



THAÍS DE MELO RAMOS

**TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES
COAGULANTES NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO
TIPO PRATO**

LAVRAS – MG

2013

THAÍS DE MELO RAMOS

**TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES COAGULANTES NA
FABRICAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Ph.D. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientador

Dr. Fabiano Freire Costa

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Ramos, Thaís de Melo.

Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do
queijo tipo prato / Thaís de Melo Ramos. – Lavras : UFLA, 2013.
231 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1.Eletroforese. 2. Microscopia. 3. Modelo de Peleg. 4. Modelo
de Maxwell. 5. Enzimas coagulantes. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 637.35

THAÍS DE MELO RAMOS

**TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES COAGULANTES NA
FABRICAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 8 de março de 2013.

Dr. Fabiano Freire Costa	Embrapa
Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho	UFLA

Ph.D Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

**LAVRAS - MG
2013**

OFEREÇO

A DEUS

Aos meus pais, Eliana e Donizetti, pelo amor e por ensinarem que a melhor herança é a educação. A Fernanda e Tales, pelo companheirismo, pelo amor e a força para prosseguir. Ao Douglas, pelo amor, incentivo e companheirismo.

Vocês são a minha vida!

DEDICO

AGRACEDIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força, saúde, graça, sabedoria e a certeza de que sempre estive ao meu lado em todos os momentos.

À minha mãe, pelo amor incondicional, compreensão, pela força e suporte, mesmo antes do início, até a concretização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Fernanda e Tales, pelo amor, pelo carinho, apoio e compreensão, por sempre me apoiarem e acompanharem todos os meus passos e me manterem erguida, para que nunca desanimasse. Amo muito vocês!

Ao meu noivo, Douglas, minha força, meu companheiro, conselheiro, incentivador, meu orgulho! E, acima de tudo, por ser a única pessoa que eu nunca imaginei encontrar aqui e, mesmo assim, parece ser aquela que me fez vir, apenas para conhecê-lo. Obrigada, por ser meu alicerce nesta caminhada. Te amo, meu amor!

A Lê, por ser a minha amiga, companheira, conselheira, incentivadora e meu bom senso, tanto nos bons como, principalmente, nos piores momentos. Eu a admiro-te e a respeito. A sua presença durante esses anos me fez uma pessoa mais feliz e me trouxe paz. Sei que você vibrava com cada conquista, com cada passo dado, e agora sei que, mesmo distante, está sempre presente, porque está em meu coração. Amo você!

Ao meu orientador, Luiz Ronaldo de Abreu, pessoa admirável, muito obrigado por não se restringir a apenas orientar e ensinar a pesquisa e atividades acadêmicas. Muito maior que conseguir o título é ser uma pessoa muito melhor do que quando entrei. Agradeço a você, por ter feito tudo isso por mim.

Ao Fabiano Costa Freire, meu coorientador, pela orientação, atenção, oportunidade, confiança e paciência dispensados durante o período da realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), que me proporcionaram uma oportunidade de crescimento profissional.

À Sandra Maria Pinto, antes de tudo amiga, pela confiança, pela paciência, ensinamentos, apoio e aconselhamentos, desde o início da graduação até o término do meu doutorado.

À amiga Patrícia, que foi fundamental para a realização de grande parte do trabalho, com a disponibilidade em todos os momentos (principalmente os mais difíceis) e infinita boa vontade em todas as fases; além de tudo, uma pessoa muito especial que sempre me apoiou.

Ao professor Luiz Carlos de Oliveira Lima, um grande conselheiro e amigo durante o curso, muito obrigada!

Ao professor Eduardo Alves, pela dedicação, atenção e paciência.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo suporte financeiro a este projeto.

Aos amigos do Laboratório de Laticínios: Rejiane, Ana Paula, Marcel, Elisângela, Ranielly, Dieyckson e Tassyana, que foram indispensáveis na realização dos experimentos, pela amizade, agradável convivência e trabalho durante esses anos.

À minha querida “filha” Ana Paula, você vai me fazer muita falta, muito obrigada pela distinta amizade.

À Creuza, técnica do laboratório de leite, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos alegres que passamos juntas; pelo suporte e atenção na realização desse projeto.

Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários do DCA: Tina, Sr. Miguel (*in memoriam*), Lucilene e Cidinha, pela amizade e disponibilidade em auxiliar e ensinar.

As minhas “irmãs”, Mariana e Marina, pela convivência de vários anos, e pelos momentos que vivemos juntas! Vocês vão sempre ter um lugar especial em meu coração.

À família do Douglas, Arriel, Imelda e Rafael, por todo carinho, por me acolherem como filha, muito obrigada!

Aos cunhados, Ana Luiza e Arthur, pelos momentos de alegria.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e fizeram parte dessa caminhada.

Muito Obrigada!!!!!!!!!!!!!!

RESUMO GERAL

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a influência do tipo de pasteurização pelos sistemas de aquecimento indireto *high temperature short time*, ou HTST, e injeção direta de vapor (IDV), e avaliar a influência de duas diferentes enzimas coagulantes na fabricação do queijo tipo prato. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial $2 \times 2 \times 5$ inteiramente casualizado, sendo dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV), duas enzimas coagulantes e cinco períodos de maturação (1, 15, 30, 45 e 60 dias), com três repetições (fabricações). As enzimas coagulantes estudadas foram coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina obtida por fermentação (coalho genético). As etapas de desenvolvimento do estudo foram as seguintes: (1) avaliação do rendimento, características físico-químicas do queijo tipo prato, perfil proteico do leite e soro e conhecimento da composição físico-química do soro proveniente da manufatura deste queijo, assim como avaliação das taxas de transferência de gorduras e proteínas; (2) efeito dos diferentes tipos de pasteurização e agentes coagulantes no perfil proteico dos queijos durante o período de maturação; (3) efeito dos diferentes tipos de pasteurização e agentes coagulantes no comportamento reológico e viscoelástico dos queijos; (4) avaliação dos efeitos dos diferentes tipos de pasteurização e agentes coagulantes na microestrutura do queijo tipo prato. A utilização do sistema de pasteurização IDV (injeção direta de vapor) resultou em queijos com maior rendimento de fabricação (L de leite/kg de queijo); a pasteurização por injeção direta de vapor e coagulante quimosina resultou em tempo de coagulação maior. O sistema de IDV resultou em maior influência na transferência de componentes do leite para a coalhada, após o corte, com melhor retenção de gordura, quando comparado com o leite pasteurizado com HTST. No mesmo sistema de pasteurização observou-se um provável efeito da IDV na dispersão dos glóbulos de gordura do leite e houve uma incorporação média de 15 % de água do leite pasteurizado por este sistema. Os queijos produzidos com leite pasteurizado pelo sistema IDV apresentaram maior valor de proteólise, profundidade e extensão da maturação, quando comparados aos queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema HTST. O modelo de Maxwell foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico dos queijos, já que as curvas experimentais obtidas apresentaram boa correlação ($R^2 > 0,99$). Para os testes dos parâmetros de relaxamento, o modelo de Maxwell discriminou melhor os tratamentos do que os parâmetros do modelo de Peleg. Diferentes tratamentos tiveram efeitos importantes sobre as características de microestrutura e espectroscopia de energia dispersiva por raios X, o que foi possível observar os diferentes comportamentos da matriz proteica pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), identificar a presença de cristais (inclusão cristalina), mesmo no primeiro tempo de maturação e observar as diferentes composições dos principais minerais do queijo.

