acidificado por ácido láctico (pH 6,2) e encontrou populações similares ($3,90$ e $4,00 \log \text{UFC.g}^{-1}$) após um dia de fabricação.

Após 20 dias, as contagens de bactérias lácticas alcançaram, em média, uma população de $7,22 \pm 0,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Os dados referentes ao crescimento destes micro-organismos estão na Tabela 13. Sangaletti (2007) analisou o comportamento de bactérias lácticas em 3 lotes de queijos Minas Frescal comerciais e encontrou uma média de $7,31 \pm 0,80 \log \text{UFC.g}^{-1}$ queijo após 20 dias de armazenamento.

Comparando-se os psicotróficos em geral analisados, as bactérias lácticas exibiram comportamento diferente durante o período de armazenamento do queijo. A contagem de psicotróficos (totais, proteolíticos e lipolíticos) exibiram uma redução considerável na população entre o mesmo período observado. Já no caso das bactérias lácticas, os tratamentos ácido e com CO₂ resultaram em maiores contagens em relação ao tratamento Controle até o oitavo dia de análise. Até o final das análises (dia 20) não houve grande diferença entre os tratamentos utilizados. No entanto, a população de bactérias lácticas foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) para ambos os tratamentos com CO₂. A Figura 8 mostra a evolução destes micro-organismos em relação ao tempo de armazenamento.

TABELA 7 - EVOLUÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NO PERÍODO DE ESTOCAGEM

Tratamento	Contagem de bactérias lácticas (log UFC.g ⁻¹)					
	Tempo (dias)					
	0	4	8	12	16	20
Controle (pH 6,8)	2,27 ± 0,03 ^b	2,92 ± 0,08 ^b	5,04 ± 0,04 ^c	6,42 ± 0,06 ^{ab}	7,03 ± 0,03 ^a	7,40 ± 0,10 ^a
Ácido Láctico pH 6,4	2,36 ± 0,06 ^b	3,26 ± 0,08 ^{ab}	5,40 ± 0,02 ^{ab}	6,06 ± 0,02 ^{bc}	6,97 ± 0,01 ^{ab}	7,27 ± 0,06 ^{ab}
Ácido Láctico pH 6,0	2,30 ± 0,03 ^b	3,38 ± 0,04 ^a	5,44 ± 0,01 ^{ab}	6,03 ± 0,08 ^c	7,00 ± 0,01 ^a	7,35 ± 0,01 ^a
CO ₂ pH 6,4	2,78 ± 0,07 ^a	3,25 ± 0,05 ^{ab}	5,49 ± 0,06 ^a	6,62 ± 0,03 ^a	6,78 ± 0,01 ^c	6,95 ± 0,05 ^b
CO ₂ pH 6,0	2,75 ± 0,03 ^a	3,32 ± 0,04 ^a	5,45 ± 0,08 ^{ab}	6,55 ± 0,06 ^a	6,89 ± 0,03 ^{bc}	7,13 ± 0,05 ^{ab}

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância; letras iguais representam igualdade.

Ruas-Madiedo *et al.* (1998) já haviam descrito para queijos de coalho espanhóis, resultados que não mostram efeitos da combinação de refrigeração e tratamento com CO₂ em leite, nem do CO₂ residual ainda presente no leite pasteurizado após degaseificação e pasteurização na multiplicação de bactérias ácido lácticas durante a coagulação do leite. Dada a natureza microaerofílica dessas bactérias (Lioliou *et al.*, 2001), as condições do ambiente gerado por um ambiente contendo CO₂ poderiam influenciar o crescimento bactérias lácticas apenas se o gás provocasse um efeito adicional sobre os microrganismos ou sobre o leite e não, por uma inibição anaeróbia.

Buriti *et al.*, (2005b) avaliaram o desenvolvimento das bactérias lácticas em queijo Minas frescal de sete diferentes marcas por 21 dias, sendo que seis delas apresentaram uma população média de 8,0 log UFC.g⁻¹ nos últimos dias de análise.

