

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados

Edvaldo da Costa Carvalho

**EFEITO DO USO DO DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NA FABRICAÇÃO DO
QUEIJO PRATO**

Juiz de Fora
2015

Edvaldo da Costa Carvalho

**EFEITO DO USO DO DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NA FABRICAÇÃO DO
QUEIJO PRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Novos Produtos e Processos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Junio Cesar Jacinto de Paula
Corientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

Juiz de Fora
2015

**EFEITO DO USO DO DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) NA FABRICAÇÃO DO
QUEIJO PRATO**

Edvaldo da Costa Carvalho

ORIENTADOR (A): Prof^o Dr^o Junio Cesar Jacinto de Paula

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Novos Produtos e Processos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

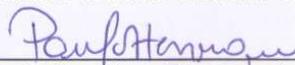
Aprovada em 13 / 03 / 2015



Prof. Dr. Paulo Sérgio Monteiro - UFV



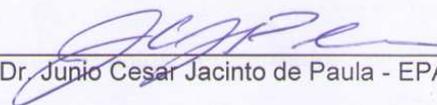
Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez - UFF



Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva - UFJF



Prof. Dra. Denise Sobral - EPAMIG



Prof. Dr. Junio Cesar Jacinto de Paula - EPAMIG

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ser à base de todas as minhas realizações.

Aos meus pais, Dimas de Carvalho e Maria das Graças da Costa Carvalho que me apoiaram nas minhas decisões.

Ao meu orientador Professor e Pesquisador Dr. Junio César Jacinto de Paula, pela dedicação ao meu trabalho, pela orientação na revisão de cada uma das etapas do experimento e durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

A meu co-orientador Professor e pesquisador Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva e ao Departamento de Nutrição da UFJF, pela disponibilização do laboratório, co-orientação, realização das revisões e orientações metodológicas do trabalho.

Agradeço também a todos que colaboraram para a realização de todas as etapas aqui descritas em especial ao professor Wanderson Campos coordenador do curso de leite e derivados do Núcleo Avançado em Tecnologia de Alimento e Gestão do Cooperativismo (NATA).

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao programa de Mestrado Profissional em Ciência e tecnologia do Leite e Derivados (parceria EPAMIG, EMBRAPA e UFJF), pela oportunidade de realização do curso.

A todos que foram meus professores, pelos quais tenho grande admiração.

Aos meus amigos de curso pelo incentivo e momentos agradáveis.

Agradeço, em especial à EPAMIG/Instituto de laticínios Cândido Tostes pela utilização da infra-estrutura das instalações industriais, equipamentos, laboratórios e pessoal.

Agradeço à FAPEMIG pelo suporte financeiro ao projeto (CAG-APQ-00824-12) e pelas bolsas BIPDT e BIC concedidas aos participantes.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, pela disponibilização dos equipamentos Pulverizador de Ouro (marca Electron Microscopy Sciences modelo 550x) e Microscópio Eletrônico de Varredura (Leo, modelo 1430 VP), bem como às agências financiadoras dos aparelhos (FINEP/FAPEMIG/CNPq).

Aos professores Denise Sobral, Gisela M. Machado, Renata G. B. Costa, Luiz Carlos G. Costa Junior, Vanessa A. M. Teodoro, Elisângela M. Miguel e aos laboratoristas Alcy e Irani pelo auxílio na realização dos experimentos e análises.

Aos bolsistas FAPEMIG, em especial à bolsista Gabrielle Souza Lima Zacarão, pela colaboração e apoio na realização dos experimentos e análises.

À Minha noiva Ellen Espíndola Alves, pela imensa contribuição durante o mestrado e pela agradável companhia, paciência e atenção nas horas difíceis.

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

“O aprendizado se dá quando compartilhamos experiências e isso só é possível num ambiente democrático, onde não haja barreiras ao intercâmbio de idéias”.

(John Dewey)

RESUMO

O leite pré-acidificado com injeção de CO₂ utilizado para fabricação de queijos pode trazer benefícios tecnológicos e econômicos para as indústrias de laticínios. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em escala piloto, os efeitos tecnológicos ocorridos com a utilização de CO₂ dissolvido no leite após o processo de pasteurização para a fabricação do queijo Prato. O experimento consistiu em avaliar o efeito da carbonatação no leite pasteurizado através da injeção de CO₂, sob pressão máxima de 25 psi a 8°C até pH 6,0 em comparação ao tratamento controle (sem injeção de CO₂). O experimento foi realizado em quatro repetições. Os queijos foram avaliados durante os 120 dias de estocagem. Foram realizadas análises físico-química, rendimento, evolução dos índices de maturação, aceitabilidade, preferência sensorial, textura e microestrutura. Foi observado que o tratamento com injeção de CO₂ reduziu o pH dos queijos Prato, que apresentaram reduções significativas nos tempos de coagulação e no tempo total de fabricação. Este tratamento também reduziu a umidade e a porcentagem de perda de gordura no soro, além de não afetar a capacidade de fermentação da cultura láctica em relação ao controle e não alterar a contagem microbiana patogênica. Os queijos tratados com CO₂ não modificaram os índices de extensão e proteólise ao longo da maturação, apresentou maior firmeza e fraturabilidade em comparação ao queijo controle, em razão do maior dessoramento e da microestrutura mais compacta. Houve, também, aumento da porosidade da matriz proteica. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na preferência e na aceitabilidade sensorial entre os tratamentos.

Palavras-chave: Dióxido de carbono. Pré-acidificação. pH.

ABSTRACT

The preacidified milk with injection of CO₂ (carbon dioxide) used for cheesemaking can bring technological and economic benefits to the pilot scale. The aim of this study was to evaluate technological effects of the use of CO₂ dissolved in the milk after pasteurization process to make Prato cheese. The experiments were carried out with CO₂ incorporation in pasteurized milk by CO₂ injection under maximum pressure of 25 psi at 8° C until to reach pH 6.00, besides the control cheeses (without CO₂ injection). This procedure was performed four times. The cheese making times, physicochemical properties, cheese yield, changes during the storage time, sensory acceptability, preference and microstructure analysis were determined in both cheeses. It was observed that the CO₂ injection reduced Prato cheeses pH, wich showed significant reductions in coagulation and total cheeses making times. The CO₂ injection also reduced the moisture and the percentage of fat loss in the whey serum, did not affect the lactic acid fermentation, and did not change the microbial count. Prato cheese treated with CO₂ did not show changes in the proteolysis indexes. Due to their larger whey loss and more compact microstructure. The cheese showed higher firmness and brittleness when compared to the control cheese. Protein matrix porosity and cheese draining also increased. There was no significant difference ($p > 0.05$) in preference and sensory acceptability among treatments.

Keywords: Carbon dioxide. Preacidification. pH.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A: Sistema de injeção de CO₂ para leite utilizado no experimento; B: medição do pH do leite carbonatado; C: manômetros de baixa pressão e de pressão da garrafa de gás CO₂.....28
- Figura 2** – Fluxograma de fabricação do queijo Prato.....30
- Figura 3** – Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação e preferência, adaptado de Minim (2006).....36
- Figura 4** - Evolução do pH durante a fermentação do queijo Minas Padrão.....46
- Figura 5** – Evolução do teor de umidade ao longo do armazenamento do queijo Prato em função dos diferentes tratamentos, com CO₂ e controle49
- Figura 6** – Média do comportamento da extensão da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Prato em função dos tratamentos.....50
- Figura 7** – Média da profundidade da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Prato dos diferentes tratamentos.....51
- Figura 8** – Contagens de coliformes a 35°C ao longo do tempo para os tratamentos no queijo Prato.....53
- Figura 9** – Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras ao longo do tempo para os tratamentos no queijo Prato.....55
- Figura 10** – Micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos Prato submetidos aos tratamentos; (A-1) queijo tratado com CO₂, magnitude 1500x, (A-2) queijo tratado com CO₂, magnitude 2000x, (B-1) queijo do tratamento Controle, magnitude 1500x, (B-2) queijo do tratamento Controle, magnitude 2000x. Amostras visualizadas aos 27 dias de estocagem.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das análises realizadas para o leite e para o soro de leite dos dois tratamentos.....	37
Tabela 2 – Resumo das análises realizadas para o queijo dos dois tratamentos	37
Tabela 3 – Composição físico-química média do leite utilizado para a fabricação dos queijos Prato no experimento.....	38
Tabela 4 – Composição físico-química média dos queijos Prato dos diferentes tratamentos.....	40
Tabela 5 – Análise de rendimento da produção do queijo Prato controle e tratado com CO ₂	42
Tabela 6 – Teor médio de cálcio livre do leite e do soro dos tratamentos controle e com CO ₂	43
Tabela 7 – Teor médio de cálcio inorgânico total do queijo dos tratamentos controle e com CO ₂	44
Tabela 8 – Média dos tempos cronometrados durante a fabricação para os dois tratamentos utilizado na fabricação do queijo Prato	45
Tabela 9 – Valores médios de pH para os queijos Prato dos dois tratamentos para todos os tempos avaliados.....	47
Tabela 10 – Notas médias dos provadores na escala hedônica de nove pontos durante o tempo de estocagem refrigerada para os dois tratamentos.....	56
Tabela 11 – Valores médios de perfil de textura (TPA) para os tratamentos para o queijo Prato.....	60

Tabela 12 - Perfil de textura ao longo do tempo de estocagem dos queijos Prato tratado com os diferentes métodos de incorporação de CO ₂	61
---	----

LISTA DE APBREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentual;

% m/m – percentual de massa em relação à massa;

°C – graus Celsius (unidade de temperatura);

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Atm – Atmosfera

B.O.D - American Lab BOD AL200

Ca²⁺ - Íon cálcio

CCS – Contagem de Célula Somática

CO₂ - Dióxido de carbono

CO₃⁻² - Ânion carbonato

DP - Desvio padrão

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais;

EST - Extrato seco total

FA – fase aquosa;

FCC – fosfato de cálcio coloidal;

g ST/L - Gramas de sólidos totais por litro de leite trabalhado

GES - Gordura no extrato seco total

GRAS - “Generally Recognized as Safe”- Geralmente Reconhecido como Seguro

Coeficiente GL - Gramas de sólidos totais por litro de leite trabalhado

h – hora (unidade de medida de tempo);

H⁺ - Íon hidrogênio

H₂CO₃ - Ácido carbônico

HCl - Ácido clorídrico

HCO₃ - Ânion bicarbonato

kg – quilograma (unidade de medida de massa);

kgf/cm² - Quilogramas força por centímetro quadrado

kV - Tensão de aceleração de voltagem

L – litro (unidade de medida de volume);

L/kg A - Rendimento em litros por quilo ajustado

m/m - Massa/massa

m/v - Massa/volume

Mg - Magnésio

Min - Minuto

mL – mililitro (unidade de medida de volume);

mm/s - Milímetro por segundo

mol/L - Mol por litro

N - Newton

n - Número de repetições

NMP - Número Mais Provável por grama

NS TCA 12 % - Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12% (m/m)

NSLAB - *Non Starter Latic Acid Bacteria*;

NT - Nitrogênio total

P - Fósforo

p – valor p estatístico;

Pa - Pascal

pH – potencial hidrogeniônico;

R² - Coeficiente de correlação

RDC - Resolução da Diretoria Coletiva

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem .
Animal;

RMF - Resíduo Mineral Fixo

RTIQQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos;

TCA - Ácido tricloroacético

TPA - Análise do perfil de textura

UFC - Unidade formadora de colônia

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora;

UFV – Universidade Federal de Viçosa;

µm - micrômetros (unidade de medida de comprimento);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Queijo Prato.....	18
2.1.1 Características físicas, químicas e físico-químicas do queijo Prato.....	19
2.2 O dióxido de carbono CO ₂ e sua utilização na produção de queijos	21
2.2.1 CO ₂ e suas características.....	21
2.2.2 Utilização do CO ₂ na produção de queijos e seus efeitos tecnológicos...	22
2.2.3 O CO ₂ em estudos e pesquisas em leite e derivados.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Localização.....	25
3.2 Testes preliminares	26
3.3 Delineamento estatístico e análise dos resultados	26
3.4 Sistema de injeção e as condições de carbonatação	27
3.5 Fabricação do queijo Prato	28
3.5.1 Análise físico-química do leite e do soro.....	31
3.5.2 Análise físico-química do queijo Prato.....	31
3.5.3 Análise do rendimento da fabricação.....	32
3.5.4 Análise microbiológica do leite e do queijo.....	34
3.5.5 Análise microestrutural.....	35
3.5.6 Análise sensorial.....	35
3.5.7 Análise do perfil de textura (TPA).....	36
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	37
4.1 Composição físico-química do leite.....	38
4.2 Composição físico-química dos queijos após a fabricação.....	39
4.3 Análise do rendimento da fabricação.....	41
4.4 Efeito do uso de CO ₂ no teor de cálcio livre do leite e do soro e no teor de cálcio inorgânico total dos queijos dos diferentes tratamentos.....	43
4.5 Efeito do uso de CO ₂ nos tempos de fabricação.....	44
4.6 Fermentação do queijo e evolução do pH durante o tempo de armazenamento.	46

4.7 Evolução do teor de umidade durante o tempo de armazenamento.....	48
4.8 Extensão e profundidade da proteólise em função do tempo.....	49
4.9 Análises microbiológicas.....	52
4.9.1 Análise microbiológica do leite.....	52
4.9.2 Análise microbiológica dos queijos.....	52
4.9.2.1 Contagem de coliformes totais durante a estocagem.....	53
4.9.2.2 Contagem de fungos filamentosos e leveduras durante a estocagem	54
4.10 Análise sensorial.....	55
4.10.1 Aceitação sensorial	55
4.10.2 Teste de preferência sensorial.....	56
4.11 Análise microestrutural.....	57
4.12 Características mecânicas (TPA).....	59
5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63

1. Introdução

As mudanças do início da década de 90, com a abertura da economia, liberação de preços e o plano de estabilização, foram motivos de vários estudos, trouxeram modificações importantes para toda a cadeia agroindustrial do leite, aumentando os investimentos no setor. Dessa forma, o mercado lácteo vem sofrendo diversas mudanças, contribuindo para o crescimento econômico interno e externo das indústrias de laticínios que vem crescendo cada vez mais em todo o mundo.

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do calho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Entre os queijos brasileiros, o Prato é um dos mais fabricados, sendo considerado uma “commodity” no mercado. É um produtos de grande importância na economia, pois possui cotação e “negociabilidade” global. No ano de 2010 a comercialização do queijo Prato representou 19 % do mercado brasileiro de queijos. No mesmo ano, o queijo Prato ficou sendo o segundo queijo mais fabricado no Brasil, com um volume no total de 152.300 t, apresentando um aumento de 8% comparado ao ano anterior (ABIQ, 2011)

As dificuldades encontradas na exportação e os problemas com a produção de queijos no Brasil estão relacionados principalmente com a baixa qualidade do leite, as condições de fabricação, a falta ou ineficiência da cadeia de frios, além da baixa competitividade industrial e eficiência na produção de queijo.