Palavras-chave: queijo, pasteurização, microscopia, eletroforese, reologia.

GENERAL ABSTRACT

The present work was carried out with the objectives of evaluating the influence of the sort of pasteurization by the indirect heating systems *high temperature short time*, or HTST, and direct steam injection (IDV) and evaluating the influence of two different clotting enzymes in the making of the prato-type cheese. The experimental design utilized in this experiment was a factorial 2 x 2 x 5 completely randomized, that is, two pasteurization systems (HTST and IDV), two clotting enzymes and five maturation periods (1, 15, 30, 45 and 60 days) with three replications (makings). The clotting enzymes studied were calf rennet (20% chymosin and 80% pepsin) and chymosin obtained by fermentation (genetic rennet). The steps of development of the study were the followings: (1) evaluation of the yield, physicochemical characteristics of the prato-type cheese, protein profile of milk and whey and knowledge of the physicochemical composition of the whey coming from the making of this cheese as well as the evaluation of the transfer rates of fats and proteins; (2) effect of the different types of pasteurization and clotting agents upon the protein profile of the cheeses during the maturation period; (3) effect of the different types of pasteurization and clotting agents upon the rheological and viscoelastic behavior of cheeses; (4) evaluation of the effects of the different types of pasteurization and clotting agents upon the microstructure of the prato-type cheese. The utilization of the IDV pasteurization system (direct steam injection) resulted into cheeses with greater cheesemaking yield (L of milk/kg of cheese); the direct steam injection pasteurization and clotting chymosin resulted into longer clotting time. The IDV system resulted into greater influence on the transfer of milk components to the curd after the cut, with better fat retenção when compared with the HTST pasteurized milk. In the same pasteurization system, a likely effect of the IDV was found in the spread of the milk fat globules and there was a medium incorporation of 15 % of water of the pasteurized milk by this system. The cheeses produced with IDV system-pasteurized milk presented greater value of proteolysis, depth and maturation extent when compared with the cheeses made with HTST system-pasteurized milk. The Maxwell model was capable of describing satisfactorily the viscoelastic behavior of the cheeses since the experimental curves obtained presented good correlation ($R^2 > 0.99$). For the tests of the relaxation parameter, the Maxwell model discriminated the treatments better than the parameters of the Peleg model. Positive and negative correlations were found among the treatments along the maturation time. The study pointed out that the different treatments had important effects on the characteristics of microstructure and energy-dispersive X-ray spectroscopy, the different behaviors of the protein network having been possible to observe by the scanning electron microscopy (MEV), identify the presence of crystals (crystalline inclusion), even in the first time of maturation and observe different composition of the main minerals of the cheese.

Key words: cheese, pasteurization, microscopy, electrophoresis, rheology.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	10
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Definição e tipos de queijos	18
2.2	Queijos de massa semicozida	19
2.3	Queijo tipo Prato	20
2.4	Pasteurização do leite	21
2.4.1	Sistema HTST (<i>High Temperature Short Time</i>)	23
2.4.2	Injeção Direta de Vapor (IDV)	25
2.4.3	Prova de fosfatase e peroxidase	26
2.5	Efeito do calor sobre a composição do leite	27
2.6	Rendimento da fabricação	28
2.7	A maturação do queijo	30
2.8	Agentes da maturação	31
2.8.1	Enzimas do fermento	32
2.8.2	Enzimas do coalho e agentes coagulantes	33
2.8.2.1	Coalho	33
2.8.2.2	Quimosina obtida por fermentação	36
2.9	Proteólise	37
2.10	Índices de maturação	40
2.10.1	Índice de extensão da proteólise	41
2.10.2	Índice de profundidade da proteólise	41
2.11	Reologia de alimentos sólidos	42
2.12	Perfil de Textura	43
2.13	Textura de queijos	46
2.14	Viscoelasticidade e modelos viscoelásticos	47
2.15	Teste de relaxação de tensão	48
2.16	Modelo de Maxwell	49
2.17	Modelo de Peleg	53
2.18	Teste de compressão uniaxial	55
2.19	Eletroforese em Microchip	57
2.20	Microscopia eletrônica	58
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 2: Caracterização do queijo tipo prato: influência dos tipos de pasteurização do leite e diferentes enzimas coagulantes	
1	INTRODUÇÃO	78
2	MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1	Localização do experimento	80

2.2	Pasteurização do leite.....	80
2.3	Tratamentos.....	80
2.4	Análises físico-químicas do leite.....	81
2.4.1	Amostragem do leite.....	81
2.5	Caracterização dos queijos tipo prato.....	83
2.5.1	Fabricação dos queijos.....	83
2.5.2	Análises físico-químicas do queijo tipo prato.....	87
2.5.2.1	Amostragem do queijo.....	87
2.5.2.2	Análises físico-químicas do soro no corte.....	87
2.6	Análises físico-químicas dos queijos.....	88
2.7	Cálculo do rendimento dos queijos.....	90
2.8	Análises estatísticas.....	92
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1	Composição Físico-Química do leite Cru e Pasteurizado (HTST e IDV).....	93
3.2	Fosfatase Alcalina e Peroxidase.....	96
3.3	Composição físico-química do soro no corte.....	97
3.4	Análise das frações proteicas do leite e soro por eletroforese microfluídica.....	99
3.5	Tempo de coagulação do leite nas doze fabricações do queijo tipo prato	102
3.6	Cálculo do volume de soro obtido da fabricação dos queijos.....	103
3.7	Rendimento econômico.....	104
3.8	Rendimento técnico.....	106
3.9	Determinação das cifras de transição do queijo tipo prato.....	107
3.10	Composição físico-química dos queijos tipo prato.....	109
3.11	Composição dos queijos tipo prato durante a maturação	115
4	CONCLUSÃO	130
	REFERÊNCIAS.....	132
	CAPÍTULO 3 Efeito de diferentes tipos de pasteurização e agentes coagulantes no comportamento das principais frações proteicas durante a maturação do queijo tipo prato	
1	INTRODUÇÃO.....	140
2.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	142
2.2	Análises do perfil proteico.....	142
2.2.1	Amostragem do queijo.....	142
2.2.2	Eletroforese em microchip.....	142