O crescimento de bactérias lácticas traz um aumento da acidez devido à fermentação de lactose, que gera ácido láctico como subproduto. Quanto à acidificação do queijo Minas frescal, ela é considerada benéfica por inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Mas o crescimento destes organismos

é considerado benéfico somente quando são adicionadas culturas iniciadoras durante o processamento do queijo. O crescimento de bactérias lácticas desconhecidas pode gerar, além do ácido láctico, outras substâncias que podem ser de interesse ou não, como o CO_2 , etanol e acetato (produzido por bactérias heteroláticas) (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

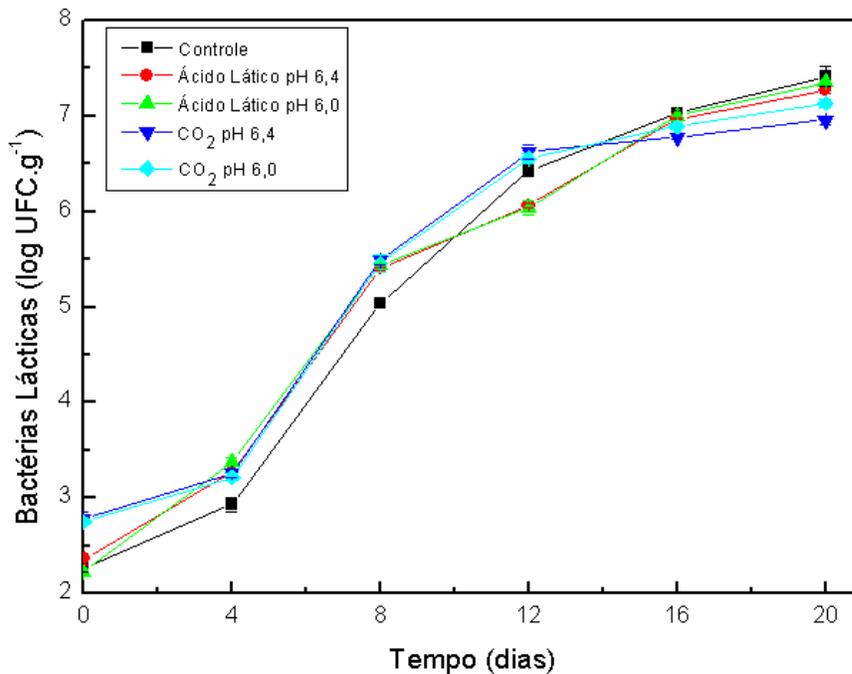


FIGURA 8 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS *VERSUS* TEMPO DE ARMAZENAMENTO

A resistência microbiana ao CO_2 depende do tipo de micro-organismo, da fase de crescimento, e do meio em que estão suspensão. Alterações nestes fatores podem inibir o efeito bactericida do CO_2 , especialmente em sistemas ricos em proteínas (WEI, 1991).

Lin *et al.* (1992) observaram que, utilizando alta pressão, o CO_2 supercrítico penetra nas células e rompe-as quando é liberado repentinamente. Através deste estudo eles foram capazes de melhorar a taxa de rompimento celular pela liberação repetida da pressão de CO_2 . Em sistemas supercríticos, o CO_2 dissolvido age pela diminuição do pH celular, e a acidez resultante leva ao distúrbio de alguns sistemas

biológicos dentro das células. A inibição microbiana é resultado, portanto, de alterações nas propriedades da célula (membrana, citoplasma, enzimas, etc.) (DIXON e KELL, 1989).

De acordo com Haas *et al.*, (1989), uma diminuição no pH do meio não é suficiente para ser tomado como resultado de uma redução microbiana devido ao CO₂, já que esta ação – do gás - mostra um efeito inibitório específico que é maior que o de outros ácido usados para diminuição da acidez do meio (ácido fosfórico, ácido clorídrico, etc). Isto acontece porque estes ácidos não penetram nas células microbianas tão facilmente quanto o dióxido de carbono sob pressão. Como a pressão do gás no leite ocorreu à pressão ambiente neste trabalho, é muito provável que este mecanismo inibitório não tenha ocorrido devido à dificuldade do gás penetrar o meio intracelular.