O dióxido de carbono CO_2 está presente na natureza como um gás livre na atmosfera ou como sais e compostos na forma de carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio e outros mais. Em pressões e temperatura normais, o dióxido de carbono se apresenta como um gás incolor, inodoro, não combustível, não tóxico e levemente ácido (JACOBS, 1959).

Nos alimentos com alto teor de umidade, o CO_2 pode se dissolver na fase aquosa, formando ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia nas espécies iônicas bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}) e hidrogênio (H^+). É considerado inócuo ao consumo humano, sendo classificado como substância GRAS (Generally Recognized as Safe), conforme descrito no Codex Alimentarius (LOSS e HOTCHKISS, 2003). A pré-acidificação do leite com CO_2 para a fabricação de queijos e outros produtos lácteos pode gerar benefícios tecnológicos e econômicos. Ao contrário de outros ácidos, uma boa parte do ácido carbônico formado pela solubilização do CO_2 é perdida durante o processo de fabricação de queijos podendo ser removido por processos de centrifugação ou degaseificação a vácuo, sem causar nenhum tipo de efeito prejudicial para o processo de fabricação de alimentos. O CO_2 apresenta solubilidade no leite mesmo durante o processo de fabricação de queijos de massa crua, em temperaturas de 38 °C, podendo permanecer nos produtos durante a maturação, estocagem e distribuição.

Podem ser observados vários efeitos na tecnologia e no produto final, quando se utiliza a pré-acidificação do leite para fabricação de queijos. Vários autores têm relatado efeitos tecnológicos tais como; diminuição do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada, maior liberação de soro, redução da dose de coalho, melhor controle do processo e alterações no rendimento (NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a).

A injeção de CO_2 é feita normalmente através da linha de alimentação do tanque de fabricação, calculando a taxa de injeção e o tempo de contato com o leite no momento em que o sistema for instalado, medindo o teor de CO_2 pelo pH final do leite (PAULA, 2010).

Assim, devido aos efeitos benéficos relatados pela literatura, esse trabalho teve como objetivo geral, avaliar, em escala piloto, os impactos da utilização de CO_2 dissolvido no leite pasteurizado para a fabricação de queijo Prato. Os objetivos específicos foram avaliar os efeitos do CO_2 nos aspectos tecnológicos de fabricação, na capacidade de acidificação do fermento láctico, no rendimento de fabricação, nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, na evolução dos índices de proteólise durante a maturação e armazenamento e no perfil de textura e microestrutura do queijo.

2. Revisão de literatura

2.1 Queijo prato

O queijo Prato é um queijo tipicamente brasileiro, classificado como queijo gordo, com média umidade, se assemelhando bastante ao queijo Gouda em relação à textura e características químicas. O queijo consiste em um concentrado protéico-gorduroso resultante da coagulação das proteínas do leite, seguida da dessoragem do coágulo, ocorrendo decréscimo de umidade. Na dessoragem ocorre perda de proteínas e de gordura do leite, assim como lactose e sais minerais (STEFFENS *et al.*, 2005).

A fabricação do queijo Prato começou a surgir no Brasil na década de 20 na região do sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses. Ao longo desses anos, este produto foi sofrendo inúmeras modificações, seja no processo tecnológico de produção ou na maneira como é consumido (BASTOS *et al.*, 2013). A tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada de acordo às condições locais e regionais, o que explica as diferenças de sabor e abertura de massa observada no Prato em relação aos queijos que lhe deram origem. O queijo Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares ou irregulares, como também completamente fechado (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijo Prato (BRASIL, 1997), entende-se por Prato, o queijo maturado obtido pela coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, além disso é classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida e lavada, possui um sabor suave e consistência macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Ao final do processo de fabricação, o queijo Prato deve ser maturado por no mínimo 25 dias.

Atualmente o queijo Prato está entre os queijos mais consumidos no Brasil, mantendo o consumo em destaque na forma de sanduíches ou como ingrediente culinário. Esse tipo de queijo, assim como a maioria dos queijos produzidos no País, é fabricado a partir de leite pasteurizado. Existe uma grande variedade de queijo Prato no mercado, com as mesmas características físico-químicas, se diferenciando pelo formato e peso (DE RENISIS; PETENATE; VIOTTO, 2009a). No caso do queijo

Prato, não apenas a textura, mas também o sabor são atributos importantes na determinação da qualidade (BARROS *et al.*, 2006).

2.1.1 Características físicas, químicas e físico-químicas do queijo Prato

A composição média esperada encontrada no queijo Prato varia de 42 a 44% de umidade, 26 a 29% de gordura, pH entre 5,2-5,4 e teor sal entre 1,6 a 1,9% (SILVEIRA, 2009).

Segundo Furtado (1990), a relação caseína/gordura (C/G) tem sido bastante recomendada como recursos para padronização do queijo Prato, considerando as composições dos leites entre as diferentes raças e estações do ano. Podemos considerar que a caseína é o componente do leite que mais afeta a concentração dos demais, sendo que a padronização do leite com base na relação C/G oferece resultados bastante exatos, sendo muito utilizada usada nos Estados Unidos na fabricação de queijo Cheddar.

De Rensis *et al.*, (2009b) citam que é desejável que um queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura seja similar em sabor, firmeza e textura ao queijo integral. A textura dos queijos é afetada por mudanças na composição, microestrutura, estado físico-químico dos componentes do queijo, força das interações entre os elementos estruturais que o compõem e de sua macroestrutura.

A acidificação utilizada na fabricação de queijos pode ser obtida através do emprego de culturas lácticas. O fermento láctico normalmente utilizado no processamento de queijo Prato é do tipo "O", composto pelas cepas dos seguintes microrganismos: *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. As culturas homofermentativas mesofílicas são as principais culturas responsáveis pela acidificação durante a etapa do processo de fabricação do queijo. Essas culturas fermentam a glicose, produzindo exclusivamente ácido láctico L (+). Opcionalmente pode ser utilizadas culturas "LD" para elaboração de queijo Prato com olhaduras. O *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, presente nesse tipo de fermento, é heterofermentativo e produz elevada concentração de acetoína e diacetil a partir de citrato, compostos estes que proporcionam o aroma do queijo Prato. O *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* apresenta também um metabolismo heterofermentativo, produzindo, a partir da glicose os ácidos láctico e

acético, etanol e CO₂, que pode conferir ao queijo Prato uma pequena formação de olhaduras (Mc SWEENEY, 2004).

Uma característica físico-química importante é a textura da massa do queijo Prato, podendo-se afirmar que a massa é a base das principais particularidades de um queijo, na qual exerce uma função diferenciada na sua estabilidade (tamanho, forma, peso), na sua conservação (durabilidade e tipo de maturação), na diferenciação do próprio tipo (massa mole, semidura ou dura) e na apreciação da sua qualidade (SKELLAND, 1967).

O teor de umidade do queijo prato também tem impacto determinante na textura da massa, a água pode se ligar à caseína mais ou menos fortemente durante a produção de ácido láctico. De um modo geral, em queijos com 5 a 10 dias de fabricação, não se encontra mais água livre entre os grãos, através desta integração, a armadura de caseína se torna menos firme instabilizando os teores de caseína e gordura, dessa forma quanto mais elevado o teor de umidade da massa, mais macia será a consistência (NETO, 2002).

Outra importante observação para melhoria das características física, química e físico-química do queijo Prato é a qualidade do leite usado na produção. O aquecimento do leite por exemplo, afeta o equilíbrio de distribuição dos sais de cálcio ocasionando a diminuição da solubilidade do cálcio e precipitação do fosfato de cálcio, que causa um impacto na firmeza do gel obtido na coagulação (JERONIMO, 2005).

De acordo com Walstra & Jenness (1984), as diversas aplicações de calor ao leite causou modificações significativas no leite, tendo como principais modificações: eliminação de gases, incluindo CO₂; o aumento da quantidade de fosfato coloidal que diminui a concentração de [Ca²⁺], sendo modificações reversíveis após longo período de tempo; isomerização da lactose, que sofre degradação parcial, formando lactulose e ácidos orgânicos; hidrólise dos ésteres fosfóricos, particularmente os das caseínas; diminuição do pH do leite e aumento do valor de sua acidez; insolubilização de grande parte das proteínas do soro devido à desnaturação; inativação de enzimas; reação entre as proteínas e a lactose, especialmente a reação de Maillard, tendo como consequência à diminuição da lisina disponível; formação de grupos sulfidril livres; agregação das micelas de caseína, podendo ocasionar coagulação; formação de lactonas e metilcetonas a partir da gordura; degradação de algumas vitaminas.

2.2 O dióxido de carbono CO₂ e sua utilização na produção de queijos

2.2.1 CO₂ e suas características

O dióxido de carbono é um gás incolor, inodoro, não combustível, não tóxico e levemente ácido em pressões e temperaturas normais, apresentando as seguintes propriedades físicas e químicas; Massa molecular: 44,01 g/mol, densidade relativa = 1,519 g/L (densidade do ar = 1 g/L) a 21 °C, temperatura crítica = 30,9 °C, pressão crítica = 75,34 kgf/cm², volume específico = 0,55 m³/kg, temperatura de ebulição = - 78,5 °C, temperatura de sublimação = - 56,6 °C, massa específica a 21 °C e a 1 atm = 1,833 kg/m³. Já nos alimentos, na qual possui um alto teor de umidade, o CO₂ pode se dissolver na fase aquosa, formando o ácido carbônico (H₂CO₃) desassociando nas espécies iônicas bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃⁻²) e hidrogênio (H⁺) (PAULA, 2010).

O CO₂ ao entrar em contato com a água pode baixar o pH devido à formação de ácido carbônico resultante da dissolução do CO₂ na fase aquosa. Em determinadas condições podemos verificar uma relação linear que ocorre entre a pressão parcial de um gás na fase gasosa e a sua concentração na fase aquosa, classificada como Lei de Henry. No caso da solubilização de CO₂ em água, teremos a seguinte fórmula:

$$K_H(T) = \frac{[\text{CO}_2^*]}{P_{\text{CO}_2}}$$

Nesse caso, K_H(T) é a constante da Lei de Henry (sendo a função da temperatura), em mol.L⁻¹ atm⁻¹, [CO₂*] é a concentração de CO₂ na fase aquosa, em mol.L⁻¹ e P_{CO₂} é a pressão parcial de CO₂ na fase gasosa, em atm. O efeito da solubilidade do gás no líquido decresce de acordo com o aumento da temperatura. Especificamente o CO₂, o valor de K_H(T) será superior ao da maioria dos gases, por motivo do aumento da capacidade de absorção na qual está se associando à reação química que ocorre entre o meio líquido (MAIA; RAMOS, 2004).

2.2.2 Utilização do CO₂ na produção de queijos e os efeitos tecnológicos

Loss e Hotchkiss (2000) afirmam que a adição de dióxido de carbono ao leite pasteurizado pode contribuir para a melhora da otimização do processo de fabricação e conservação de queijos, não só pelo abaixamento do pH do leite no início do processo de fabricação, como também por controlar o crescimento de alguns grupos de microrganismos.

O CO₂ ao ser dissolvido no meio aquoso pode retardar a multiplicação de microrganismos, sendo eles Gram-positivos e Gram-negativos, no entanto, seu efeito inibidor pode variar em função do microrganismo e da fase na qual ele se encontra perante a curva de crescimento. O uso do dióxido de carbono tem uma função de grande importância na validade comercial dos alimentos perecíveis, processo esse que ocorre através da inibição de inúmeras enzimas, sejam elas naturais ou microbianas (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

O abaixamento do pH externo pode contribuir no aumento da permeabilidade celular, facilitando dessa forma a passagem do CO₂ para o interior das células microbianas. Segundo os autores responsáveis, isso provavelmente explica o motivo pelo qual o CO₂ pode penetrar nas células microbianas a uma taxa muito mais rápida do que outras moléculas que não produzem acidificação da solução. No entanto, pode se afirmar que o efeito direto do CO₂ (não hidratado) sobre a membrana seja provavelmente mais importante para explicar sua elevada taxa de penetração nas células bacterianas (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2007).

Paula (2010), cita que o equilíbrio da reação é determinado pelo pH presente na fase aquosa. Dessa forma a solubilidade do CO₂ aumenta de acordo com o aumento no pH, sendo mais visível em valores de pH elevados. Sendo assim, afirma-se que o pH ou até mesmo o poder do tamponante que se encontra no meio no qual o CO₂ é dissolvido irá afetar o mecanismo de ação, tendo destaque o teor de ácido carbônico dissolvido no meio (PESTANA, 2007).

A aplicação de CO₂ sob pressão durante todo o processo do tratamento térmico do leite pode reduzir de maneira considerável o tempo requerido para a esterilização ou pasteurização, de tal forma a minimizar a degradação térmica de substâncias sensíveis, com destaque as vitaminas (ERKMEN, 2001).

A adição de CO₂ por meios artificiais abaixa o pH do leite e resulta em diminuição do tempo de coagulação. Esse efeito pode ser usado para se obter o

mesmo tempo de coagulação com menor quantidade de coalho. A injeção de CO₂ normalmente é feita na linha de alimentação do tanque de fabricação sendo que a taxa de injeção e o tempo de contato com o leite antes de misturar o coalho tem de ser calculados quando o sistema for instalado. Queijarias que utilizam o dióxido de carbono relatam que a quantidade de coalho pode ser reduzida pela metade sem efeitos adversos, o que seria uma grande vantagem do ponto de vista econômico. Alteração do pH do leite, especialmente por acidificação, constitui etapa fundamental para uma série de processos tecnológicos de fabricação, sendo que durante a diminuição de pH, mudanças podem ocorrer na composição e, portanto, na estrutura micelar (PAULA, 2006).

Pesquisas apontam que a concentração de 0,119 mol/L de CO₂ contribui para na multiplicação de esporos de *Bacillus cereus* no leite durante o período estocagem prolongada reduzindo o pH do leite de 6,61 para 6,31. No entanto, os dados sugerem que a adição de moderados níveis de CO₂ inibem a germinação desses esporos de *Bacillus cereus*, durante longos períodos de estocagem, diminuindo o risco de doenças alimentares por esses microrganismos (WERNER E HOTCHKISS, 2002).

2.2.3 O CO₂ em estudos e pesquisas em leite e derivados

Estudos vêm reforçando a importância da utilização de CO₂ na indústria de laticínios, em especial nas indústrias queijeiras: amostra de leite cru estocada a 7°C e tratada com CO₂, aumentou em horas no tempo requerido para dobrar a contagem total de aeróbios mesófilos em relação ao leite não tratado (PAULA *et al*, 2008).

Erkemen (2001) cita que, o número de coliformes, psicrotróficos e aeróbios (facultativos e obrigatórios) foi significativamente mais baixo no leite cru tratado do que em leite não tratado sendo ambos incubado a seis °C por seis dias. O tratamento a 100 *bar* de pressão de CO₂ por sete horas causou a diminuição de 6,42 e 7,24 ciclos log na população de *E.coli* em leite integral e leite desnatado respectivamente.