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
3.1	Determinação do perfil proteico das principais frações proteicas dos queijos.....	144
4	CONCLUSÃO.....	156
	REFERÊNCIAS.....	157
	CAPÍTULO 4: Tipos de pasteurização e agentes coagulantes no comportamento reológico do queijo prato, ao longo do tempo de maturação.....	
1	INTRODUÇÃO.....	162
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	165
2.2	Análises reológicas dos queijos de tipo prato.....	165
2.2.1	Amostragem do queijo.....	165
2.3	Análise do perfil de textura.....	165
2.4	Teste de relaxação de tensão.....	166
2.5	Teste de resistência a compressão.....	168
2.6	Análise estatística.....	169
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	170
3.1	Análise do Perfil de Textura.....	170
3.2	Teste de relaxação.....	175
3.3	Medidas de compressão uniaxial.....	186
3.4	Correlação entre as propriedades reológicas	189
4	CONCLUSÃO.....	199
5	REFERÊNCIAS.....	200
	CAPÍTULO 5: Efeito de diferentes tipos de pasteurização e agentes coagulantes na microestrutura do queijo tipo prato.....	
1	INTRODUÇÃO.....	209
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	212
2.2	Microestrutura dos queijos.....	212
2.2.1	Amostragem do queijo.....	212
2.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X.....	212
2.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	213
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	215
3.1	Análise da estrutura dos queijos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	215
3.2	Determinação de minerais por Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X.....	219
3.3	Análise da estrutura dos queijos por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	227
4	CONCLUSÃO.....	230

REFERÊNCIAS.....	231
-------------------------	------------

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A indústria queijeira do Brasil está elaborando produtos que vêm atingindo, gradativamente, melhor aceitação no mercado. Com o passar dos anos, novas tecnologias surgiram, inovando a indústria laticinista. A maneira pela qual os antigos fabricavam queijos, como forma de preservação do leite ou para pequenas comercializações, foi marcante na economia do setor. Entretanto, novos investimentos tecnológicos e financeiros foram necessários, para acompanhar o avanço da sociedade como um todo.

O queijo foi, sem dúvida, um dos primeiros derivados do leite produzidos no Brasil, com grande influência de tecnologias estrangeiras. Dentre os derivados lácteos, é um dos mais difundidos. Vários tipos e formas de processamento foram e estão surgindo, muito dos quais adaptados daqueles já existentes.

No Brasil, os queijos de massa semicozida, como, por exemplo, o tipo prato, estão entre os mais produzidos, sendo considerados queijos semiduros que apresentam etapas distintas do processo de elaboração, que abrangem obtenção de uma massa semicozida, com remoção parcial do soro; lavagem por adição de água quente; pré-prensagem; moldagem sob soro; prensagem; salga e maturação pelo tempo necessário para atingir suas características específicas.

A operação de aquecimento da massa pode ser realizada de forma direta, pela adição de água quente, injeção de vapor à massa do queijo, vapor fluente na camisa do tanque ou adição de soro aquecido (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999). As finalidades desta etapa são favorecer o controle do pH, aumentar a sinérese, controlar o desenvolvimento microbiano, dificultar a ação de microrganismos indesejáveis e controlar o extrato seco total do queijo.

Nos últimos anos, algumas mudanças na tecnologia de fabricação de queijos de massa semicozida têm sido efetuadas pelas indústrias laticinistas,

visando à melhoria de sua qualidade. Dentre elas, destacam-se a substituição do coalho bovino por substitutos de renina e o tipo pasteurização na etapa de tratamento térmico do leite.

Para a obtenção de um bom produto, torna-se essencial a utilização de leite de boa qualidade, tanto microbiológica como físico-química. Independente da qualidade do leite, utiliza-se o processo de pasteurização como forma de garantir a segurança do produto para o consumidor, além de melhorar a padronização e diminuir as perdas causadas por microrganismos prejudiciais ao produto.

Na fabricação de queijos, a pasteurização pode ser realizada por meio de vários processos, nos quais se utilizam diferentes equipamentos e os quais têm como objetivos a eliminação total dos microrganismos patogênicos e a redução do número de microrganismos indesejáveis ao processo de fabricação. No Brasil, as indústrias de laticínios utilizam além do sistema de pasteurização a placas ou *high temperature short time* (HTST), outros sistemas tradicionais, como o ejetor de vapor, injeção direta de vapor e camisa de vapor, continuam sendo utilizados, embora possam, no futuro, ser legalmente proibidos.

No Brasil, a grande maioria das indústrias laticinistas tem utilizado o coalho bovino para a coagulação do leite na produção de queijos. Porém, a tendência no crescimento na produção de queijos e a escassez na oferta de estômago de bezerros, outras fontes de enzimas coagulantes têm sido pesquisadas para encontrar substitutos mais adequados, econômicos e disponíveis comercialmente. Dentre os substitutos de renina estão os coagulantes microbianos e a quimosina obtida por fermentação. A quimosina obtida por fermentação apresenta vantagem quanto à qualidade, à pureza, ao rendimento e à constância no fornecimento.

Em face do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo geral de comparar os processos de pasteurização de placas e injeção direta de vapor, de

leite destinado à fabricação de queijo tipo prato, e a utilização de dois tipos de agentes coagulantes. Como objetivos específicos, buscou-se avaliar o rendimento dos queijos em função destes tratamentos e estudar o comportamento do coalho bovino e da quimosina produzida por fermentação, durante a maturação dos queijos e seu papel na proteólise das frações de caseína. Cálculos de rendimento de fabricação e avaliações de proteólise, eletroforese microfluídica, comportamento reológico e viscoelástico e microestrutura foram realizados, para o acompanhamento das mudanças ocorridas com as inovações introduzidas no processamento e durante o tempo de maturação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição e tipos de queijos

Queijo é o nome genérico para um grupo de alimentos fermentados à base de leite, com grande diversidade de sabor, textura e formas (FOX et al., 2000). É um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas (PERRY, 2004).

De acordo com a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 (BRASIL, 1996), queijo é 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, coagulado pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de 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.

A fabricação de queijos é uma forma conveniente de conservar o leite, transformando-o em um produto mais estável, palatável, cujas qualidades são mantidas, podendo ser padronizados ou adaptados às necessidades do mercado. O queijo, no Brasil e no mundo, é um dos produtos lácteos que mais se difundiram, e o que mais sofreu adaptações na técnica de elaboração, ocasionando, conseqüentemente, o surgimento de vários tipos (MAGALHÃES, 2002).

Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam esta imensa variedade, conhecendo-se cerca de 1.000 tipos (PERRY, 2004).

2.2 Queijos de massa semicozida

A operação de aquecimento da massa pode ser realizada de forma direta, pela adição de água quente, injeção de vapor à massa do queijo, vapor fluente na camisa do tanque ou adição de soro aquecido (OLIVEIRA, 1986; WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999). As finalidades desta etapa são favorecer o controle do pH, aumentar a sinérese, controlar o desenvolvimento microbiano, dificultar a ação de microrganismos indesejáveis e controlar o extrato seco total do queijo (DUTRA, 1997; WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

A adição direta de água quente sobre a mistura da massa e soro é a forma tradicional de aquecimento. Normalmente, é retirado cerca de 1/3 do soro e substituído por água de aquecimento. Este tipo de procedimento é executado em queijos de massa semicozida e lavada, como o prato (OLIVEIRA, 1986). O volume retirado de soro varia em função das características de cada queijo. A água quente (60 °C a 80 °C) adicionada é utilizada para aquecimento e lavagem da massa. Sua adição deve ser lenta e gradual e distribuída uniformemente no tanque, para evitar aquecimento localizado (SOUZA, 1960; WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

O aquecimento direto com água quente provoca uma pequena diluição que influencia a acidificação do queijo (OLIVEIRA, 1986). Esse procedimento objetiva a lavagem e a delactosagem dos grãos, a diluição da acidez e o controle da acidificação, resultando num queijo de sabor mais suave. O aquecimento deve ser gradual, para que haja uma elevação uniforme de temperatura em todo o grão e não apenas na superfície. Dessa forma, dificulta-se a formação de película ao redor do grão, o que pode impedir a saída de soro do seu interior. Quando o aquecimento é muito rápido, ocorre sinérese intensiva e superficial dos grãos, fechando-se os poros da película que os reveste, impedindo a saída de soro do seu interior. O soro retido no interior do grão contém lactose, a qual é transformada em ácido láctico pelo fermento, resultando em um queijo de acidez

elevada. Como consequência há uma dessoragem heterogênea e a liga da massa fica prejudicada, o que resulta em queijos com defeitos de sabor e textura (DUTRA, 1997).

2.3 Queijo prato

O regulamento técnico de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos do Brasil define o queijo prato como o produto obtido por coagulação enzimática do leite, complementado pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida. O produto deve ter consistência elástica, textura macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Além disso, deve ser maturado por, no mínimo, 25 dias (BRASIL, 1997).

Entre os diversos tipos de queijos fabricados no Brasil, o prato destaca-se como um dos produtos lácteos mais populares e um dos queijos mais importantes, uma vez que está entre os de maior produção e consumo no país. Foi introduzido por imigrantes dinamarqueses, na década de 1920, na região sul de Minas Gerais (FURTADO; LORENÇO NETO, 1994). Este produto, bem como sua variedade, é derivado dos queijos holandeses clássicos de massa lavada, como o gouda e o edam e dos queijos dinamarqueses, como o dambo e o tybo (DENDER et al., 1986).

A tecnologia de fabricação do queijo prato no Brasil foi adaptada às condições locais, explicando-se, assim, as diferenças de sabor e textura em relação aos queijos originais, apresentando textura fechada ou com olhaduras regulares ou irregulares (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

O queijo prato tem coloração amarela e o peso varia de 0,4 a 5 kg, de acordo com a variedade correspondente. Sob a denominação de queijo prato estão incluídas as variedades lanche (retangular), cobocó (*low cylindrical*),

gouda (esférico) e estepe (*square*), dentre outros, diferindo quanto ao formato e ao peso (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; MINUSSI et al., 1995; OLIVEIRA, 1986). A variedade lanche é a de maior consumo (CICHOSCKI et al., 2002).

2.4 Pasteurização do leite

O leite é um produto perecível e a pasteurização é a forma de prolongar o seu tempo de conservação, preservando as características naturais, além de torná-lo seguro, do ponto de vista de saúde pública. As normas de pasteurização adotadas no Brasil seguem o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura, aprovado pelo Decreto nº 30.691, em 29/03/52 e alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25/06/62, no qual são detalhados os diversos limites admissíveis para o leite de consumo e industrializado (BRASIL, 1980). No artigo 517 desta Lei, a pasteurização é definida como o emprego conveniente de calor, com o fim de destruir totalmente a flora microbiana patogênica, sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio químico do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades sensoriais normais.

As condições de temperatura e de tempo para o tratamento térmico de um alimento são, geralmente, definidas tendo como base o microrganismo ou a enzima mais termorresistente que se deseja eliminar. Em processos contínuos, como a pasteurização HTST, o fluido alimentício é aquecido até a temperatura de processamento e, então, escoado por um tubo de retenção, antes de ser resfriado (IBARROLA et al., 2002).

A pasteurização resulta na elaboração de queijos com menor risco microbiológico, que é um tema polêmico em relação à segurança alimentar de queijos artesanais elaborados com leite cru. Este processo é controlado pelo

binômio tempo/temperatura e tem como objetivo primário eliminar os microrganismos patogênicos e, como secundário, eliminar a maioria dos microrganismos fermentativos, incluindo as bactérias naturais presentes no leite cru (ABREU, 2000; MCSWEENEY; FOX, 2004).

A interpretação da pasteurização, em função do tempo de aquecimento, varia consideravelmente de país para país e, particularmente, a definição de pasteurização do leite para queijos não é totalmente aceita como é definida para leite de consumo. O leite destinado à industrialização de queijos tem sensível influência da temperatura em seus aspectos tecnológicos (VENTURA, 1981).

Os tratamentos térmicos aplicados na pasteurização dividem-se, classicamente, em pasteurização baixa, lenta, descontínua ou *low temperature long time* (LTLT), e pasteurização alta, contínua, rápida, em placas, conhecida como HTST (sigla para o termo em inglês *high temperature short time*) (TRONCO, 2003).

No Brasil, a legislação vigente (BRASIL, 1980) permite dois processos de pasteurização que são: a) pasteurização lenta, que consiste no aquecimento do leite a 62 °C a 65 °C, por 30 minutos, mantendo-se o leite em grande volume sob agitação mecânica lenta e b) pasteurização de curta duração, que consiste no aquecimento do leite em camada laminar, a 72 °C a 75 °C, por 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria. A legislação em vigor não diferencia o tratamento térmico da pasteurização para o leite de consumo daquele destinado à elaboração de queijos, tanto em relação à temperatura como ao tempo de residência.