4.4 PROPRIEDADES DE TEXTURA

As propriedades de dureza e coesividade dos queijos durante a estocagem estão apresentadas na Tabela 8, enquanto a gomosidade, elasticidade e mastigabilidade encontram-se na Tabela 9. Os dados do TPA entre diferentes tratamentos mostraram variação nas propriedades mecânicas de gomosidade, dureza e mastigabilidade ($P < 0,05$). A força máxima durante a primeira compressão apresentou uma variação de 1,22 a 1,89 N. Maiores valores de dureza foram relatados por outros autores: Buriti *et al.* (2005b) encontraram 2,81 a 3,28 N em 7 dias de armazenamento do Minas Frescal com e sem *L. acidophilus*; Buriti *et al.*, (2005a) registraram 2,67 a 4,06 N em 7 dias, trabalhando com Minas Frescal e com e sem *L. paracasei*; Hernández-Morales *et al.*, (2010) descreveram valores variando de 0,7 a 2,4 N no queijo mexicano Añejo.

TABELA 8 - DUREZA E COESIVIDADE DOS QUEIJOS PRODUZIDOS

	Dureza 1º ciclo (N)	Dureza 2º ciclo (N)	Coesividade
Controle	1,22 ± 0,06 ^c	0,76 ± 0,10 ^b	0,45 ± 0,07 ^a
Ácido L, pH 6,4	1,35 ± 0,07 ^c	0,85 ± 0,08 ^b	0,46 ± 0,03 ^a
Ácido L, pH 6,0	1,40 ± 0,08 ^{bc}	0,93 ± 0,08 ^b	0,47 ± 0,05 ^a
CO ₂ 6,4	1,59 ± 0,09 ^b	1,16 ± 0,09 ^{ab}	0,53 ± 0,02 ^a
CO ₂ 6,0	1,89 ± 0,01 ^a	1,56 ± 0,02 ^a	0,54 ± 0,01 ^a

NOTA: Médias seguidas por diferentes letras para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância ($P < 0.05$)

Queijos pouco firmes podem resultar de umidades elevadas, devido à formação de redes mais fracas entre as proteínas (Ahmed *et al.*, 2005). Bhaskaracharya e Shah (2001) relataram que um aumento significativo na sinérese aumenta a dureza dos queijos. Souza e Saad (2009) relataram a existência de maior dureza em queijo Minas Frescal adicionado de culturas lácteas iniciadoras quando a umidade é menor. Dureza e seus parâmetros de derivados, como a gomosidade e a mastigabilidade, também são influenciadas pelo pH, além de serem influenciadas pelo conteúdo de umidade (Fox e McSweeney, 1998).

A coesão e a elasticidade não apresentaram variação significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, embora tenha havido uma ligeira variação. Buriti *et al.* (2005b) relataram valores próximos entre as medidas de elasticidade nos queijos Minas Frescal estudados. A coesão de todos os queijos foram superiores aos relatados no queijo fresco mexicano Chihuahua (Van HEKKEN *et al.*, (2007). Medidas de adesividade também foram realizadas, porém não houve qualquer força adesiva resultante em nenhum dos queijos dos ensaios.

TABELA 9 - ELASTICIDADE, MASTIGABILIDADE E GOMOSIDADE DOS QUEIJOS PRODUZIDOS

	Elasticidade (mm)	Mastigabilidade (N)	Gomosidade (N)
Controle	7,16 ± 0,81 ^a	0,25 ± 0,04 ^c	0,56 ± 0,08 ^c
Ácido L, pH 6,4	6,69 ± 1,09 ^a	0,32 ± 0,05 ^{bc}	0,62 ± 0,02 ^c
Ácido L, pH 6,0	6,73 ± 0,67 ^a	0,31 ± 0,03 ^c	0,65 ± 0,06 ^c
CO ₂ 6,4	7,03 ± 1,13 ^a	0,45 ± 0,03 ^{ab}	0,85 ± 0,06 ^b
CO ₂ 6,0	6,83 ± 0,26 ^a	0,55 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,03 ^a

NOTA: Médias seguidas por diferentes letras para cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 95 % de significância ($P < 0,05$)

Como houveram diferenças significativas entre a dureza dos queijos, era esperado que os parâmetros de mastigabilidade e gomosidade também fossem diferentes ($P < 0,05$), uma vez que são derivados da medida de dureza. Dentre os parâmetros de textura analisados no presente trabalho, a dureza foi o mais importante. Mamede (2008) avaliou as propriedades de queijos de coalho que receberam diferentes temperaturas de cozimento. O autor relatou que menores teores de umidade e, conseqüentemente, maior porcentagem de proteína total, resultaram em queijos com maior dureza.