Ao estudar a adequabilidade de leite conservado por refrigeração e adição de CO₂ para fabricação de iogurte, Gueimonde et al. (2003), concluiu que a capacidade de multiplicação e acidificação da cultura starter bem como a evolução da acidez não foi afetada pela prévia refrigeração e adição de CO₂ no leite cru ou por resíduos

de CO₂ presente no leite pasteurizado. Contudo, a refrigeração aumentou a produção de etanol e diacetil, porém, não ocorreu diferença nas propriedades sensoriais durante a estocagem refrigerada entre o iogurte fabricado com leite tratado com CO₂ e o controle. Dessa forma os autores concluíram que o leite refrigerado acidificado com CO₂ poderia ser satisfatoriamente usado na fabricação de iogurte.

Werner & Hotchkiss (2002) pesquisaram o efeito do dióxido de carbono no crescimento de esporos de *Bacillus cereus* no leite durante a estocagem prolongada e concluíram que a adição de 11,9 mM de CO₂ reduziu o pH do leite de 6,61 para 6,31. Os dados mostrados na pesquisa sugerem que a adição de moderados níveis de CO₂ não aumentam a germinação de esporos de *Bacillus cereus*, durante longos períodos de estocagem dessa forma não aumentam o risco de doenças alimentares causadas por esses microrganismos.

Ao estudar a inibição de *Bacillus cereus* em leite bifidus fermentado carbonatado, Noriega et al. (2003) relatou que a população de *Bifidobacterium infantis* não foi afetada pela presença de CO₂ e a população de *Bacillus cereus* foi reduzida dois ciclos log em 12 horas de incubação em leite carbonatado, a 37 °C. Os autores concluíram que o uso de leite acidificado com dióxido de carbono não afetou as propriedades sensoriais do produto. Dessa forma, a carbonatação de leite, tratado termicamente, antes da adição de bifidobactéria pode contribuir para reduzir o risco de contaminação de leite bifidus por *Bacillus cereus*.

Ma, Barbano e Santos (2003) ao estudar o efeito da adição de CO₂ na proteólises e lipólises do leite cru a temperatura de 4°C observaram que o leite com contagem de célula Somática – CCS, tanto alta quanto baixa, apresentou crescimento microbiológico inibido. A proteólise e a lipólises foram ocasionadas por enzimas endógenas. O autor conclui que a redução do pH do leite pela adição de CO₂ ou do HCL explica a redução na proteólises. Nenhum efeito da carbonatação ou acidificação do leite foi observado na lipólise nos leites preservados com alta e baixa CCS. A adição de CO₂ no leite cru diminuiu a proteólise através de pelo menos dois mecanismos: a redução das proteases microbiológicas devido a um crescimento microbiológico reduzido e uma possível redução da atividade da protease endógena devido ao baixo pH do leite.

Ma e Barbano (2003) estudaram o efeito do pH no ponto de congelamento do leite submetido a adição de CO₂. Nesse estudo observaram que tanto a caseína

quanto as soro proteínas aumentaram a capacidade de tamponamento do leite. Na mesma concentração de CO₂ a 0°C o leite com maior concentração de soro proteína e caseína teve maior resistência a mudança de pH e melhor extensão no decréscimo do ponto de congelamento. Os autores concluíram também que o CO₂ dissolvido na porção desnatada do leite, a extensão da redução do pH e a diminuição do ponto de congelamento dependeu da concentração e do tipo de proteína, ou seja, soro proteína ou caseína.

Guillaume *et al*, (2002) investigaram o efeito da suplementação de sal na composição micelar do leite desnatado reconstituído e submetido à acidificação por pressão de CO₂ com pH de 5,8, seguido por despressurização sob vácuo, concluíram que o cálcio o qual foi adicionado ao leite na concentração de 0 mmol/kg a 25 mmol/kg de leite com pH ajustado a $6,65 \pm 0,02$, foi um fator determinante que favoreceu o aumento na concentração dos constituintes micelar; Ca, P, Mg e das proteínas da fase solúvel. Os autores citaram também, que a adição de Ca em concentração menor que 17,5 mmol/kg de leite favoreceu a remoção de Ca, P, Mg e proteínas da fase solúvel para a fase micelar.

3. Material e métodos

3.1 Localização

Os experimentos foram realizados em escala piloto nas dependências do núcleo industrial do Centro de Pesquisa do Instituto de Laticínios Cândido Tostes da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG (CEPE/ILCT/EPAMIG), em Juiz de Fora, Minas Gerais. As análises físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e de perfil de textura foram realizadas nos laboratórios do CEPQ/ILCT/EPAMIG. As análises de cálcio foram realizadas no Laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora e no laboratório de qualidade do leite na EMBRAPA, as análises microestruturais foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2 Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados com o mesmo volume de leite utilizado no experimento (50 litros). Estes testes foram feitos para determinar a pressão, o pH ideal, a quantidade de CO₂ a ser adicionada no leite e as modificações no processo de fabricação. Durante os testes preliminares foram também testados dois tratamentos: controle (sem CO₂) e com a adição de CO₂. No pré-teste verificamos que o leite com o pH inferior a 6.0 prejudicava a fabricação dos queijos, uma vez que, começa a ocorrer a coagulação do leite devido ao pH próximo ao seu ponto isoelétrico.

3.3 Delineamento estatístico e análise dos resultados

Os experimentos foram conduzidos em quatro repetições, no delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, sendo o fator CO₂ alocado nas parcelas e os tempos de estocagem como subparcelas. Foi realizado o desdobramento da análise de variância para estudar o comportamento da variável ao longo do tempo, através da análise de regressão. Em vista disso, foram feitas análises de variâncias para verificar os efeitos principais de tratamento, do tempo e da interação entre tratamento e tempo. Nos casos onde houve efeito significativo de tempo, o desdobramento foi feito através da análise de regressão que permitiu fazer interpolações para quaisquer tempos, dentro do intervalo estudado. Foi utilizada também a estatística descritiva para apresentação, avaliação e discussão dos resultados. As análises foram realizadas com o auxílio do programa MINITAB, versão 14 (STATISTICAL SOFTWARE. MINITAB INC., 2003).

Os queijos Prato foram fabricados com 50 litros de leite em cada fabricação. O experimento foi montado com dois tratamentos: A) injeção de CO₂ até pH 6,0 abaixo desse pH o leite começa a coagular interferindo no processo B) tratamento controle (sem CO₂). O fluxograma de fabricação dos queijos, a pressão de injeção de CO₂, o pH ideal, a quantidade de CO₂ a ser adicionada no leite e as modificações tecnológicas no processo de fabricação foram definidas por meio de testes preliminares realizados no núcleo industrial do ILCT/EPAMIG.

As hipóteses de interesses estudadas foram:

1) A incorporação do CO₂ (tratamentos):

Ho: injeção de CO₂ = controle (sem CO₂);

2) As características do produto durante o tempo de armazenamento (dias de estocagem):

Ho: 4 = 30 = 60 = 90 = 120 dias, para o queijo prato;

3) A interação entre os dois fatores de estudo: tratamento (CO₂) x tempo

Ho: O comportamento das características do produto ao longo do tempo é o mesmo para cada tratamento (com e sem incorporação de CO₂).

3.4 Sistema de injeção e as condições de carbonatação

O leite foi padronizado para 3,2% (m/v) de gordura, pasteurizado a 65°C/30 min e resfriado rapidamente a 5°C. Após esse procedimento o leite foi transferido para o carbonatador de aço inoxidável tipo *Post Mix* com capacidade de 19 litros ou 5 galões, com pressão máxima de serviço de 14 kg/cm² ou 130 PSI (marca: Cornelius Equipamentos para Bebidas LTDA) na qual foi realizada a injeção de CO₂ em três bateladas de aproximadamente 17 L de leite a 5°C com, pelo menos, 15 minutos de tempo de contato para incorporação de CO₂. A injeção de CO₂ adicionada ao leite foi controlada em função da leitura de pH do leite no próprio carbonatador na qual se realizou a injeção de CO₂. A Figura 1 mostra o sistema de carbonatação utilizado no experimento.

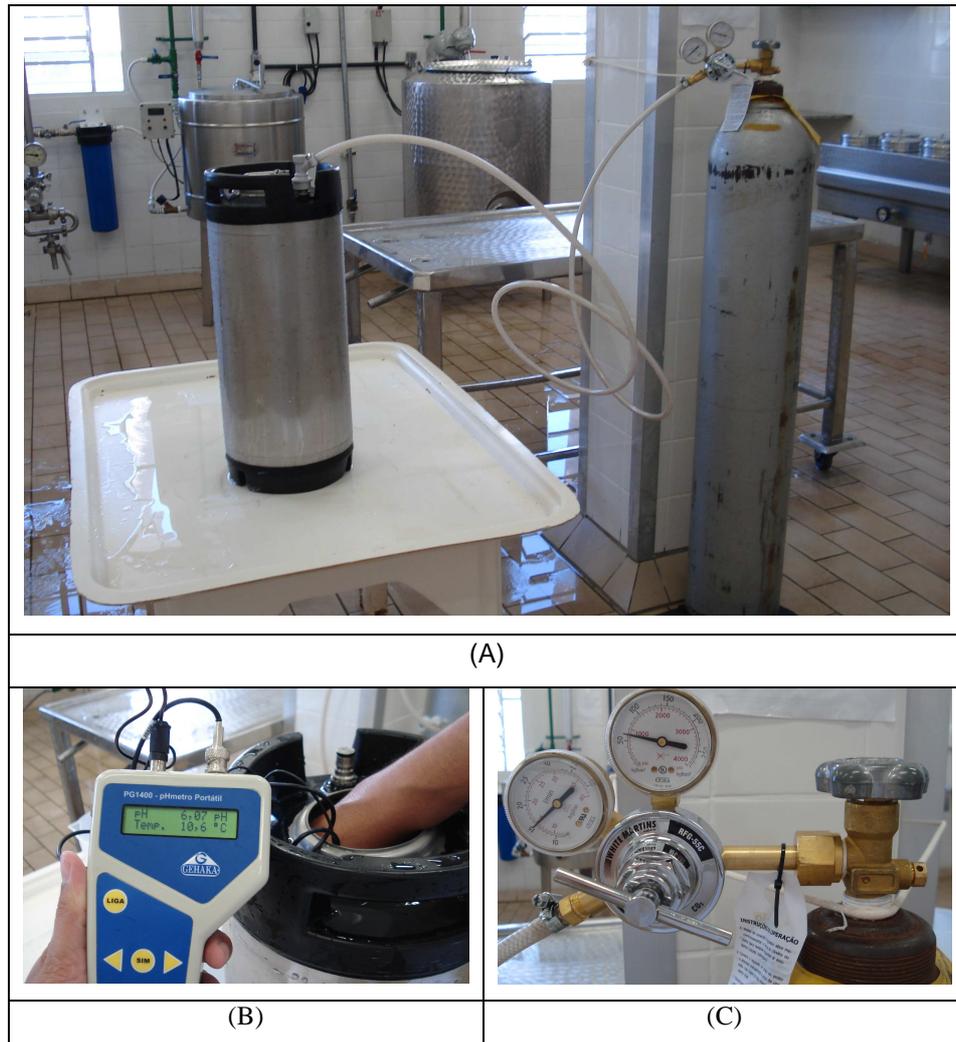


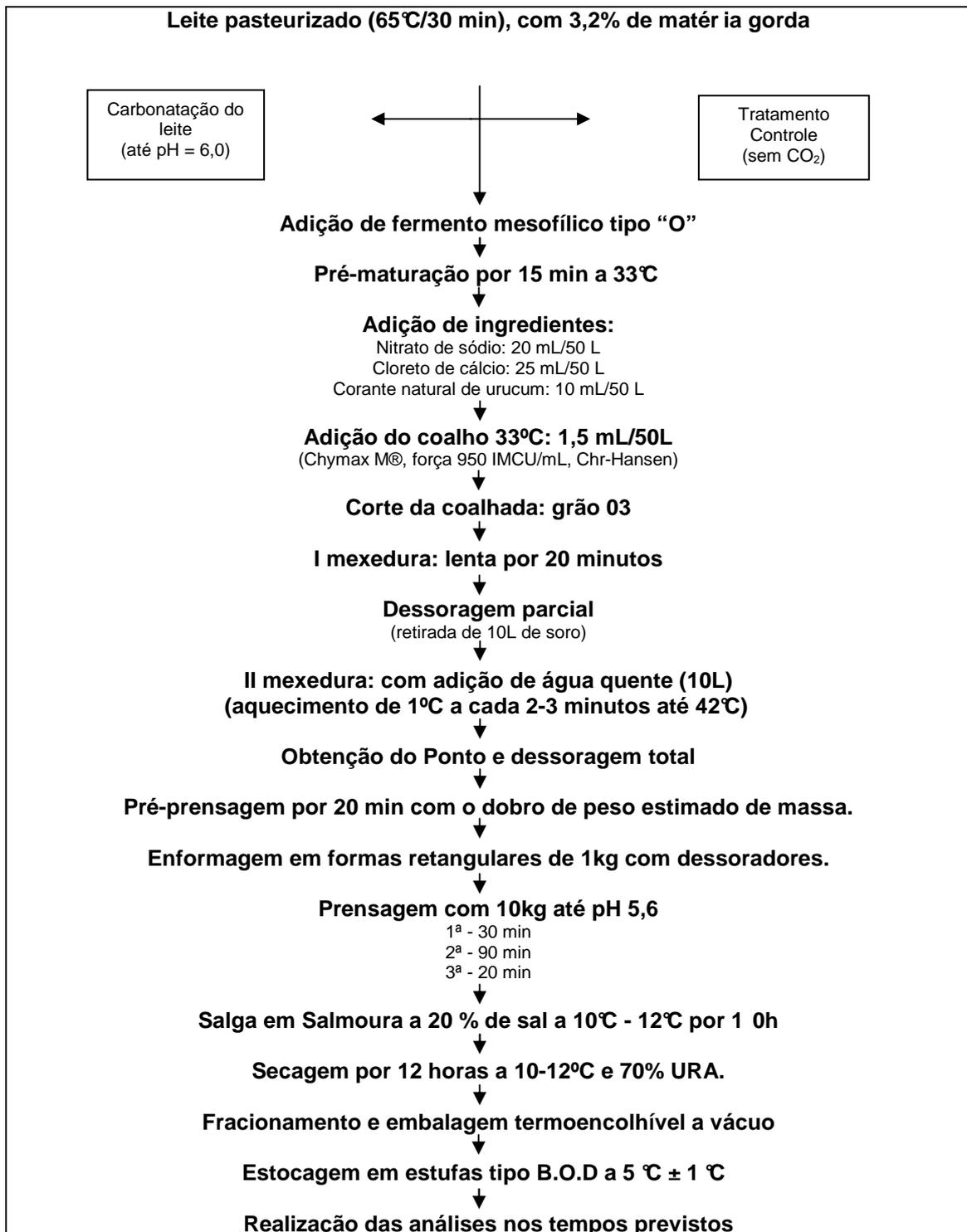
Figura 1 – A: Sistema de injeção de CO₂ para leite utilizado no experimento; B: medição do pH do leite carbonatado; C: manômetros de baixa pressão e de pressão da garrafa de gás CO₂.