A pasteurização do leite destinado à elaboração do queijo, além de proporcionar a segurança alimentar, permite a padronização tecnológica, a uniformização do sabor e a redução da incidência de defeitos e perdas, devido a fermentações anormais. É considerado, portanto, um dos fatores indispensáveis para a qualidade do queijo oferecido no mercado (PACIULLI et al., 2001).

O processo de pasteurização pode ser realizado por diversos meios, com uma grande variedade de equipamentos. Dentre os diversos tipos de pasteurização utilizados no Brasil estão o sistema de ejetor de vapor, a injeção direta de vapor, o vapor indireto (camisa de vapor) e o HTST (sistema de placas). Nas grandes indústrias, o mais utilizado é o sistema HTST, o qual permite a pasteurização de um volume de leite maior, em um espaço de tempo relativamente curto e, nas pequenas e médias indústrias, o sistema de ejetor de vapor ainda é utilizado, principalmente na região sul de Minas Gerais. Nas pequenas indústrias, o sistema ejetor de vapor é utilizado devido à sua eficiência e por não requerer grandes investimentos (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO; VENTURA, 1988; SBAMPATO; ABREU; FURTADO, 1998, 2000; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

A substituição do sistema descontínuo de pasteurização do leite destinado à fabricação de queijos pelo contínuo (sistema de placas ou HTST), nas pequenas indústrias de laticínios, é uma prática bastante comum, principalmente em função da grande oferta de sistemas contínuos, o que está levando à diminuição considerável de seus preços. Entretanto, observações práticas têm demonstrado que queijos prato e afins, fabricados com leites pasteurizados pelos sistemas de placas e injeção direta de vapor, apresentam diferenças sensíveis em suas características sensoriais, bem como nos índices de maturação e no rendimento (SILVEIRA; ABREU, 2003).

Silveira e Abreu (2003), estudando rendimento e proteólise do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema de placas e injeção direta de vapor, concluíram que o sistema de injeção de vapor resultou em maior rendimento da fabricação (litros de leite/kg de queijo) e também proporcionou menor acidez do queijo, no início do processo de maturação.

2.4.1 Sistema *high temperature short time* (HTST)

A pasteurização de curta duração, HTST, consiste no aquecimento do leite em camada laminar, a 72 °C a 75 °C, por 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria, convenientemente instalada e em perfeito funcionamento, provida de dispositivo de controle automático, com termorregulador, registradores de temperatura e outros que venham a ser considerados necessários para o controle técnico-sanitário da operação (IBARROLA et al., 2002).

O sistema de pasteurização HTST, ou sistema de placas, corresponde ao aquecimento e ao resfriamento indireto, ou seja, o leite não entra em contato direto com fluido aquecedor, pois existe uma parede metálica que os separa. Esse princípio é empregado, principalmente, nos pasteurizadores de placas e tubulares em fluxo contínuo e tanques de pasteurização lenta em fluxo descontínuo. Uma vantagem do sistema HTST em relação ao sistema de injeção direta de vapor é que ele permite o emprego do leite pasteurizado em vários produtos de laticínios.

O sistema de placas consiste em placas retangulares onduladas ou com nervuras, em um número variável, colocadas em posição vertical, fechadas umas contra as outras, mas separadas por uma junta de borracha que deixa entre as placas um espaço de circulação. Por este espaço circulam leite, vapor, água quente ou fria, podendo a circulação ser em contracorrente. O pasteurizador de placas é composto de três seções: seção de aquecimento, seção de resfriamento e seção de regeneração ou troca (TRONCO, 2003).

Nos processos de pasteurização HTST (High Temperature Short Time- Alta temperatura e curto tempo) de alimentos não muito viscosos, como o leite, é difundido o uso de trocadores de calor a placas, para o aquecimento e o resfriamento indireto do produto. Neste processo, o trocador é dividido em, no mínimo, três seções de troca térmica: aquecimento, resfriamento e regeneração (GUTIERREZ et al., 2004).

2.4.2 Injeção direta de vapor (IDV)

O sistema de injeção direta de vapor emprega, por meio de um cano inoxidável, o contato direto do vapor de água com o leite. O emprego de vapor direto no leite ficou conhecido como procedimento de Heryng (FLEISCHMANN, 1924), o qual colocava o vapor em forma de névoa no leite, mediante um pulverizador de vapor, aquecendo o leite entre 75 °C e 80 °C. Observava-se, após o resfriamento da mistura, aumento de 10% a 15% no peso inicial do leite.

O tratamento térmico feito pelo sistema de injeção direta de vapor (IDV), através de bicos com difusor e abafador em aço inoxidável, utilizando-se vapor purgado e duplamente filtrado, é importante para a fabricação de queijos, principalmente os especiais, porque acentua as características sensoriais de cada tipo (SILVEIRA; ABREU, 2003).

Ventura et al. (1984) relataram que o queijo tipo prato fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor possui aumento no rendimento, sem variação na sua composição. Esse aumento seria devido ao maior aproveitamento de todos os constituintes do leite. O processo reduz o tamanho dos glóbulos de gordura, fazendo com que ocorra maior retenção dos mesmos na coalhada. Permite também a retenção das soroproteínas desnaturadas e complexadas com as caseínas, o que leva a modificações na massa do queijo, melhorando o sabor, o aroma e a textura. Segundo Ventura (1981), a incorporação de água pode variar de 7% a 11%, em função da pressão de vapor e da temperatura inicial do leite cru, quando se utiliza o sistema de ejetor de vapor, que é bastante similar ao sistema de injeção direta de vapor.

Paciulli et al. (2001) e Sbampato, Abreu e Furtado (1998), avaliando rendimento e retenção de componentes em queijos tipo gorgonzola fabricados com leite pasteurizado pelos sistemas ejetor de vapor e HTST, concluíram que

os melhores rendimentos de fabricação (litro de leite/kg de queijo) foram obtidos com o uso de leite pasteurizado pelo sistema ejetor de vapor. O emprego desse sistema proporcionou melhor aproveitamento de gordura e sólidos totais no queijo, quando comparado com o sistema HTST. Os queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema ejetor de vapor apresentaram maior índice de acidez, maior concentração de metilcetonas, maior umidade e retenção de gordura, resultando em uma massa mais macia e fechada.

O sistema de pasteurização do leite por ejetor de vapor aumenta a retenção de gordura e de umidade na massa do queijo. Esse aumento pode ser explicado pela homogeneização do leite, causada pela turbulência e alta pressão do vapor na câmara de mistura. Essa homogeneização parcial durante a pasteurização do leite forma glóbulos de gordura menos aglomerados, o que também facilita a ação de lipases (SBAMPATO; ABREU; FURTADO, 2000).