Menores valores no parâmetro dureza resultaram em queijos considerados muito macios e de difícil manejo, enquanto os escores mais elevados resultaram em queijos mais firmes. O queijo Controle obteve os menores valores de dureza, e tornou-se um queijo demasiadamente mole em relação à firmeza padrão que caracteriza o queijo Minas Frescal. Notou-se também uma grande dificuldade em trabalhar-se com a coalhada do queijo Controle durante sua fabricação. Os cubos apresentaram fácil quebra e difícil dessoragem, que pôde ser verificada pela presença de maior quantidade de água na análise de umidade.

5 CONCLUSÃO

O pH, umidade e acidez dos queijos foram influenciadas pelos diferentes tratamentos. O pH e umidade dos queijos diminuiu durante o tempo, sendo que o pH dos queijos tratados com CO₂ tiveram uma ligeira variação até os 14 dias de armazenamento. Isto foi atribuído à perda de gás em conjunto com a produção bacteriana de ácidos. A acidez foi maior no processo de acidificação direta - a mesmos níveis de pH - em relação à carbonatação. Isto pode ter ocorrido pelo CO₂ ser um ácido fraco, o que facilitaria a perda de H⁺ para a fase insolúvel.

O CO₂ não exerceu efeito adicional sobre os micro-organismos psicotróficos ou bactérias lácticas em relação ao processo de acidificação direta na faixa de operação utilizada. Foi observado um efeito relacionado com o fator de pH, nos quais os níveis mais baixos (pH 6,0) foram mais eficazes contra psicotróficos em geral. Baixos valores de pHs permitiram um maior crescimento de bactérias lácticas quando comparado ao comportamento dos psicotróficos, uma vez que elas são capazes de adaptar-se melhor em meios acidificados. Não foi evidenciado efeito adicional do CO₂ sobre a multiplicação de psicotróficos produtores de lipases e proteases extracelulares.

A carbonatação resultou queijos Minas Frescal mais duros em relação aos demais estudados, além de mais fácil manipulação. O pH também influenciou na dureza dos queijos, sendo que os queijos carbonatados obtiveram média de 1,59 e 1,89 N para pH 6,4 e 6,0, respectivamente, enquanto os queijos obtidos por acidificação direta tiveram em média 1,35 e 1,40 N. Os parâmetros de coesividade e elasticidade não diferiram entre os tratamentos, enquanto a mastigabilidade e gomosidade foram maiores no tratamento por CO₂. Nenhum dos queijos apresentou adesividade.

A produção de queijos Minas Frescal sem a acidificação do leite (queijo Controle) resultou um produto mais mole, com maior conteúdo de água, de difícil manuseio e com maior susceptibilidade a contaminações de origem microbiana. De acordo com os parâmetros estudados e dos dados obtidos, o tratamento do leite para produção de Minas Frescal com CO₂ mostrou ser uma alternativa adequada,

podendo substituir o processo de acidificação direta ao criar queijos com características muito semelhantes.

6 REFERÊNCIAS

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Informações sobre tipos de queijo no Brasil**. Disponível em: <www.abiq.com.br>. Acesso em: 15/02/2011.

AHMED, N. H.; EL SODA, M.; HASSAN, A. N.; FRANK, J. Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, p. 843–847, 2005.

ALMEIDA, K. M.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.

ALVES, C. C. da C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

ANTUNES, L. A. F. *et al.* Resfriamento do leite e suas conseqüências na produção de lácteos. Ha-La Biotec: Chr Hansen. Valinhos, n. 95, p. 2-3. Setembro/Outubro, 2006.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A.V .P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazenda. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1ª ed. Juiz de Fora-MG, Embrapa Gado de Leite, 2003.168 p.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1172–1177, 2002.

BALLESTRA, P.; SILVA, A. A. da; CUQ, J.-L. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 829–831, 1996.

BHASKARACHARYA, R. K.; SHAH, N. P. Texture and microstructure of mozzarella. **Dairy Industries International**, v. 66, p. 42–45, 2001.