3.5 Fabricação do queijo Prato.

Para a fabricação do queijo Prato, foram utilizados 50 L de leite padronizado para 3,2 % (m/m) de gordura, pasteurizado a 65°C/30 min e carbonatado até pH 6,0, para o queijo do tratamento com CO₂, logo após foi inoculado no leite o fermento láctico com cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, 2,5μ para 50 litros de leite. Após 15 minutos de pré-maturação a 32°C, foi adicionado o nitrato de sódio (50% m/v) (Produto Macalé LTDA), 20 mL para cada tanque de fabricação. Em seguida foi adicionado o cloreto de cálcio

(Produtos Macalé LTDA), 25 mL da solução a 40 % (m/v) e o corante natural de urucum (Chr-hansen®) 10 mL para cada 50 L. Logo após a temperatura foi ajustada para 33°C e então se procedeu à coagulação, usando 1,5 mL de coagulante (Chymax M®, Chr-Hansen) sendo mantida a mesma quantidade de coagulante para os diferentes tratamentos. O tempo de coagulação foi cronometrado no momento da adição do coagulante até que a coalhada se tornasse firme o suficiente para realização do corte. Após o tempo necessário para a coagulação, a coalhada foi cortada lentamente, por meio de liras horizontal e vertical, em grãos de número 03 e deixada em repouso por 5 minutos. O tempo da primeira mexedura foi fixada em 15 minutos. Após os 15 minutos de mexedura foram retirados 20% do soro e adicionados lentamente 20% de água em temperatura de 80°C, aquecendo até 42°C e continuando o processo de mexedura até obtenção do ponto. Após a obtenção do ponto foi realizada a dessoragem seguida da pré-prensagem com o dobro do peso estimado de massa por 15 minutos. Logo em seguida a massa foi enformada em formas de queijo Prato de 1 kg com dessoradores na tampa e no corpo para a realização da etapa de prensagem em prensa coletiva manual com pesos de 10 kg. A prensagem foi feita com quatro viragens nos seguintes tempos: após 90 min, 60 min, 30 min e 10 min sem dessoradores, quando foram deixados fermentar até pH alvo de 5,6. Os queijos foram então salgados em salmoura a 20 % (m/v) de sal em temperaturas entre 10 °C a 12 °C por 10 horas e em seguida as peças foram secadas na mesma câmara por 12 horas e fracionadas em quatro fatias de aproximadamente 200g cada, quando então foram embalados em embalagens plásticas de polietileno termoencolhível a vácuo e armazenadas em estufas tipo B.O.D (American Lab BOD AL200) a 5 °C ± 1 °C para a realização das análises nos tempos previstos.

Os queijos Prato foram fabricados conforme o fluxograma de fabricação descrito a seguir.



Fonte: Adaptado de FURTADO (2005).

Figura 2 – Fluxograma de fabricação do queijo Prato.

3.5.1 Análise físico-química do leite e do soro

As análises de pH, teor percentual de gordura (m/m), sólidos totais (m/m), acidez titulável (m/v), proteína (m/m) e densidade a 15 °C do leite e do soro de leite foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). Todas as análises foram realizadas em duplicata, os resultados com alterações foram repetidos e confirmados. A determinação do teor do cálcio livre foi obtido pelo método eletroquímico, por meio do Medidor Orion® modelo 4-Star, eletrodo íon seletivo para cálcio a 25°C. O equipamento foi calibrado com solução padrão de cálcio nas concentrações de 10mg/L e 100 mg/L, conforme descrito por Pereira (2014).

3.5.2 Análise físico-química do queijo Prato

As análises físico-químicas de composição: pH, umidade, teor percentual de gordura (% m/m), NaCl (% m/m), resíduo mineral fixo (% m/m), proteína (% m/m) A_w e cálcio (m/m) foram realizadas aos 4 dias de estocagem. As análises para acompanhamento durante a estocagem dos queijos: pH, teor percentual de umidade e índices de proteólise (profundidade e extensão da maturação) foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem. As análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). As análises dos teores percentuais (m/m) de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e nitrogênio solúvel (NS) em TCA a 12 % (m/v) foram obtidos pelo método Kjeldahl, conforme a metodologia descrita por Pereira (2001).

O fator usado para o cálculo do teor percentual (m/m) de proteína com base no teor de nitrogênio total, foi 6,38, que foi utilizado para se calcular o índice de extensão da proteólise (relação % de NS pH 4,6 / NT) e o índice de profundidade da proteólise (relação % de NS TCA 12 % / NT). A determinação do teor do cálcio inorgânico total (solúvel em TCA, %, m/m) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (SILVA e QUEIROZ, 2002). Teor de percentual de gordura no extrato seco (GES) foi obtido pela relação do teor percentual de gordura dividida pelo teor percentual de sólidos totais.

3.5.3 Análise do rendimento da fabricação

Existem várias maneiras de se calcular a eficiência e o rendimento de uma determinada produção através do aproveitamento de elementos do leite na coalhada, tais como; proteínas totais, extrato seco total ou desengordurado, gorduras e outros componentes.

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

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

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

em que:

G_s = porcentagem de gordura do soro de leite;

G_l = porcentagem de gordura do leite.

- Percentual de cifra de transição de gordura no soro de leite pelo método técnico, de acordo com a Equação 2:

$$\text{Perda de gordura (\%)} = (kgl - P) G_s \times 100 / (kgl / D_l) G_l \times D_s \quad (2),$$

em que:

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

D_l = densidade a 15 °C do leite;

kgl = quilos de leite;

G_l = porcentagem de gordura no leite;

G_s = porcentagem de gordura no soro de leite;

P = produção de queijos (kg).

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

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

em que:

P_s = porcentagem de proteína do soro de leite;

P_l = porcentagem de proteína do leite.

- Percentual de cifra de transição de proteína no soro pelo método técnico, de acordo com a Equação 4:

$$\text{Perda de proteína (\%)} = (kgl - P) \times P_s \times 100 / (kgl / D_l) P_l \times D_s \quad (4),$$

em que:

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

D_l = densidade a 15 °C do leite;

Kgl = quilos de leite;

P_l = porcentagem de proteína no leite;

P_s = porcentagem de proteína no soro de leite;

P = produção de queijos (kg).

- Aproveitamento de sólidos no queijo em relação a cada litro de leite trabalhado ou Coeficiente GL (g ST/L), de acordo com a Equação 5:

$$g \text{ ST/L} = ST \times P \times 10 / V \quad (5),$$

em que:

ST = porcentagem de sólidos totais do queijo;

P = produção de queijos (kg);

V = volume de leite (L).

- Rendimento em litros de leite por quilo de queijo ajustado (L/kg A), de acordo

com a Equação 6:

$$L/kg A = V (100 - UP) / P \times ST \quad (6),$$

em que:

V = volume de leite (L);

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

ST = porcentagem de sólidos totais do queijo.

3.5.4 Análise microbiológica do leite e do queijo

As contagens de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram realizadas após quatro dias de estocagem do queijo Prato e a contagem padrão e as contagens de coliformes a 35 °C e a 45 °C e fungos filamentosos e leveduras foram realizadas durante o período de estocagem. No leite foram realizadas as contagens padrão, contagens de coliformes a 35 °C e a 45 °C e fungos filamentosos e leveduras.

As contagens microbiológicas: contagem padrão, coliformes a 35 °C, fungos filamentosos e leveduras e *S. aureus* foram realizadas, utilizando-se as técnicas de contagem em placas Petrifilm®, de acordo com a metodologia e material, citados a seguir, e com os procedimentos determinados pelo fabricante, sendo ambos indicados para análises em leite e queijos (PARK, 2004):

- Contagem padrão de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios estritos – *Petrifim Aerobic Count Plate*, 3M, NM-USA, Contagem de Aeróbios (AOAC – 990.12 – Contagem de aeróbios em alimentos, Filme Reidratável Seco);
- Contagem de coliformes a 35 °C e a 45 °C – *Petrifim E.coli/Coliform Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 991.14 – Contagem de Coliformes e *E. coli* em alimentos, película Reidratável Seca);
- Contagem de fungos filamentosos e leveduras – *Petrifim Yeast and Mold Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 997.02 – Contagem de Bolores e Leveduras em Alimentos, Filme Reidratável Seco – Método Petrifilm);

- Contagem de *Staphylococcus aureus* – *Petrim Staph Express Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 2003.08 – Método para Contagem de *Staphylococcus aureus* em Laticínios);
- Contagem de *Listeria monocytogenes* (AOAC, 1984);
- Contagem de *Salmonella* sp. (AOAC, 1984).

3.5.5 Análise microestrutural

As análises microestruturais foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV. As amostras de queijo Prato controle e queijo Prato com injeção de CO₂ foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com a metodologia utilizada por Lobato-Calleros et al (2002) e Freire (2009), com modificações. Amostras cilíndricas de 0,5 cm de diâmetro e de altura foram fixadas em solução tampão de glutaraldeído 2 (%) por seis horas, desidratadas em soluções com concentração etanólica crescente: 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % e 100 %, por um período de tempo de permanência em cada solução de 30 min e, por fim, colocadas em acetona por uma hora. Na sequência, as amostras foram congeladas em ultra-freezer em temperatura de – 80°C e levadas ao liofilizador (marca Terroni modelo LS 300). Cada amostra seca foi particionada manualmente e montada nos *stubs* (suportes porta-amostra do microscópio) com a parte fraturada voltada para cima, e então foram levadas ao pulverizador de ouro (Electron Microscopy Sciences modelo 550x) e recobertas com uma camada de ouro para evitar o colapso da superfície. Um microscópio eletrônico de varredura (Leo modelo 1430 VP, Cambridge, Inglaterra), operando com 15 kV, foi utilizado para visualização das amostras na magnitude entre 500 e 4.000 vezes.

3.5.6 Análise sensorial

Para a avaliação sensorial dos queijos foram realizados testes de aceitação sensorial utilizando-se a escala hedônica de nove pontos. Para avaliar a influência dos tratamentos na preferência dos consumidores foi utilizado o teste de preferência, segundo metodologias descritas por Minim (2006). A Figura 3 apresenta a ficha de avaliação utilizada na análise sensorial dos queijos Prato dos diferentes tratamentos.

ESCALA HEDÔNICA / PREFERÊNCIA	
Nome: _____	Data: ___/___/___
<p>Por favor, avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que reflita seu julgamento. Em seguida ordene-as de acordo com sua preferência. Atribua o número 1 para a amostra mais preferida e 2 para a segunda mais preferida . Entre cada avaliação, enxágue a boca com água e espere 30 segundos.</p>	
Código da amostra: _____	Código da amostra: _____
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Gostei extremamente <input type="checkbox"/> Gostei muito <input type="checkbox"/> Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Indiferente <input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> Desgostei muito <input type="checkbox"/> Desgostei extremamente
Ordem de preferência: _____	Ordem de preferência: _____
Observações: _____	

Figura 3 – Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação e preferência, adaptado de Minim (2006).

As amostras foram apresentadas em temperatura ambiente (25 °C), devidamente codificadas com números aleatórios de três dígitos, em pratos descartáveis, contendo aproximadamente 30 g de cada amostra de queijo. As avaliações foram realizadas durante os tempos de estocagem: 4, 30, 60, 90 e 120 dias para ambos os tratamentos por no mínimo 30 provadores não treinados.

3.5.7 Análise do perfil de textura (TPA)

As análises para a determinação do perfil de textura dos queijos foram realizadas no laboratório de Pesquisa do CEPE/ILCT/EPAMIG. Para a análise do perfil de textura, foi utilizado o Texturômetro, marca Brookfield, modelo CT3 Texture Analyzer. As condições de trabalho foram: pré-teste, teste e pós-teste nas velocidades de 1 mm/s, com distância de compressão de 40 % da parte superior da amostra. Uma sonda cilíndrica foi usada juntamente com uma célula de carga de 1

KN, movida perpendicularmente através das amostras de queijos cortados em cubo (25 mm de diâmetro e 25 mm de altura) que foram colhidas aleatoriamente do queijo inteiro. As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a firmeza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade em Newton (N), elasticidade (mm) e coesividade foram calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron - Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) x tempo (s) obtidos durante os ensaios.

A tabela 1 mostra os períodos e as análises que foram realizadas no leite e do soro do leite. A tabela 2 mostra os períodos e as análises que foram realizadas no queijo.

Tabela 1 – Resumo das análises realizadas para o leite e para o soro de leite dos dois tratamentos

Análises do leite e do soro de leite									
Tempo	Gb	Acidez	pH	D _{15°C}	ST	Ca ⁺⁺	Proteína e frações	Microbiológicas	Coleta de dados da fabricação
T0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Legenda: ST = sólidos totais; Gb = Gordura; D = densidade.

Tabela 2 – Resumo das análises realizadas para o queijo dos dois tratamentos

Análises do queijo Prato													
Tempo	pH	Um	Gb	Na-Cl	RMF	Aw	Proteína	Rendimento	Índices Proteólise	Cálcio Total	Microes- truturais	Senso- riais	Microbiológicas
D+4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
D+30	✓	✓				✓	✓		✓			✓	✓
D+60	✓	✓				✓	✓		✓			✓	✓
D+90	✓	✓				✓	✓		✓			✓	✓
D+120	✓	✓				✓	✓		✓			✓	✓

Legenda: D = Dia da fabricação; Um = umidade; Gb = Gordura; RMF = resíduo mineral mixto;

4. Resultados e discussão

Os resultados das análises realizadas neste experimento para a determinação dos efeitos do uso de CO₂ na fabricação do queijo Prato estão descritos e discutidos a seguir.

4.1 Composição físico-química do leite

O leite utilizado na fabricação do queijo Prato nos dois tratamentos apresentou a mesma composição físico-química devido ao fato de ser oriundo do mesmo lote de matéria prima e do mesmo tanque de estocagem. As amostras do leite para análise de composição foram retiradas antes da etapa de carbonatação do leite, que alterou posteriormente a acidez titulável e o pH.

Os resultados da composição físico-química média do leite utilizado nas fabricações dos queijos Prato dos dois tratamentos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição físico-química média do leite utilizado para a fabricação dos queijos Prato no experimento

Variável	Tratamento
	CO ₂ e Controle
Proteína (% m/v)	3,30 ± 0,27
Gordura (% m/v)	3,20 ± 0,00
EST (%m/v)	12,16 ± 0,31
Densidade (g/mL)	1028,68 ± 0,36
Acidez*(%,m/v)	17,00 ± 0,00
Ph	6,61 ± 0,03
Umidade (%m/v)	87,85 ± 0,30

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

Ao estudar a influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal, Dias (2009) obteve em sua pesquisa valores de pH de 6,83, 6,24 e 6,27 destacando-se o último valor para o leite que sofreu pré-acidificação através da injeção com CO₂. O autor também encontrou resultados bem próximos para os demais parâmetros físico-químicos, a citar: acidez de 15,7 °D, extrato seco total de 12,03 % m/v, densidade de 1030 a 15°C g/L, gordura de 3,43 % e proteína de 3,10%. Dias e Gigante (2009) encontraram resultados semelhantes ao analisar o efeito da pré-acidificação do leite através da adição de CO₂ sobre o rendimento e as características físico-químicas do queijo Minas Frescal.