2.4.3 Prova de fosfatase e peroxidase

A eficiência da pasteurização é definida pelos testes de fosfatase alcalina e peroxidase. É possível verificar se a pasteurização foi conduzida dentro das temperaturas e tempos corretos, analisando-se a atividade enzimática das peroxidases e fosfatase alcalina. A primeira é uma das enzimas mais termorresistentes, logo, caso tenha sido desnaturada, há indícios de que houve um excessivo tratamento térmico. Por outro lado, se comprovada a atividade enzimática da fosfatase alcalina no leite pasteurizado, há indícios de que a pasteurização não foi conduzida corretamente. Para os leites classificados como longa vida, devido à elevada temperatura empregada, ambas as atividades enzimáticas devem ser nulas (PRATA, 2001).

Utilizado para controle do tratamento térmico, o teste de fosfatase é muito eficiente, pois a fosfatase negativa assegura que todos os microrganismos

patogênicos foram destruídos e que não houve mistura com leite cru. A fosfatase é inativada a 62,8 °C/30 segundos. A peroxidase deve ser positiva, para comprovar que o leite não foi exageradamente aquecido.

2.5 Efeito do calor sobre a composição do leite

A composição do leite sofre uma série de alterações quando submetido a tratamento térmico. O grau de alteração depende da temperatura e do tempo de exposição ao mesmo. O tipo de tratamento térmico a que é submetido o leite destinado à fabricação de queijos é essencial na qualidade final do produto, já que pode promover mudanças nos seus vários constituintes (HASHZUME; SATO, 1988; SAN JOSÉ, 1979).

A maior parte da gordura e das proteínas, de 30% a 50% dos minerais, algumas proteínas do soro e parte da lactose, no processo de fabricação de queijos, contribuem para a formação do extrato seco do queijo, afetando diretamente a sua composição, principalmente nas diferentes frações proteicas e, conseqüentemente, na distribuição de nitrogênio, segundo vários autores.

Quando às modificações ocorridas pelo sistema de injeção direta de vapor, o processo reduz o tamanho dos glóbulos de gordura, fazendo com que ocorra maior retenção das mesmas na coalhada, permitindo também uma maior retenção das proteínas do soro parcialmente desnaturadas e complexadas com as caseínas, devido à intensidade do tratamento. Estas alterações levam a modificações na massa do queijo, que terão reflexo nas variações de sabor, aroma e textura após a maturação. Portanto, não se recomendam temperaturas elevadas para a pasteurização de leite destinado à fabricação de queijos.

Furtado (1973) e Souza (1960) recomendam temperaturas não superiores a 72 °C, para leite destinado à fabricação de queijos. Segundo Retzl e Sghedoni

(1969), o tratamento térmico da pasteurização deveria ser definido para cada tipo de queijo, de maneira a não alterar as características do produto final.

Segundo Stobberup (1985), o calor exagerado rompe o equilíbrio entre o conteúdo de cálcio e fósforo solúveis e a de cálcio e fósforo coloidais, modificando, ao mesmo tempo, as dimensões das micelas coloidais da caseína, assim como o seu grau de hidratação, além de promover a interação entre β -lactoglobulina e κ -caseína.

2.6 Rendimento da fabricação

A quantidade de queijo produzida a partir de uma quantidade conhecida de leite é de grande importância para a indústria queijeira. Os principais fatores que influenciam o rendimento são a composição do leite, principalmente a quantidade de gordura e caseína; a porcentagem de transição dos constituintes do leite para queijo e a quantidade de umidade retida do queijo, além da incorporação de sais insolúveis e da concentração de sal (NaCl) adicionado à massa. Além desses fatores, de acordo com Folegatti (1994), os tratamentos térmicos e mecânicos aplicados ao leite e ao coágulo, durante o processamento, também influenciam, de modo sensível, o rendimento.

As condições de processamento afetam o rendimento, bem como a perda dos componentes do queijo. Os fatores envolvidos têm um efeito pequeno no rendimento, quando tomados individualmente, porém, extrapolados para uma grande produção, o efeito custo/benefício é bastante significativo. Dentre estes fatores, podem ser citados a estocagem, a padronização e a concentração do leite; o meio de crescimento utilizado na preparação da cultura lática; o tipo de cultura, termização e pasteurização; a homogeneização; a adição de cálcio; o tipo de coagulante; a firmeza do coágulo; o tipo de tanque, além do sistema de

manuseio da coalhada, a lavagem da coalhada, a proporção de sal adicionada e a perda de umidade durante a maturação (LAWRENCE, 1993).

De acordo com Furtado e Wolfschoon-Pombo (1979), os fatores que influenciam o rendimento de fabricação podem ser divididos em dois grupos. Os fatores diretos compreendem a composição do leite, a composição do queijo e as perdas de gordura e de proteína do leite para o soro, durante o corte e a agitação da coalhada. Os teores de proteínas e gordura no leite são fundamentais para o rendimento. O teor de umidade afeta, de forma marcante, o rendimento de fabricação do queijo; quanto maior a umidade, maior o rendimento. Entretanto, o valor elevado de umidade provoca reações, como aceleração da maturação, alteração na consistência do produto e diminuição de sua vida útil.

Entre os fatores indiretos estão a estocagem prolongada do leite cru em baixas temperaturas, que pode acarretar mudanças físico-químicas na caseína micelar e o aumento da contagem de psicotróficos, microrganismos capazes de produzir lipases e proteases termorresistentes que podem degradar a gordura e as proteínas do leite. Outro fator que pode influenciar o rendimento é a mastite, uma doença infecciosa, em que ocorre um aumento das células somáticas no leite. O tipo de coalho, as condições de pasteurização do leite e a perda de sais de cálcio durante o tratamento térmico do leite também podem interferir no rendimento dos queijos (FURTADO, 1999).

Um método eficiente para estimar o rendimento da produção de queijos baseia-se nas cifras de transição dos principais constituintes do leite (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO; VENTURA, 1988). Estabelecendo-se índices ideais de recuperação de gordura e caseína, é possível fazer-se uma estimativa do rendimento em queijo para uma determinada quantidade de leite cru. Na literatura sugere-se uma série de fórmulas para estimativa de rendimento. A eficiência da operação pode ser medida comparando-se os resultados de produção com o rendimento teórico. A recuperação da gordura e

da caseína pode ser otimizada para o sistema, e o conteúdo de umidade do queijo pode ser manipulado pela alteração da tecnologia de processamento (PHELAN, 1981).