BOOR K. J.; BROWN D. P.; MURPHY S. C.; KOZLOWSKI S. M.; BANDLER D. K. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1743–1748, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Resolução RDC nº 145 de 13 dez de 1996. Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, 1996a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Portaria nº 146 de 07 mar de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos, 1996b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite e produtos lácteos. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p.19684.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 183, p. 13-22, 20 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº44. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 mar. 2004. Seção 1, p. 5.

BRUM, J. V. F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba – PR**. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BURITI, F. C. A.; da 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, p. 173–180, 2005a.

BURITI, F. C. A.; da ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal** v. 15, p. 1279–1288, 2005b.

BUTLER J. N. **Carbon dioxide equilibria and their applications**. Addison-Wesley Publishing, 1982. 259 p.

CALVO, M. M.; MONTILLA, M. A.; OLANO, A. Rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 12, p. 1073–1076, 1993.

CANDIOTI, M. C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S. B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C. A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 923–931, 2002.

CARVALHO, E. P. **Microbiologia de Alimentos**. Lavras: UFLA/FAEP, 1999. p. 76.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, n. 18, p. 262–267, 2007.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. 3rd ed. New York: John Willey and Sons Inc., 2002. p. 39–90.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrops in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p.1-30, 1994.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p.172- 207, 1982.

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

CUNHA, C. R. **Efeito do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento, proteólise e propriedades viscoelásticas de queijo Minas Frescal de baixo teor de gordura fabricado a partir de leite ultrafiltrado**. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

CUNHA, C. R.; VIOTTO, W. H.; VIOTTO, L. A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: effect on

composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 215–224, 2006.

CUNNIFF, P. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. Arlington, VG: AOAC International, 1995.

DAGOSTIN, J. L. A. ; CARPINE, D. ; TUSSOLINI, L. ; JUSTO, T. H. ; ALMEIDA, J. M. ; DALLA SANTA, O. R. ; DALLA SANTA, H. S. . **Atividade Lipolítica de Bactérias Lácticas Isoladas de Salames**. In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2007, Maringá - PR. Anais do XVI EAIC, 2007.

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

DIAS, B. M. **Influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal**. 108 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 109–136, 1989.

DORNELLAS, J. R. F. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e "shelf life" do queijo Minas Frescal**. 96 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

EMBRAPA. In: Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. **Estatísticas do Leite**. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/>>. Acesso em: 15/12/2010.

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

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998.

FRANCO, R. M.; ALMEIDA, L. E. F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 6, n. 21, p. 33-36, 1992.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16th ed. Washington (DC): American Public Health Association, 1992. p. 271-286.

FURTADO, M. M. **Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 112p. Manual técnico para a produção industrial de queijos.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. Cheese texture. In: **Cheese Rheology and Texture**. Washington, DC: CRC, 2003. 437 p.

HAAS, G. J., PRESCOTT, J. R.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 253–265, 1989.

HAYES M. C.; BOOR K. Raw Milk and Fluid Milk Products In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed.). **Applied dairy microbiology**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. p. 59-76.

HOFVENDAHL K.; HAHN-HÄGERDAL B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

HERNÁNDEZ-MORALES, C.; HERNÁNDEZ-MONTES, A.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; DE GANTE, A. V. Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 552-560, 2010.

HONG S.; PYUN, Y. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. **International Journal of Microbiology**, v. 63, p. 19–28, 2001.

HORST, J.A. **Manual de operações de campo-análises físico-químicas**. Curitiba: Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, 2001. 5p.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 690-695, 1999.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: a comprehensive review. **Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 158-168, 2006.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed., 1ª ed. digital, São Paulo, 2008. 1020 p.

IRKIN, R. Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: “Dil” cheese as an example. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 5, p. 91-96, 2010.

JENSEN, R. G.; KROGER, M. The importance of milk and milk products in the diet. In: MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; McBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. 51–52.

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 573-583, 1979.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1748-1760, 1987.

LIN, H.-M.; YANG, Z.; CHEN, L.-F. An improved method for disruption of microbial cells with pressurized carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 165–166, 1992.

LIOLIOU, K.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N.; ROBINSON, R. K. Changes in the microflora of Manovri, a traditional Greek whey cheese, during storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 100-106, 2001.