No estudo do impacto da pré-acidificação do leite com CO₂ no rendimento e na composição do queijo Cheddar, Nelson et al. (2004a) encontraram resultados semelhantes na composição da gordura, proteína e no pH do leite que foi utilizado na presente pesquisa.

4.2 Composição físico-química dos queijos após a fabricação

A análise de variância indicou diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao pH dos queijos para os tratamentos utilizados. O pH do queijo do tratamento controle foi maior ($p \leq 0,05$) em relação ao do queijo do tratamento com CO₂. Esse comportamento pode ser explicado pela presença predominante de ácido carbônico (H₂CO₃) proveniente da carbonatação do leite, mesmo após a fermentação e abaixamento do pH pelas bactérias do fermento láctico utilizado.

Com relação ao teor de umidade (e conseqüentemente o teor de sólidos totais) a análise estatística também indicou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os queijos dos tratamentos utilizados. O teor de umidade do queijo do tratamento controle (48,66, %, m/v) foi estatisticamente ($p \leq 0,05$) maior que (47,05 %, m/v), encontrado para o queijo do tratamento com pré-acidificação com CO₂. Esse comportamento pode ser explicado pelo maior dessoramento do queijo do tratamento pré-acidificado com CO₂ durante a etapa de mexedura, mesmo reduzindo o tempo total dessa etapa.

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos Prato do tratamento controle e do tratamento com pré-acidificação com CO₂ encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição físico-química média dos queijos Prato dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamento com CO ₂	
	CO ₂ (média ± DP)	Controle (média ± DP)
* pH	5,08 ± 0,06	5,18 ± 0,06
^{NS} Gordura (%m/v)	28,50 ± 1,29	26,50 ± 0,58
* Umidade (%m/v)	47,05 ± 0,86	48,66 ± 0,57
^{NS} Sólidos Totais (% m/v)	53,16 ± 0,98	51,30 ± 0,56
^{NS} Proteína (% m/v)	22,11 ± 2,18	21,54 ± 2,70
^{NS} Aw	0,97 ± 0,00	0,97 ± 0,00
^{NS} NaCl (%m/v)	1,71 ± 1,01	1,58 ± 1,44
^{NS} RMF (%m/v)	3,82 ± 0,21	3,90 ± 0,65
^{NS} GES	53,61 ± 1,24	51,66 ± 3,68

NS = Não significativo ($p > 0,05$); * = Significativo ($p \leq 0,05$); DP = Desvio Padrão; GES = Gordura no Extrato Seco; RMF = Resíduo Mineral Fixo; Aw = Atividade de Água.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, regulamentado pela Portaria número 146 de 7 de março de 1996 (BRASIL, 1996 e BRASIL, 2004) define queijo Prato como queijo gordo (GES entre 45 e 59,9%) e de média umidade (entre 36 e 45,9% de umidade). Pelos resultados, os queijos dos dois tratamentos estão em conformidade com a legislação quanto ao teor de gordura no extrato seco (GES). No entanto, o teor de umidade média para os dois tratamentos foi ligeiramente superior ao preconizado pela legislação. Esta diferença pode ser atribuída ao curto período de estocagem (12h) das amostras na câmara de secagem.

De acordo com Paula (2010) a menor umidade obtida no queijo tratado com CO₂ pode ser justificada em função da maior sinérese do coágulo no tanque de fabricação. Em relação ao valor de pH encontrado para os queijos, foi constatado diferença significativa ($p \leq 0,05$) para os tratamentos utilizados. O pH do queijo do tratamento controle foi maior em relação ao do queijo do tratamento com injeção de CO₂. Motivo este ocasionado pela dissolução do CO₂ na fase aquosa formando ácido carbônico (H₂CO₃) acidificando o meio.

Ao avaliarem a influência da adição de CO₂ no leite pasteurizado para fabricação de queijo Minas Frescal em escala modelo piloto, Dias e Gigante (2009), também encontraram diferença de pH, umidade e gordura entre os queijos tratados com CO₂ e os queijos do tratamento controle (com adição de cultura lática). Esses autores encontraram valores de umidade de 63,02 % (m/m) para os queijos controle, 57,44 % (m/m) para os queijos obtidos a partir do leite pré-acidificado com ácido láctico e 57,62 % (m/m) para o queijo tratado com CO₂ (pH 6,21). No presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,05$) para as outras variáveis de composição avaliadas.

4.3 Análise de rendimento da fabricação

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

O tratamento com injeção de CO₂ apresentou porcentagem de perda de gordura mais baixa, tanto pelo método empírico como pelo método técnico. Motivo este ocasionado provavelmente pela melhor formação da coalhada, o que permitiu maior aprisionamento desse constituinte. Já para os índices de perda de proteína, Coeficiente GL (g ST/L) e Rendimento Ajustado (L/kg A), o tratamento com injeção de CO₂ não diferenciou significativamente ($p > 0,05$) quando comparado ao controle. Este comportamento pode ser explicado provavelmente devido ao pH menor da coalhada no tratamento com injeção de CO₂, o que ocasionou o seu dessoramento nas etapas de produção como mexedura, enformagem, viragem, salga e secagem, resultando em menor peso final da produção, visto que essas variáveis levam em conta a quantidade de queijo produzida, ou seja, produção final. Este comportamento pode ser comprovado pelo menor teor de umidade encontrado para o queijo do tratamento com CO₂. No experimento, o tempo de mexedura foi diminuído, mas a redução ainda não foi suficiente para contrabalancear o maior dessoramento da coalhada no tratamento com CO₂, o que indica que o tempo de mexedura poderia ser ainda mais reduzido para os queijos do tratamento com CO₂.

Na Tabela 5 são mostrados os resultados dos métodos utilizados no experimento para calcular o rendimento de cada produção.

Tabela 5 – Análise de rendimento da produção do queijo Prato controle e tratado com CO₂

Análise de rendimento		
Avaliações	CO ₂	Controle
* % de perda de gordura no soro, método empírico	10,16 ± 1,50	13,29 ± 1,50
* % de perda de gordura no soro, método técnico	9,03 ± 2,68	11,75 ± 2,61
^{NS} % de perda de proteína no soro, método empírico	30,51 ± 2,45	27,96 ± 0,11
^{NS} % de perda de proteína no soro, método técnico	26,79 ± 2,60	25,22 ± 0,71
^{NS} Coeficiente GL	63,92 ± 0,87	63,49 ± 1,54
^{NS} Rendimento Ajustado (l/kg A)	8,76 ± 0,12	8,83 ± 0,21
^{NS} Rendimento em litros de leite por kg (l/kg)	8,655 ± 0,27	8,517 ± 0,35

NS = Não significativo ($p > 0,05$); * = Significativo ($p \leq 0,05$).

Paula (2010), ao estudar o efeito do uso de dióxido de carbono (CO₂) na fabricação de queijo minas Frescal e minas Padrão, cita que, tal fato pode ser explicado devido a redução do pH da coalhada na produção do queijo tratado com CO₂, dessa forma a maior atividade do coalho, aliado à desmineralização devido à insolubilização de cálcio, poderia levar conseqüentemente a liberação de frações proteicas no soro.

Silveira (2009) ao analisar os efeitos Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulantes não observou diferença de rendimento de fabricação a partir de leite controle e pré-acidificado com CO₂. No entanto Nelson, Lynch e Barbano (2004b) diferente deste trabalho, obtiveram menor rendimento ajustado para os queijos fabricados a partir de leite pré-acidificado com CO₂, que foi de 8,26 kg de queijo/100 kg de leite pré-acidificado, comparado a 9,29 kg de queijo/100 kg de leite controle.

4.4 Efeito do uso de CO₂ no teor cálcio livre do leite e do soro e no teor de cálcio inorgânico total dos queijos dos diferentes tratamentos.

Cálcio livre é o cátion bivalente do mineral presente na fase aquosa (FA) do leite. O cálcio nesta natureza eleva-se com a diminuição do pH devido à desmineralização da micela de caseína (PEREIRA., 2014).

Os resultados das análises de cálcio livre determinado pelo método eletroquímico, com auxílio de eletrodo íon seletivo para cálcio, do leite, do soro e encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Teor médio de cálcio livre do leite e do soro dos tratamentos controle e com CO₂

Avaliações	Composição média em mg/L	
	CO ₂	Controle
Leite	60,20 ± 10,38 a	60,20 ± 10,38 a
Soro	126,5 ± 13,99 a	67,60 ± 12,59 b

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

Pode ser observado que não houve diferença no teor de cálcio livre no leite dos tratamentos pelo fato de ter sido utilizado o leite do mesmo tanque de estocagem, portanto com a mesma composição físico-química. Já em relação ao soro, pode ser observado que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o soro obtido no tratamento com CO₂, que apresentou maior teor de cálcio livre (126,5 mg/100mL) em relação ao soro obtido no tratamento controle (67,6 mg/100mL). Essa diferença pode ser explicada pelo abaixamento do pH do leite devido à injeção de CO₂ e formação de ácido carbônico no processo de carbonatação do leite. O cálcio quando solúvel pode apresentar-se na forma de sais ou estar livre no meio aquoso na forma de um cátion bivalente, a redução do pH favorece a desmineralização do fosfato de cálcio coloidal e promove o aumento da atividade do íon cálcio (Ca⁺⁺), que tem como uma de suas funções a redução da repulsão entre caseínas carregadas negativamente e, conseqüentemente, aumenta a taxa de

agregação durante a coagulação do leite, dessa forma no momento da dessoragem grande parte do cálcio é solubilizado no soro.

O resultado do teor do cálcio inorgânico total dos queijos determinado por espectrofotometria de absorção atômica também apresentaram comportamento semelhante, na qual demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$), sendo menor para queijo do tratamento com CO_2 . Os resultados das análises de cálcio inorgânico total por espectrofotometria de absorção atômica dos queijos Prato do tratamento controle e com CO_2 encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Teor médio de cálcio inorgânico total do queijo dos tratamentos controle e com CO_2

Avaliações	Composição média em mg/kg	
	CO_2	Controle
Queijo	63,25 ± 0,01 a	66,75 ± 0,01 b

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

De acordo com Paula, et al (2012) o CO_2 tem um efeito reversível no pH e um efeito irreversível no fosfato de cálcio coloidal inorgânico, o qual é transformado em outras formas salinas.

Alteração do pH do leite em especial por acidificação, vem a constituir uma etapa fundamental, contribuindo para diversos processos tecnológicos de fabricação, no entanto, na etapa de diminuição do pH, mudanças podem ocorrer na composição e, portanto, na estrutura micelar (GASTALDI et al., 1996). Lucey et al (1996) cita que a acidificação seguida de neutralização melhorou as propriedades de coagulação pelo coalho, que foi atribuída a uma elevada atividade de Ca^{++} .

4.5 Efeito do uso de CO_2 nos tempos de fabricação

O tempo entre a adição de coagulante e o corte da coalhada foi 38 % menor em comparação ao tratamento controle, conforme apresentado na Tabela 5. Sendo assim, pode-se afirmar que o CO_2 diminuiu o tempo gasto para a fabricação do

queijo Prato. Este fato pode ser explicado pelo menor pH do leite antes da coagulação, que se aproximou do pH ótimo da enzima coagulante e melhorou a sua atuação, resultando em maior firmeza da coalhada e reduzindo o tempo de coagulação.

Na Tabela 8 são mostradas as médias dos tempos de fabricação do queijo Prato para os dois tipos de tratamentos utilizados.

Tabela 8 – Média dos tempos cronometrados durante a fabricação para os dois tratamentos utilizado na fabricação do queijo Prato

Etapas da fabricação	Tempo (min)		Redução do tempo (min) Trat. vs. Controle	Redução do tempo (%) Trat. vs. Controle
	CO ₂ (média ± DP)	Controle (média ± DP)	CO ₂	CO ₂
Coagulação	18 ± 2	48 ± 2	30 ± 2	38 ± 2
Tempo total de fabricação	81 ± 2	128 ± 2	47 ± 2	64 ± 2

A pré-acidificação do leite pode aumentar a velocidade de coagulação devido à solubilização de cálcio, conforme discutido e comprovado nas análises anteriormente. Quanto maior a quantidade de cálcio solúvel presente no meio, mais rápida será a formação do coágulo e maior a sua firmeza. Essa diminuição do pH do leite também favorece o aumento da velocidade de agregação das micelas, aumentando a firmeza do gel durante a coagulação (PAULA., 2010)

O aumento na agregação micelar ocorre devido à diminuição da estabilidade das micelas por neutralização das cargas negativas e pela difusão de fosfato de cálcio intramicelar para a fase contínua, aumentando a disponibilidade de íons cálcio em solução (FOX et al., 2000).

O tempo total de fabricação também foi consideravelmente menor com o leite pré-acidificado com injeção de CO₂. Foi obtida redução de 64 % no tempo para se fabricar o queijo Prato. Este fato pode ser correlacionado com a diminuição no tempo de coagulação conforme mostrado acima, aliado à diminuição no tempo de mexedura, devido ao maior dessoramento dos grãos. Resultado semelhante foi encontrado por Ruas-Madiedo et al. (2002), que obtiveram redução de 60 % no tempo de coagulação na fabricação de um queijo espanhol de massa dura, após a redução de 0,5 unidade de pH através da adição de CO₂ no leite.

St-Gelais et al. (1997), ao analisar o tempo de fabricação para queijo Cheddar feito com leite pré-acidificado com CO₂, também encontraram menor tempo para leite pré-acidificado com pH 6,56. Menor tempo de fabricação e menor tempo entre adição do coagulante e a dessoragem também foi observado por Nelson et al. (2004b) para queijo Cheddar pré-acidificado com CO₂ até pH de 5,93.

4.6 Fermentação do queijo e evolução do pH durante o tempo de armazenamento

Durante a fermentação do queijo Prato, o pH deve baixar na prensagem para no mínimo 5,6 antes da etapa de salga, para que o queijo adquira as características sensoriais desejáveis. Os queijos do tratamento com adição de CO₂ demoraram em média quatro horas e trinta e cinco minutos para atingir o pH alvo de 5,6 enquanto os queijos do tratamento controle demoraram quatro horas e dez minutos para atingir tal pH. Este comportamento indica que o CO₂ não alterou de forma significativa o perfil fermentativo da cultura lática durante a etapa de prensagem.

A evolução do pH ao longo do tempo para os dois tratamentos no período de fermentação, após a pré-prensagem e durante a prensagem do queijo prato, é mostrada na figura 4.