2.7 A maturação do queijo

A maturação de um queijo compreende um complexo fenômeno de reações, nas quais se formam numerosos produtos, como peptídeos, cetonas, aminoácidos livres e ácidos graxos livres, que irão conferir o sabor, o aroma e a textura característicos do produto final. Esses produtos resultam da transformação dos componentes originais do leite (lactose, caseína, triglicerídeos, etc.), por meio da ação conjugada de determinadas enzimas, sejam elas nativas que resistiram ao tratamento térmico, como o coalho, ou as de origem microbiana (MARTINS et al., 1979).

No período de maturação ocorrem modificações dos componentes do queijo que se traduzem pela melhoria das propriedades sensoriais características de cada variedade. Os três eventos enzimáticos responsáveis pela maturação são a proteólise, a lipólise e a glicólise (FOX et al., 1993); a maturação pode ser caracterizada por uma rede complexa de alterações físicas, químicas e microbiológicas que afetam os principais componentes do queijo. As mudanças que envolvem proteínas e lipídeos são as mais características e significativas (ALBILLOS et al., 2006; SBAMPATO; ABREU; FURTADO, 2000). As reações primárias da maturação dizem respeito à hidrólise das macromoléculas, tais como proteínas, gordura e lactose, em compostos menores que são peptídios, ácidos graxos livres e ácido láctico, respectivamente (FOX et al., 2000).

As principais reações bioquímicas que ocorrem durante a maturação do queijo são a glicólise da lactose residual, por meio da fermentação, em ácido láctico que, por sua vez, combina com o cálcio e produz lactato; uma degradação

parcial das proteínas (proteólise), formando produtos mais simples e solúveis, e a transformação dos triglicerídeos em glicerídeos e ácidos graxos livres, por meio das lípases. Essas reações fornecem aos queijos seu aroma característico. Os principais componentes aromáticos são ácidos graxos livres, aldeídos, cetonas, alcoóis, aminas, ésteres e compostos sulfurados (MCSWEENEY; OTTOGALLI; FOX, 2004). As reações secundárias permitem a degradação dos produtos gerados pelas reações primárias em moléculas mais simples.

Dentre os três eventos da maturação, a proteólise é a mais importante (FOX, 1989), contribuindo para o desenvolvimento do aroma e do sabor característicos e para a redução da firmeza do produto, que se traduz pelo seu amaciamento. Na verdade, o queijo recentemente fabricado apresenta textura borrachenta, que é amaciada, principalmente, durante os quinze primeiros dias de maturação.

A maturação pode ser influenciada pelo leite utilizado, pelo tipo de cultura, por modificações no processo de fabricação e por mudanças nas condições de estocagem do queijo. Nesse período, no qual os queijos são deixados em condições especiais, a massa do queijo é transformada em produto rico em aroma e sabor, dotado de textura, consistência e coloração própria (KOSIKOWSKI, 1986).

Durante a maturação, Spadoti (2003) observou a diminuição da firmeza do queijo prato. Esta redução de firmeza foi correlacionada com a degradação progressiva da matriz proteica pela hidrólise da α_{s1} -caseína com a consequente formação da α_{s1} -caseína por meio do perfil eletroforético do queijo prato, durante 42 dias de maturação.

2.8 Agentes da maturação

As enzimas envolvidas na maturação são numerosas: coalho residual; enzimas endógenas do leite, como a plasmina e as enzimas liberadas pelo fermento láctico e pelos microrganismos contaminantes (FOX, 1989; FOX et al., 1993).

A proteólise, na fabricação de queijos, é a degradação necessária e desejada, sem a qual seria impossível a produção. Esse processo é o resultado do conjunto de enzimas (proteínases e peptidases) provenientes do coalho (renina ou quimosina), do fermento láctico ou, ainda, originados da microbiota contaminante (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). Segundo Minussi (1995), a proteólise do queijo, primariamente da caseína, é considerada como o fenômeno mais importante na maturação, pois afeta, de uma só vez, a textura, a consistência e o sabor.

2.8.1 Enzimas do fermento

O processo de maturação, normalmente, envolve alterações nos microrganismos presentes no queijo, como morte e lise das LAB do fermento, desenvolvimento de uma microbiota adjunta natural do leite e, em diversas variedades de queijo, crescimento de uma microbiota secundária (CROW, 1986; FOX, 1989; MCSWEENEY; OTTOGALLI; FOX, 2004).

As LAB do fermento são as principais responsáveis pela produção de ácido durante a fabricação e, portanto, precisam ser capazes de produzir ácido suficiente para reduzir o pH do leite rapidamente. A microbiota secundária não desempenha nenhum papel ativo durante o fabrico de queijo, mas está envolvida com as bactérias iniciadoras no processo de maturação (BERESFORD; WILLIAMS, 2004; COGAN et al., 1997).

A maior parte dos microrganismos que crescem dentro ou na superfície dos queijos possui proteases endo e exocelulares que são liberadas na maturação.

As bactérias do fermento láctico promovem a liberação de peptídeos da caseína por meio de proteases que elas produzem, podendo, alguns destes peptídeos (hidrofóbicos), conferir gosto amargo aos queijos. Algumas bactérias lácticas produzem grande variedade de peptidases, responsáveis pela liberação dos aminoácidos dos peptídeos produzidos pela ação da quimosina ou das proteases do fermento (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A ação das bactérias lácticas leva, principalmente, ao aparecimento de aminoácidos e peptídeos de cadeia curta, diferindo das enzimas do coalho, que produzem, principalmente, peptídeos de alto peso molecular.

2.8.2 Enzimas do coalho e agentes coagulantes

A coagulação do leite é a etapa fundamental na elaboração de queijos. Para isso, normalmente, utilizam-se enzimas coagulantes que, dependendo de sua origem, apresentam composições enzimáticas diferenciadas, tanto em quantidade (proporção das enzimas) quanto em qualidade (tipo de enzima). As enzimas utilizadas podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou microrganismos, e podem ser utilizadas isoladamente ou misturadas entre si. Esta mistura de enzimas pode proporcionar, entre outros efeitos, um ajuste da taxa de proteólise, durante a maturação, em um nível desejado.

Desde os tempos antigos, a humanidade tem utilizado os extratos do abomasso de bezerras jovens e, por vezes, de cordeiros e cabritos para a fabricação de queijos. Até o século XIX, todos os queijos foram produzidos em propriedades usando extratos frescos de abomasso seco para coagular o leite. Na década de 1850, no entanto, pequenos laticínios foram criados, o que exigia maiores quantidades de coalho.

2.8.2.1 Coalho

Define-se como coalho o extrato do abomaso de animais ruminantes, rico em proteinases ácidas, com atividade coagulante sobre o leite. As demais proteinases de origens diferentes, capazes de coagular o leite sob condições adequadas, são denominadas coagulantes (FOLEGATTI, 1994).