LITTLE, C. L.; RHOADES, J. R.; SAGOO, S. K.; HARIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v. 25, p. 304–312, 2008.

LUCEY, J. A.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, n. 1, 1994.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2725–2743, 2003.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. V. Effect of CO₂ Addition to Raw Milk on Proteolysis and Lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 5, p. 1616-1631, 2003.

MAMEDE, P. L. **Efeito da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do queijo de coalho**. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PALENCIA, P. F.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 577–585, 2001.

MOURA, C. J. **Efeito do resfriamento do leite sobre o rendimento e lipólise do queijo tipo parmesão**. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 24–32, 1996.

NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 4, 2008.

NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S. A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT: Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.

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

POLLARD, A.; HERKAT, F.; SEURET, M.G.; HALMOS A.L. Textural Changes of Natural Cheddar Cheese During the Maturation Process. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 6, p. 2011-2016, 2003.

RAPACCI, M.; VAN DENDER, A. G. F. Qualidade da matéria-prima e cuidados nos processamentos de requeijão cremoso e queijos fundidos. **Revista Leite e Derivados**, n. 37, v. 8, p. 18-26, 1997.

REIBNITZ, M. G. R.; TAVAREZ, L. B. B.; GARCIA, J. A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAsa positivos en queso 'Colonial' comercializado in el município de Blumenal, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 30, p. 8-12, 1998.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 19-23, 2009.

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

ROBINSON R. K.; TAMIME A. Y. Maintaining a clean working environment. In ROBINSON R. K. (Ed.). **Dairy microbiology handbook**. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 561-590.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **Journal of Food Protection**., v. 59, p. 502-508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; ALONSO, L.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. AFUEGA'L PITU Cheese Quality: Carbon Dioxide Addition to Refrigerated Milk in Acid-coagulated Cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 8 p. 951-958, 1998.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SANTOS, M. V.; da FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 82, p.13-19, 2001.

SANTOS, M. V.; da FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **CBQL em revista**, n. 3, 2002.

SEARS, D. F.; EISENBERG, R. M. A model representing a physiological role of carbon dioxide at the cell membrane. **Journal of General Physiology**, v. 44, p. 869–75, 1961.

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

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, p. 241–248, 2003.

SINGH, H; BENNET, R. J. Milk and milk processing. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy Microbiology Handbook**. 3rd ed. New York: John Willey and Sons Inc., 2002. p. 01-35.

SOUZA, J. P.; JONG, E. V.; GOULART, H. H. R. **Aumente o tempo de conservação dos alimentos e obtenha mais lucros**. Porto Alegre: Imprensa Livre, 112p., 2001.

SOUZA, C. H. B. de.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAADI, S. M. I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 871–877, 2008.

SOUZA, C. H. B., SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-

chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 633–640, 2009.

SPREER, E. **Lactologia industrial**. Zaragoza: Acribia, 1991. 623 p.

THOMAS, S. B., DRUCE, R. G. **Dairy Industries**, v. 37, 1972. p. 593.

ULHAS, P.; CHAUDHARI, A. B.; CHINCHOLKAR S. B.; KULKARNI, J. S. **Foundations in Microbiology**. Pune: Nirali Prakashan, 2008.

Van HEKKEN, D. L.; TUNICK, M. H.; TOMASULA, P. M.; CORRAL, F. J. M.; GARDEA, A. A. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 5-12, 2007.

Van VLIET, T. Terminology to be used in cheese rheology. **International Dairy Federation Bulletin**, n. 268, p. 5-15, 1991.

VARGAS, O. L. Termo-estabilidade de alguns sistemas proteolíticos extracelulares produzidos por bactérias psicrófilas. **Revista Instituto Laticínios Candido Tostes**, p. 20, mai/jun, 1979.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. New York: CRC, 2006.

WEI, C. I.; BALABAN, M. O.; FERNANDO, S. Y.; PELOW, A. J. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 189–193, 1991.

WOLFE, S. K. Use of carbon monoxide and carbon dioxide enriched atmospheres for meats, fish and produce. **Food Technology**, v. 34, p. 55–59, 1980.

WONG, N. P. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3rd ed. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1998. 779p.