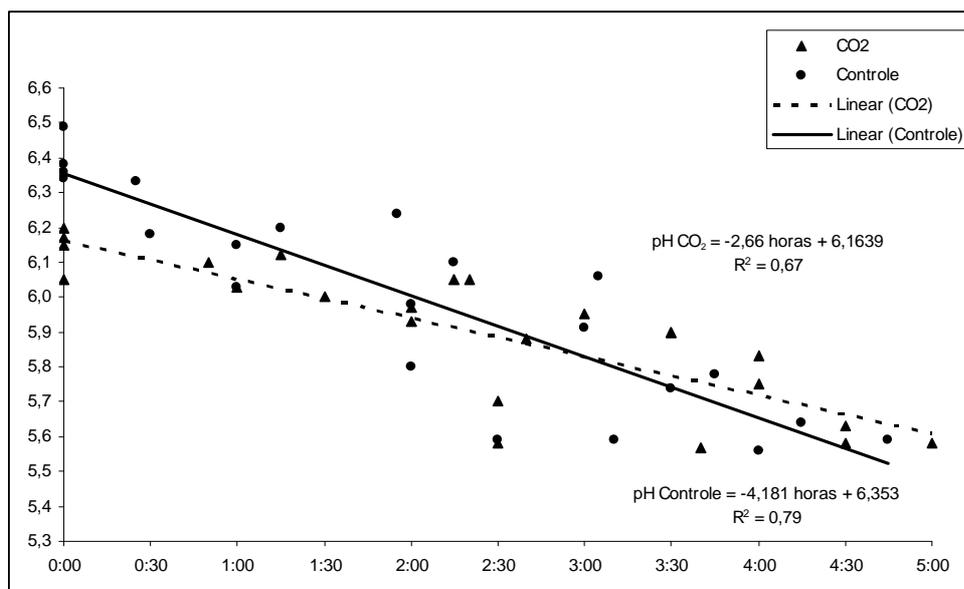


Figura 4 - Evolução do pH durante a fermentação do queijo Minas Padrão.

Os queijos do tratamento com CO₂ apresentaram menor pH ($p \leq 0,05$) em relação aos queijos do tratamento controle. No entanto, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) do tempo no pH dos queijos dos tratamentos durante o período de estocagem. Na avaliação da média durante o tempo total de armazenamento, que variaram de quatro a cento e vinte dias, a análise estatística dos dados também não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao valor de pH para os tratamentos.

Na Tabela 9, estão apresentados os valores médios de pH para os tratamentos, para todos os tempos avaliados.

Tabela 9 – Valores médios de pH para os queijos Prato dos dois tratamentos para todos os tempos avaliados

Tratamento	pH (dias)				
	4	30	60	90	120
CO₂	5,17 ± 0,08	5,06 ± 0,04	5,11 ± 0,16	5,02 ± 0,08	5,06 ± 0,08
Controle	5,16 ± 0,10	5,10 ± 0,06	5,26 ± 0,04	5,20 ± 0,08	5,21 ± 0,07

A diferença observada entre o pH dos queijos tratados com injeção de CO₂ e os queijos controle pode ser atribuída à presença de ácido carbônico proveniente dissolução do CO₂ na umidade do queijo.

Dias (2009), estudando a influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal também registrou em seus resultados a queda de pH dos queijos Minas Frescal elaborados com pré-acidificação do leite com CO₂, onde encontrou pH de 6,30 no primeiro dia, chegando até 5,54 no décimo nono dia. A adição de água promove uma delactosagem parcial, o que ocasiona a diminuição na produção de ácido no queijo, modificando o perfil de pH durante a estocagem. Fox et al (2004), cita que o processo de delactosagem pela adição de água ao leite ou até mesmo ao soro durante o processo de fabricação é comumente utilizado com o objetivo de controlar o pH e a desmineralização da massa em queijos como Gouda e Emmental.

Na avaliação geral ao longo do tempo, o pH médio dos queijos dos diferentes tratamentos apresentaram reduções significativas. Pode-se observar na Tabela 6 que no intervalo entre 4 e 30 dias ocorreu uma diminuição. Após 30 dias de armazenamento o pH dos queijos apresentaram uma ligeira elevação e após 60 dias reduziram novamente, mantendo-se em 5,06 para o queijo tratado com CO₂ e 5,21 para o queijo do tratamento controle. Essa pequena variação do pH pode ser atribuída a variações analíticas durante as análises ou a equilíbrios iônicos e atividade enzimática no produto durante o armazenamento.

Valores semelhantes foram encontrados por Vianna et al (2008), que obtiveram média de 5,17 ao estudar as mudanças microbiológicas e sensoriais na maturação do queijo Prato produzido a partir do leite com diferentes níveis de células somáticas. Estes valores foram ligeiramente menores que os observados por Mazal et al (2007), que pesquisou os efeitos da contagem de células somáticas na composição do queijo Prato, onde o pH médio foi de 5,35.

4.7 Evolução do teor de umidade durante o tempo de armazenamento

A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) em relação ao teor de umidade, onde os queijos tratados por injeção de CO₂ apresentaram menor teor em relação aos do tratamento controle. Esse comportamento provavelmente ocorreu devido ao pH mais baixo no queijo tratado com CO₂, provocando dessa forma um maior deessoramento ao longo do período de armazenamento. No entanto a análise de variância não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) para os tratamentos durante o tempo de armazenamento e para a interação entre tratamento e tempo de armazenamento. Desse modo, os queijos dos tratamentos se comportaram de maneira similar, não modificando o seu teor de umidade ao longo da estocagem que variou de 4 a 120 dias.

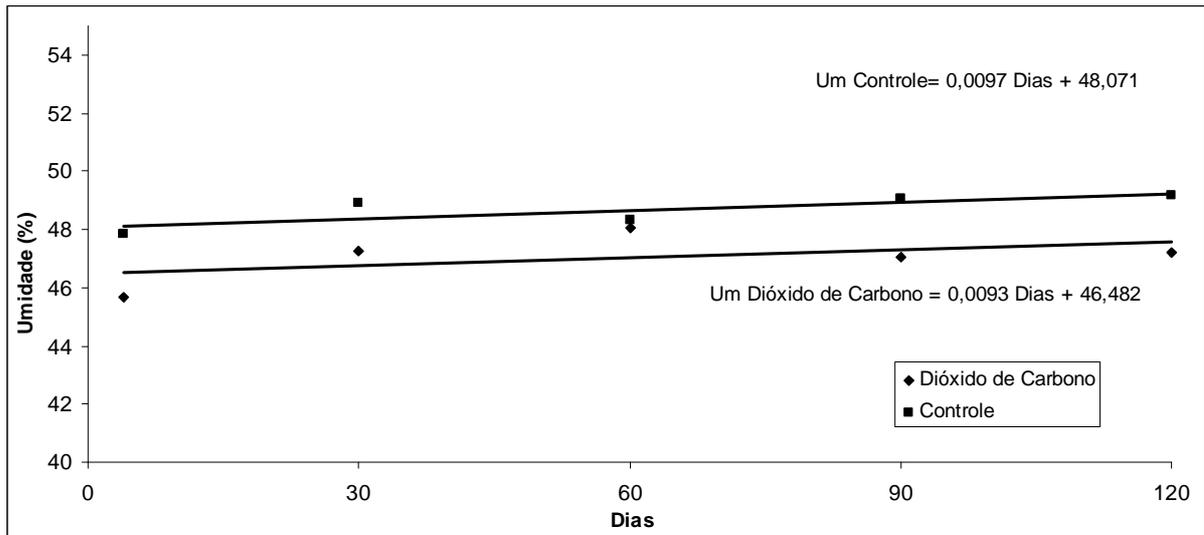


Figura 5 – Evolução do teor de umidade ao longo do armazenamento do queijo Prato em função dos diferentes tratamentos, com CO₂ e controle.

Segundo Mc SWEENEY (2007), a maturação dos queijos dentro da embalagem a vácuo é um fator importante na sua proteção e controle da qualidade. Tal comportamento ocorreu como esperado, visto que os queijos Prato foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis a vácuo.

4.8 Extensão e profundidade da proteólise em função do tempo

No período de maturação ou armazenamento do queijo ocorre um evento bioquímico que se destaca por ser o mais complexo nessa fase, chamado proteólise, que é causada por agentes como coagulante residual, fermentos lácteos adicionados, enzimas naturais do leite, microbiota acompanhante, composta por bactérias lácticas não “starter” (NSLAB) e, em muitas variedades, enzimas dos fermentos secundários (SOUSA et al., 2001).

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

A análise de variância não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à extensão da proteólise para os dois tratamentos, porém, para o tempo de armazenamento que variou de 4 a 120 dias, esta diferença foi constatada ($p \leq 0,05$). A interação entre tratamento e tempo também não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Pelo estudo da regressão, a variável extensão da proteólise apresentou tendência de aumento linear ao longo do tempo. Assim, considerando-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas e que os modelos ajustaram-se adequadamente, eles foram agrupados em uma só curva, conforme modelo apresentado na Figura 6.

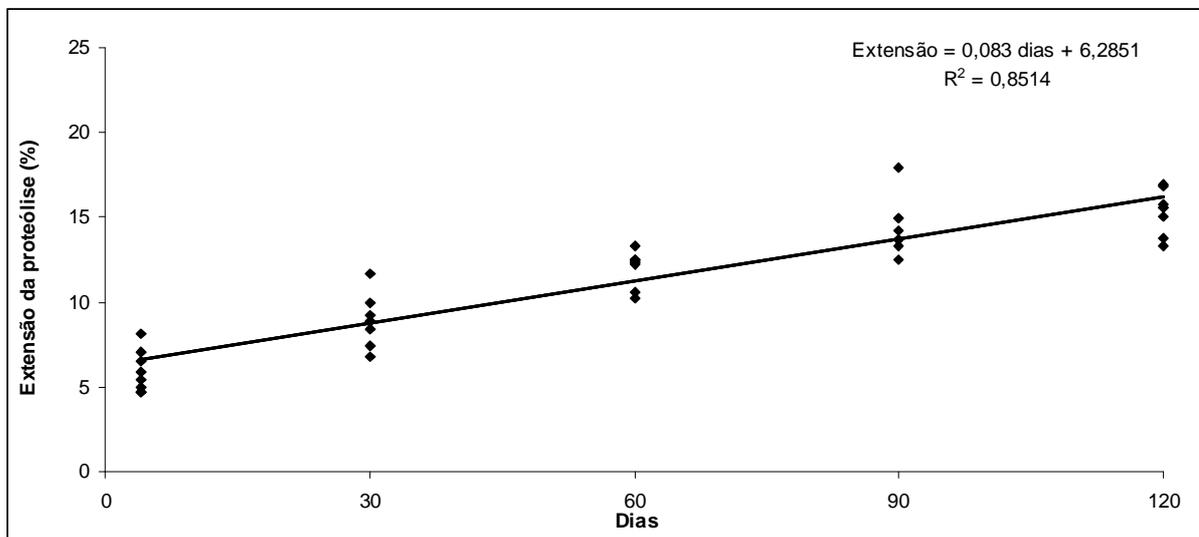


Figura 6 – Média do comportamento da extensão da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Prato em função dos tratamentos.

Na avaliação geral, os resultados médios para extensão da proteólise dos queijos obtidos dos dois tratamentos apresentaram aumento linear desses índices ao longo do tempo de armazenamento. O aumento do índice de extensão a partir desse período indica um possível aumento da degradação da matriz proteica provocado pela ação do coagulante residual, sendo este um dos maiores responsáveis pela ação da proteólise na maioria dos queijos, principalmente nos queijos com umidade elevada.

Paula (2010) encontrou valores médios para extensão da proteólise bem próximos aos obtidos nesse experimento, variando de 4,91 % nos tempos 3 a 5 dias,

a 16,15 %, nos demais tempos que foram entre 30 a 120 dias, ao avaliar o efeito do uso de CO₂ na fabricação do queijo Minas Frescal e Minas Padrão.

Com relação à profundidade da proteólise a análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para os tratamentos, porém, para os tempos de armazenamento, que variam de 1 a 120 dias houve diferença ($p \leq 0,05$). Assim, considerando-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas os dados foram agrupados em uma só curva.

Na Figura 7, está apresentado a média do comportamento da profundidade da proteólise ao longo do armazenamento para o queijo Prato dos diferentes tratamentos.

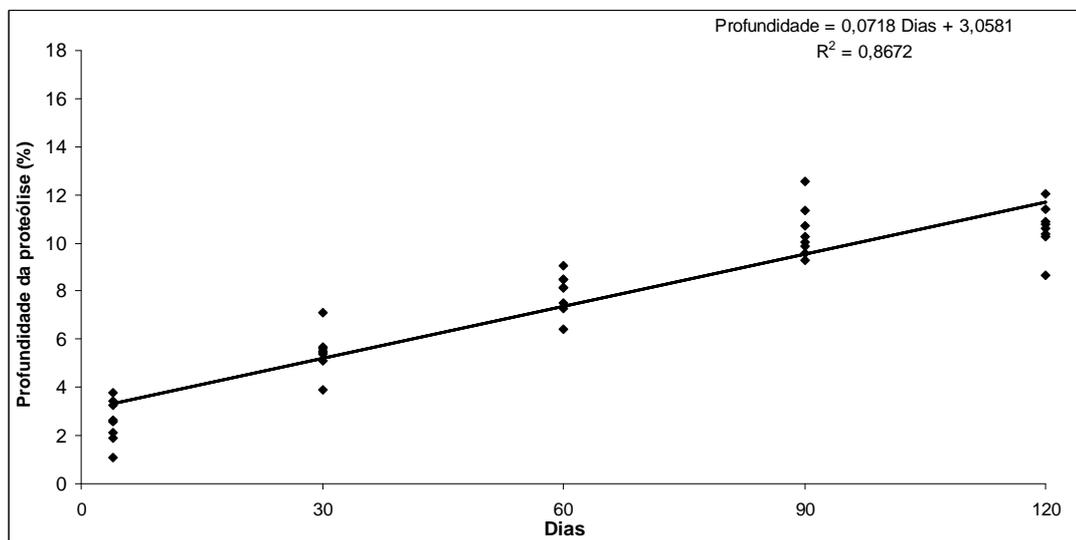


Figura 7 – Média da profundidade da proteólise em função do tempo de armazenamento para o queijo Prato dos diferentes tratamentos.

Os resultados para profundidade da proteólise dos queijos obtidos nos dois tratamentos apresentaram aumento desse índice ao longo do tempo de armazenamento com médias variando de 2,60 % a 11,66 % durante o período avaliado. Nos tempos a partir de 30 dias e 120 dias, os valores de extensão foram bem maiores do que os encontrados no início da estocagem refrigerada. Essa elevação entre os períodos de estocagem indica que ocorreu uma degradação mais acentuada da matriz proteica do queijo com liberação de frações nitrogenadas de baixa massa molecular provocado principalmente pela ação de enzimas como

aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, provenientes de bactérias contaminantes e das NSLABs (*Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, entre outros), principalmente após a lise das células.

Dias (2009) registrou valores médios para profundidade de proteólise de 2,89 % em queijo Minas Frescal obtido de leite acidificado com adição de CO₂ e 4,94 % para o queijo controle, no qual foi adicionada cultura lática.

Avaliando os resultados encontrados para a extensão e profundidade da proteólise, observa-se que os índices aumentaram significativamente durante os 120 dias de armazenamento refrigerado para os queijos Prato, tanto para o queijo tratado com CO₂, quanto para o queijo Prato controle. O que caracteriza comportamento normal durante a maturação.

4.9 Análises microbiológicas

4.9.1 Análise microbiológica do leite

A contagem padrão média para o leite pasteurizado utilizado nos diferentes tratamentos coletado no tanque de fabricação foi 3,06 log UFC/mL. As amostras de leite pasteurizado coletadas no tanque de fabricação apresentaram baixas contagens de coliformes a 35 °C (1,29 log UFC/mL) e apresentaram ausência de coliformes a 45 °C pela metodologia utilizada, as a mostras analisadas encontrando-se, portanto, dentro do limite permitido pela Instrução Normativa n° 62 de 2003 para leite pasteurizado (BRASIL, 2003).

4.9.2 Análise microbiológica dos queijos

As amostras de queijos dos dois tratamentos apresentaram ausência, em 25 g de amostra de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, pela metodologia utilizada. As análises do microrganismo *Staphylococcus aureus* também não apresentaram colônias características, ou seja, não ocorreu crescimento em nenhuma das amostras avaliadas, tanto para os queijos dos tratamentos com CO₂, quanto para os do tratamento controle. As amostras encontravam-se, portanto, dentro dos padrões, conforme RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001).

4.9.2.1 Contagem de coliformes totais durante a estocagem

A análise de variância não indicou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação às contagens de coliformes a 35°C para os tratamentos e para a interação entre tratamento e tempo ($p > 0,05$) para o queijo Prato. Assim, considerando-se que não ocorreram diferenças significativas os dados foram agrupados em uma só curva. Porém, para os tempos de armazenamento que variaram de 4 a 120 dias, tal diferença foi detectada ($p \leq 0,05$).

A figura 8 apresenta as contagens de coliformes a 35°C ao longo do tempo para os tratamentos no queijo Prato.

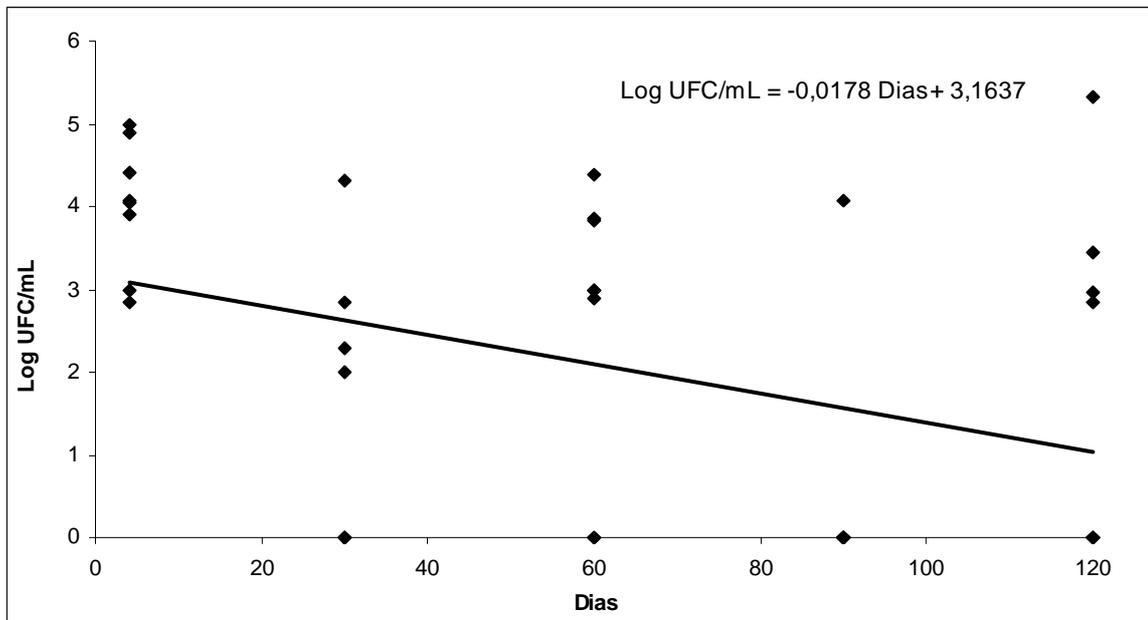


Figura 8 – Contagens de coliformes a 35°C ao longo do tempo para os tratamentos no queijo Prato.

As contagens de Coliformes a 35°C apresentaram redução linear ao longo do tempo, conforme equação de regressão: coliforme a 30°C = 3,16 - 0,018 x tempo. A redução da contagem de coliformes durante o período de estocagem foi esperada devido às modificações bioquímicas ocorridas durante o tempo e modificação do potencial de oxirredução do meio.

Shirai (2010) ao analisar a conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono, encontrou na contagem inicial de coliformes a 35°C os seguintes resultados; 1,15 log UFC/mL e 3,32 log UFC/mL. O autor concluiu que, diante dos resultados obtidos, a acidificação com CO₂ aumenta o tempo útil do leite cru através da inibição da multiplicação de microrganismos. Paula (2010) encontrou resultados semelhantes ao analisar os efeitos do uso do dióxido de carbono na fabricação de queijos Minas Frescal e Minas Padrão. O autor relatou que, devido a composição físico-química do queijo e as condições de maturação terem sido similares nos três tratamentos, um leve efeito antimicrobiano poderia ser atribuído ao CO₂ e não aos demais fatores, mesmo embora as condições adversas aos microrganismos estivesse aumentado ao longo do tempo.

4.9.2.2 Contagem de fungos filamentosos e leveduras durante a estocagem

A análise de variância não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras dos queijos obtidos dos diferentes tratamentos, porém, foi encontrado efeito significativo ($p \leq 0,05$) para os tempos de armazenamento, que variaram de 4 a 120 dias. A interação entre tratamento e período também não foi significativa ($p > 0,05$). Pelo estudo da regressão, a variável fungos filamentosos e leveduras apresentou aumento linear ao longo do tempo de armazenamento conforme equação: Fungos filamentosos e leveduras = $4,81 + 0,131 \times \text{Tempo}$ (Figura 9). Como não houve diferenças significativas os dados foram agrupados em uma só curva, conforme modelo apresentado na Figura 9.

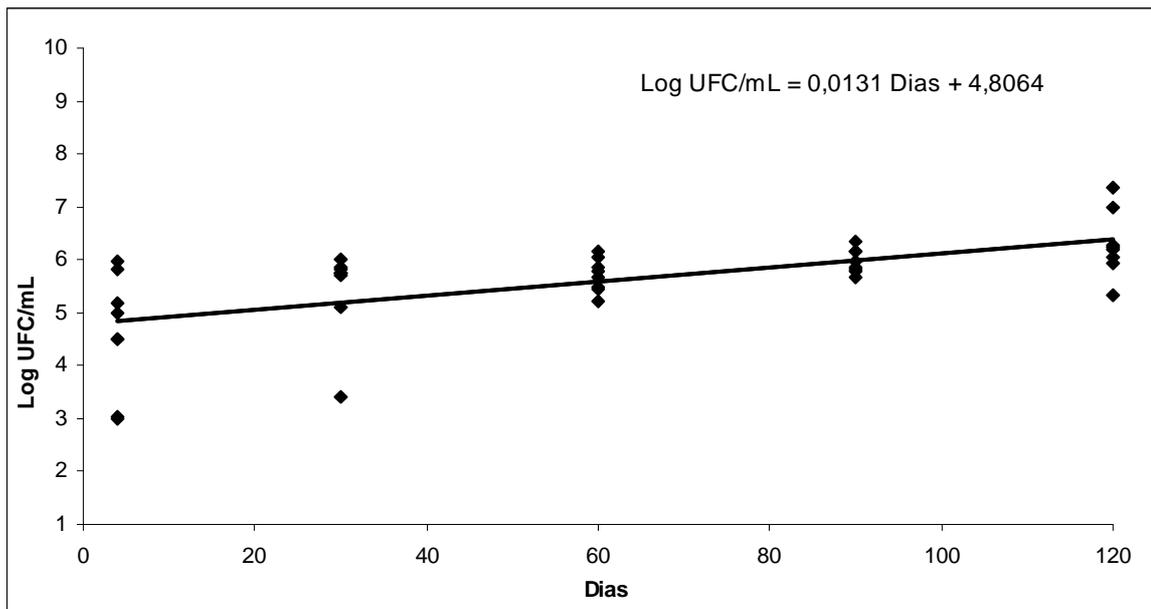


Figura 9 – Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras ao longo do tempo para os tratamentos no queijo Prato.

Pelos resultados pode-se observar que a contagem de fungos filamentosos e leveduras dos diferentes tratamentos aumentaram ao longo do tempo de estocagem. Apesar do queijo Prato ter sido embalado a vácuo, algumas leveduras são microaerófilicas e podem crescer durante o tempo de armazenamento, mesmo em queijos embalados a vácuo.

Não existem na legislação brasileira normas com padrões microbiológicos estabelecidos para fungos filamentosos e leveduras em queijos Prato. No entanto, a qualidade de produtos lácteos, em termos microbiológicos, também pode ser verificada a partir da determinação quantitativa destes microrganismo (ANDRADE, 2008).

4.10 Análise sensorial

4.10.1 Aceitação sensorial

Em relação aos tempos de estocagem avaliados, na tabela 10 são apresentadas as notas médias das notas dos provadores na escala hedônica de

nove pontos durante o tempo de estocagem refrigerada para os dois tratamentos utilizados na produção do queijo Prato.

Tabela 10 – Notas médias dos provadores na escala hedônica de nove pontos durante o tempo de estocagem refrigerada para os dois tratamentos

Dias de estocagem	CO ₂	Controle
4	6,90	7,17
30	6,57	6,23
60	6,83	7,03
90	7,17	6,67
120	5,80	7,13
Média	6,65	6,85

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

Os queijos dos dois tratamentos com CO₂ e controle não diferiram entre si e ambos obtiveram aceitação sensorial nos períodos avaliados, com exceção do queijo tratado com CO₂ aos 120 dias que apresentou média de 5,80, ficando entre os termos hedônicos "indiferente" "gostei ligeiramente".

4.10.2 Teste de preferência sensorial

Pela análise dos resultados, somando-se o número de julgamentos da amostra mais preferida, nos tempos avaliados, pode-se concluir que não houve preferência significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as amostras dos tratamentos estudados. Assim, em termos sensoriais o tratamento de pré-acidificação com CO₂ pode ser utilizado em substituição ao tratamento controle.

Os testes de preferência são usados com o objetivo de comparar diversos produtos quanto à sua preferência. São testes que tem como base a avaliação da preferência dos consumidores, no entanto, não indicam especificamente se o provador gostou ou não dos produtos na qual foram submetidos na avaliação. Em

diversas indústrias alimentícias, é colocada em prática a aplicação desses testes, mais precisamente no desenvolvimento de novos produtos, melhoria de produtos, alteração de processos de produção, entre outros. A metodologia utilizada no teste de comparação pareada tem como objetivo determinar entre duas amostras qual é a mais preferida. É um método fácil e rápido que pode ser aplicado junto com os testes de aceitação sensorial (MINIM, 2006).

4.11 Análise microestrutural

Diferenças na microestrutura foram observadas, onde a matriz proteica do queijo tratado com injeção de CO₂ apresentou visualmente estrutura mais porosa, com poros de maior tamanho em comparação com a matriz proteica do queijo controle. Tal fato pode ser explicado pelo menor pH do leite que proporcionou a formação de uma coalhada mais porosa no queijo. O Queijo Prato submetido ao tratamento controle apresentou visualmente uma microestrutura menos porosa e mais compacta em relação ao queijo adicionado de CO₂. Paula et al (2012) ao avaliarem a microestrutura de queijos Minas produzidos com leite pré-acidificado com CO₂ constataram que a matriz proteica do queijo tratado com injeção de CO₂ apresentou visualmente microestrutura mais compacta, com maior número de poros de tamanho reduzido em comparação com a matriz proteica do queijo controle. Cada tipo de queijo pode comportar de forma diferente, dependendo das etapas de fabricação as quais são submetidos. No entanto, pode ser observado que a utilização do CO₂ aumenta a porosidade da matriz proteica, que conseqüentemente aumenta o dessoramento dos queijos aumentando o tamanho dos poros.

Pode-se ressaltar que diversas mudanças físico-químicas ocorrem nos componentes estruturais da matriz proteica no período de maturação. Tais mudanças poderiam ser atribuídas a diversos fatores como coagulante residual, mudança no equilíbrio mineral que ocorre entre a fase contínua e a matriz paracaseínica, microrganismos e suas enzimas. No caso do aumento da hidratação da paracaseína ao longo do tempo, Fox et al. (2000) citaram que esse aumento é acompanhado pela sua expansão física, e sendo mediado por fatores como aumento de pH, hidrólise e solubilização do cálcio ligado à caseína.

Ao avaliar o efeito da adição de *Bifidobacterium* e o emprego da acidificação direta sobre as propriedades de queijo Minas Frescal, Freire (2009) também

encontrou diferenças na microestrutura dos queijos, porém, os queijos sem ácido láctico apresentaram visualmente uma estrutura mais compacta.

Na Figura 10 são apresentadas as micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos dos dois tratamentos.

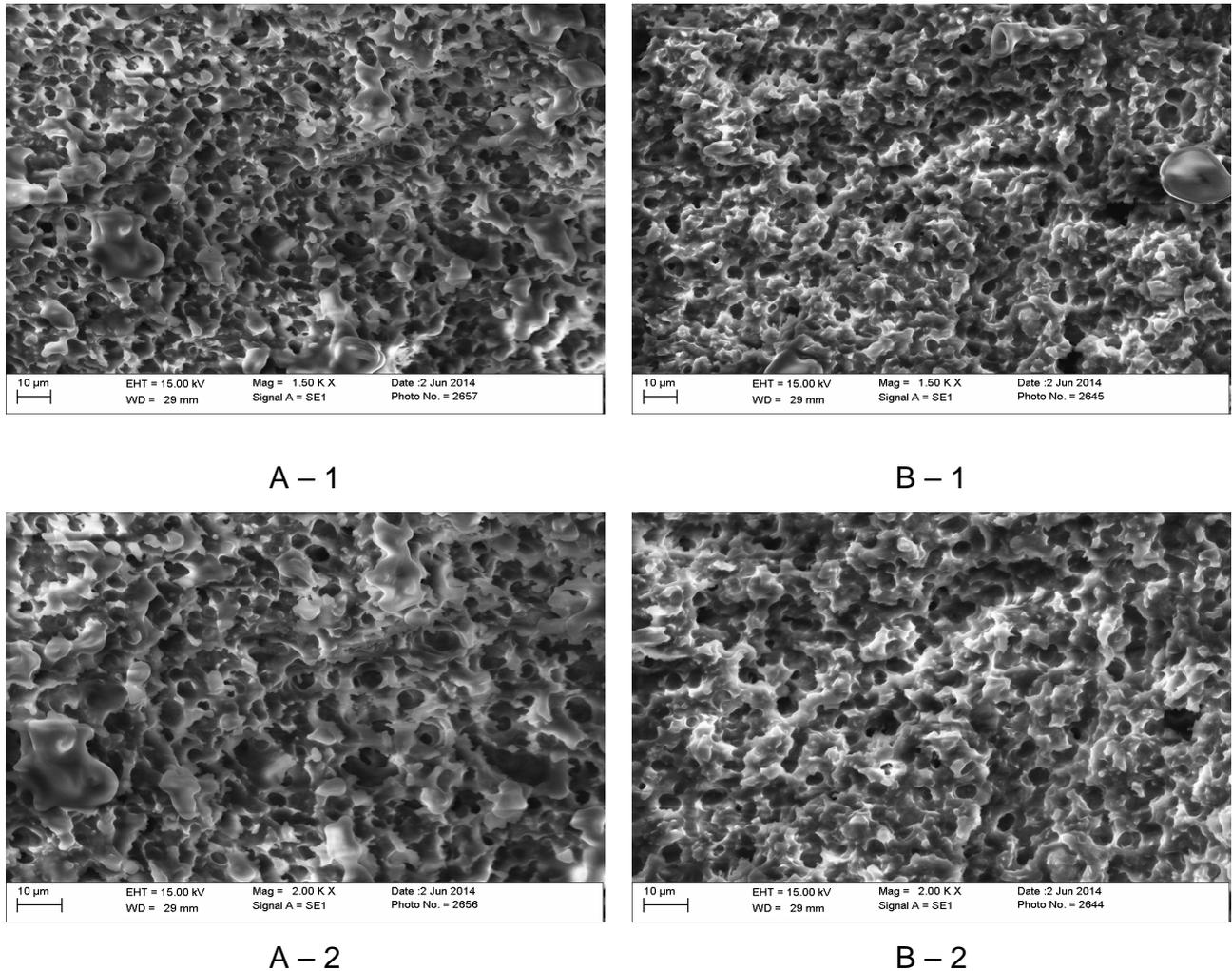


Figura 10 – Micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos queijos Prato submetidos aos tratamentos; (A-1) queijo tratado com CO₂, magnitude 1500x, (A-2) queijo tratado com CO₂, magnitude 2000x, (B-1) queijo do tratamento Controle, magnitude 1500x, (B-2) queijo do tratamento Controle, magnitude 2000x. Amostras visualizadas aos 27 dias de estocagem.

4.12 Características mecânicas (TPA)

A avaliação do perfil de textura dos queijos é de grande importância, pois está diretamente relacionada com a aceitabilidade sensorial por parte dos consumidores. Vários fatores, principalmente de sua composição físico-química, são conhecidos por influenciar a textura dos queijos, como exemplo, os teores de proteína, gordura, sal, minerais e pH (VISSER, 1991).

A análise estatística dos dados constatou que houve diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$) em relação à variável firmeza. O tratamento com CO₂ superou o tratamento controle. No entanto não foi constatado efeito significativo ($p > 0,05$) de tempo e da interação tratamento e tempo.

Com relação à variável fraturabilidade a análise estatística também constatou diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$). O tratamento com CO₂ superou também o tratamento controle. Em relação ao tempo de armazenamento e para a interação tratamento e tempo tal diferença não foi constatada.

Para a variável coesividade, a análise dos dados não constatou diferença significativa ($p > 0,05$) para os tratamentos. No entanto, para os tempos de armazenamento tal diferença foi constatada. Em relação à interação tratamento e tempo não houve diferença significativa ($p > 0,05$). A coesividade apresentou comportamento polinomial conforme equação: $\text{Coesividade} = 0,747 - 0,00650 \text{ Tempo} + 0,000038 T^2$.

A análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos para a variável Elasticidade. No entanto para os tempos de estocagem tal diferença foi constatada ($p \leq 0,05$). A elasticidade apresentou redução linear conforme equação: $\text{Elasticidade} = 12 - 0,0452 \times \text{Tempo}$.

Para a variável gomosidade a análise estatística dos dados também não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos. No entanto para os tempos de estocagem a diferença foi constatada ($p \leq 0,05$). A gomosidade apresentou redução conforme equação: $\text{Gomosidade} = 3341 - 32,1 \times \text{Tempo} + 0,176 \text{ Tempo}^2$. Este comportamento pode ser atribuído ao processo de proteólise durante a estocagem refrigerada do queijo Prato.

Tabela 11 – Valores médios de perfil de textura (TPA) para os tratamentos para o queijo Prato

Variáveis	Tratamento	
	CO ₂	Controle
Firmeza	3867,8 g	3331,1g
Fraturabilidade	3867,8 g	3331,1 g
Coesividade	0,43	0,50
Elasticidade	8,16 mm	7,25 mm
Gomosidade	1965,3 g	1925,2 mm

A textura pode ser definida como resultado da combinação das propriedades físicas e químicas perceptíveis pelos sentidos do tato, visão e audição. Para avaliar a textura utilizam-se métodos sensoriais usando provadores treinados. Em trabalho de rotina, pode-se utilizar métodos instrumentais para obtenção mais rápida da textura dos alimentos. A textura é um atributo importante do alimento podendo ser utilizada como um indicador para a identificação, avaliação da qualidade do queijo e a preferência dos consumidores (CHUNG, W. K. & MEULLENET , 2001).

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

Na Tabela 12, são apresentadas as médias de cada tratamento dentro de cada tempo para o perfil de textura dos queijos Prato dos diferentes tratamentos.

Tabela 12 - Perfil de textura ao longo do tempo de estocagem dos queijos Prato tratado com os diferentes métodos de incorporação de CO₂

Dias	Tratamento	Firmeza* (N)	Fraturabilidade * (N)	Coesividade* (Taxa)	Elasticidade* (mm)	Gomosidade* (N)
4	CO ₂	4521,5	4521,5	0,73	17,8	3511,5
	Controle	4227,8	4227,8	0,72	11,20	3037,2
30	CO ₂	4847,8	4847,8	0,59	8,44	2468,4
	Controle	3901,1	3901,1	0,59	8,19	2336,5
60	CO ₂	4935,8	4935,8	0,40	7,33	2141,4
	Controle	4080,5	4080,5	0,57	7,94	2074,3
90	CO ₂	4740,1	4740,1	0,43	7,49	1863,0
	Controle	3798,0	3798,0	0,54	7,94	1945,9
120	CO ₂	4161,6	4161,6	0,43	7,86	1807,3
	Controle	3979,5	3979,5	0,58	8,20	2157,5

Legenda: * Valores médios de cada tratamento em cada tempo; N = Valor de Newton.

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

6. Conclusões

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

- A pré-acidificação do leite através da incorporação de CO₂ até pH 6,0 reduziu o pH do queijo devido à ionização do ácido carbônico no meio.
- A adição de CO₂ no leite promoveu a redução da umidade dos queijos comparada ao controle.
- Os queijos tratados com CO₂ no leite apresentaram menor porcentagem de perda de gordura no soro tanto pelo método empírico como pelo método técnico em comparação ao queijo controle.
- O queijo tratado com CO₂ apresentou redução nos tempos de coagulação e o tempo total de fabricação.
- A presença de CO₂ não afetou a fermentação da cultura lática, bem como não influenciou as contagens para os grupos microbianos avaliados.
- O tratamento de carbonatação do leite não modificou a evolução dos índices de proteólise dos queijos Prato durante 120 dias de estocagem.
- Os queijos tratados com CO₂ apresentaram modificação na matriz protéica apresentando microestrutura mais porosa e com poros de maior tamanho, o que aumentou o dessoramento e reduziu a umidade dos queijos.
- Os queijos do tratamento com CO₂ modificaram seu perfil de textura aumentando a sua firmeza e a sua fraturabilidade.
- O tratamento com CO₂ não influenciou a aceitabilidade e a preferência sensorial dos queijos.

Referência bibliográfica

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro 16 de 1997**. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Produção brasileira de produtos lácteos e estabelecimentos sob inspeção federal**. São Paulo, 2011.

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

BARROS, C.M.V.; CUNHA, R.C.; GALLINA, D.A.; VIOTTO, L.A.; VIOTTO, W.H., **Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light**. Ciência Tecnologia Alimentos. Vol.26, no.1, p.11-18, Mar 2006.

BASTOS, R. A., PINTO, S. M., CARNEIRO, J. D. S., RAMOS, T. M., RAMOS, F. M., HADDAD, F. F. **Avaliação da percepção e preferência dos consumidores em relação a queijo prato**. Revista do Instituto de Laticínio. "Cândido Tostes", Jan/Fev, nº 390, 68: 12-19, 2013.

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

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

BRASIL, 2006; Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. **Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 8 de set. 1997.

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

CHUNG, W. K. & MEULLENET, J. F. **Prediction of cheese texture attribute by fundamental rheological analyses using a stress controlled dynamic rheometer**. In: IFT Annual Meeting, New Orleans, 2001.

DE RENSIS, C. M. V. B., PETENATE. A. J., VIOTTO. W. H. **Caracterização de queijos tipo Prato light**. Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 29(3): 488-494, jul.-set. 2009a.

DE RENSIS, C. M. V. B., PETENATE. A. J., VIOTTO. W. H. **Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura**. Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 29(3): 488-494, Jan. 2009b.

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

DIAS, B. M., GIGANTE, M. L. **Efeito da pré-acidificação do leite através da adição de CO₂ sobre o rendimento e as características físico-químicas do queijo minas frescal**. 26º Congresso Nacional de Laticínio. Juiz de Fora. MG. 2009.

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

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

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

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

FURTADO, M. M. & LOURENÇO NETO, J. P. de M.; **Tecnologia de queijos – Manual técnico para a produção industrial de queijos.** Editora Dipemar LTDA, 1994.

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

FURTADO, M.M.. **A arte e a ciência do queijo.** São Paulo: Globo, 1990.

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

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

GUEIMONDE, M, L., DELGADO, T., BADA-GANCEDO, J. C., REYES-GAVILÁN. **Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk.** Food Research International. 36 (2003) 43-48.

GUILLAUME, C., MARCHESSEAU, S., LAGAUDE, A., CUQ, J, L. **Effect of salt addition on the micellar composition of milk subjected to pH reversible CO₂ acidification.** Journal of dairy Science. v. 85, No. 9, 2002.

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

JERONIMO, M. **O cotidiano no ensino do processamento de queijos: Recursos instrumentais alternativos.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Agronomia. Seropédica – RJ. p. 48-52, 2005.

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

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

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. **Dairy Processing: The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products.** Boca Raton: CRC Press, 2000, 546p.

LUCEY, J. A. et al. **Effect of Acidification and Neutralization of Milk on Some Physico-chemical Properties of Casein Micelles.** International Dairy Journal. v. 6, p. 257-272. 1996.

MA, Y., BARBANO, D, M. **Serum protein and casein concentration: Effect on pH and freezing point of milk with added CO₂** . Journal of dairy Science. v. 86, No. 5, 2003a.

MA, Y., BARBANO, D, M., SANTOS, M. **Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C**. Journal of dairy Science. v. 86, No. 5, 2003b.

MAIA, G.O. P. M; RAMOS, I. M. S. R. **Estimativa da evolução da pressão de CO₂ com a temperatura numa lata de coca-cola**. Universidade do Porto. Set. 2004. p. 3-4. 2004.

MAZAL, G.; VIANNA, P.C.B.; SANTO,S M.V.; GIGANTE, M. L.. **Effect of somatic cell count on Prato cheese composition**. Journal of Dairy Science. 90 (2): 630-636 feb. 2007

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

Mc SWEENEY, P.L.H.. **Biochemistry of cheese ripening**. International Journal of Dairy Technology. Vol 57, No 2/3 May/August 2004.

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

NELSON, B. K., LYNCH, J. M., BARBANO, D. M. **Impact of Milk Preacidification with CO₂ on the Aging and Proteolysis of Cheddar Cheese**. Journal of Dairy Science. v. 87, p. 3590–3600. 2004a.

NELSON, B. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M. **Impact of milk preacidification with CO₂ on cheddar cheese composition and yield**. Journal of dairy science. 87: 3581 – 3589, 2004b.

NETO, J. P. DE M. L. **Textura da massa do queijo: fatores que influenciam e parâmetros de controle.** Food Ingredients, 17 ed, mar-abr, 2002, p. 34-39.

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

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

PAULA, J. C. J. **Aplicação de Dióxido de Carbono (CO₂) na Indústria de laticínios.** Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes". Set/Out, nº 352, v. 61, p. 1-50. 2006.

PAULA, J. C. J. **Efeito do uso de Dióxido de Carbono (CO₂) na fabricação de queijo minas frescal e minas padrão.** Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes". Set/Out, nº 352, v. 61, p. 1-50. 2010.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; ALMEIDA, F. A.; COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D. **O dióxido de carbono (co₂) e seus efeitos tecnológicos no leite e em produtos lácteos-** Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes", Jan/Fev, nº 384, 67: 11-21, 2012.

PAULA, J. C. J. ; CARVALHO, A. F. ; SOBRAL, D. ; COSTA, R. G. B. ; SANTOS, A. L. . **Aplicação de dióxido de carbono na indústria de queijos: uma alternativa viável.** In: XXV Congresso Nacional de Laticínios, 2008, Juiz de Fora- MG. XXV Congresso Nacional de Laticínios, 2008.

PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., COSTA JÚNIOR, L. C. G., OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos.** 2.ed. ampl. e rev. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001. 234-235 p.

PEREIRA, J. P. F. **Partição do cálcio em queijo minas padrão e sua bioacessibilidade ao longo do tempo de maturação.** Dissertação de mestrado em Ciências e Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, Minas Gerais. 2014.

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

RUAS-MADIEDO, P., ALONSO, L, DELGADO, T., BADA-GANCEDO, J. C., REYES-GAVILÁN, C. G. **Manufacture of Spanish hard cheeses from CO₂- treated milk.** Food Research International, v. 35, p. 681-690. 2002.

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2010. 90f.

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

SILVEIRA, A. C. **Fabricação e avaliação da maturação de queijo prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante.** Campinas, SP; [s.n], 2009.

SKELLAND, A. H. P. **Non-Newtonian flow and heat transfer,** New York, John Wiley & Sons, Inc. 1967, 469p.

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

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

STEFFENS, J., FINZER, J. R. D., CICHOSKI, A. J., FREITAS, D. **Influency of concentration of milk in the reology of the prato cheese.** *Science & Engineering Journal*) 15 (2): 43 - 50, 2005.

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

VIANNA, P.C.B; MAZAL, G.; SANTOS, M.V.; BOLINI, H.M.A.; GIGANTE, M.L. **Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells.** *Journal of Dairy Science*. 91:5 p.1743-1750 – 2008.

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

WALSTRA, P., & JENNESS, R. **Dairy Chemistry and physics.** New York: John Wiley & Sons, 1984.

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

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