Considerado o primeiro agente proteolítico, o coalho está envolvido no mecanismo de transformação da caseína em queijo (WOLFSCHOON-POMBO, 1983), tendo a função de coagular a caseína presente no leite. O coalho extraído do abomaso de vitelos contém, aproximadamente, 80% de renina e 20% de pepsina bovina (RETTL; SGUEDONI; JULIANO, 1992). A principal enzima do coalho é a renina, que é uma fosfoproteína de ação proteolítica; a quimosina/renina é apontada como uma enzima menos proteolítica que a pepsina (FOX, 1989; VISSER, 1991). Ela atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína entre os aminoácidos (Phe105-Met106), transformando-a em *para*-caseína que precipita em presença de íons cálcio (Ca^{2+}), formando a coalhada (PERRY, 2004).

O mecanismo catalítico das enzimas de coagulação do leite é hidrolisar as ligações peptídicas da κ -caseína entre os aminoácidos (Phe105-Met106), que se localizam na superfície da micela. A hidrólise da κ -caseína desestabiliza a micela de caseína, transformando-a em *para*-caseína, que precipita em presença de íons cálcio (Ca^{2+}), formando a coalhada. A quimosina tem forte atividade por esta região da κ -caseína e proteinases aspárticas. Deve-se também ressaltar que as condições de coagulação do leite, tais como pH, teor de cálcio e temperatura, influenciam fortemente a atividade de coagulação do leite e, principalmente, das enzimas responsáveis pela coagulação, que são altamente dependentes do pH.

A coagulação das micelas de caseína é dividida em fases. Na primeira fase ocorre o ataque enzimático da quimosina/renina, com posterior liberação do glicomacropéptido (porção hidrofóbica 106-169). Na fase secundária há

agregação do fragmento hidrofóbico (sequência de 1 a 105) da κ -caseína, com os outros componentes caseínicos das micelas vizinhas pelas pontes de cálcio, o que resulta na formação da coalhada (LAW, 1987). Uma terceira fase, caracterizada por degradação de outras ligações peptídicas na caseína, tem sido também mencionada por outros autores (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

Uma pequena porcentagem de enzimas do coalho é retida na massa. Essas enzimas presentes continuam a atuar durante a maturação do queijo. As ligações Phe23-Phe24 ou Phe24-Val25 da α -caseína são clivadas no início da maturação, resultando em amolecimento significativo na consistência do queijo. Já a degradação da β -caseína pela quimosina é lenta e ocorre mais tarde no processo de maturação (DALGLEISH, 1987).

A função primária do coalho é hidrolisar o componente estável da caseína (κ -caseína). Entretanto, o uso de coagulantes com baixa especificidade de hidrólise promove uma proteólise extrema, causando a redução no rendimento de fabricação do queijo (FOX, 1989). Os extratos enzimáticos de origem vegetal são capazes de coagular o leite, porém, são excessivamente proteolíticos e inespecíficos, ocasionando problemas de rendimento no queijo, perda de gordura no soro e defeitos indesejáveis de sabor no produto final (GREEN, 1977).

O coalho desempenha papel importante na degradação inicial da α -caseína que, em solução, tem várias ligações suscetíveis à quimosina, à hidrólise das quais é dependente do pH e da concentração de NaCl do queijo (FOX, 1989). Dois fatores estão envolvidos neste processo: a especificidade da enzima e a acessibilidade das ligações peptídicas à enzima. A quimosina cliva, predominantemente, as ligações nas quais estão presentes os aminoácidos leucina e fenilalanina, mas degrada a α -caseína no queijo mais extensamente que a β -caseína, cujas ligações suscetíveis à ação desta enzima estão menos

acessíveis. A β -caseína é muito resistente à proteólise, em queijos maturados por bactérias.

Embora a concentração de β -caseína nestes queijos diminua durante a maturação, os β -peptídeos normalmente produzidos pelo coalho não aparecem, sugerindo que a plasmina e/ou as proteinases bacterianas sejam as causadoras desta degradação (FOX, 1989). Na maioria das variedades de queijos, a β -caseína aparece intacta ao final da maturação. A κ -caseína e a α_{s2} -caseína são proteínas que, por conterem cistina, possuem ligações dissulfídicas determinando sua estrutura, o que pode explicar sua insensibilidade ao ataque da quimosina. Dessa forma, tanto a κ -caseína quanto a α_{s2} -caseína permanecem intactas em queijos maturados por bactérias (FOX, 1989; LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

2.8.2.2 Quimosina obtida por fermentação

Até a década de 1950, coalho bovino foi utilizado quase exclusivamente para a fabricação de queijos. Nessa altura, contudo, houve escassez do abomaso de ruminantes (bezerros) jovens começou a se tornar um problema sério, levando à busca de outros coagulantes. Para satisfazer à demanda por substitutos adequados para o coalho de vitelo, uma nova fonte de quimosina foi desenvolvida, por meio da tecnologia do DNA recombinante, sendo o produto denominado quimosina produzido por fermentação. O código genético para a síntese da quimosina foi inserido em vários microrganismos hospedeiros e a quimosina pode ser produzida na forma pura, através destes organismos transgênicos, por tecnologia de fermentação ou processos biotecnológicos (BARBANO; RASMUSSEN, 1992).

A clonagem e a expressão do DNA podem ser possíveis por meio de vetores de expressão, denominados plasmídeos, que podem ser inseridos em

microrganismos hospedeiros, como bactérias e fungos. Os microrganismos que vêm sendo estudados como hospedeiros na produção industrial de quimosina genética são: *Kluyveromyces lactis* (Gist-Brocades), *Escherichia coli* (Pfizer) e *Aspergillus niger* variedade awamori (Chr.Hansen), embora outras espécies de bactérias e fungos possam ser utilizadas (FOX et al., 1993).

A quimosina produzida por fermentação é idêntica, química, e funcionalmente, à quimosina do coalho de vitelo. Quanto às propriedades tecnológicas, a atividade hidrolítica sobre a caseína, durante o processo de coagulação, e a característica e o grau de proteólise na maturação (responsável pelo desenvolvimento de sabor e textura no queijo) são indistinguíveis nestas duas enzimas. Em relação aos parâmetros intrínsecos ao processamento de queijos, como acidez, teor de cálcio e temperatura, novamente estas enzimas comportam-se de maneira similar (FOLEGATTI, 1994).

Folegatti (1994) avaliou o uso de três tipos diferentes de coalho (bovino, de vitelo e obtido por fermentação) na fabricação do queijo prato e concluiu que os melhores rendimentos de fabricação foram obtidos com o uso de coalhos de vitelo e produzidos por fermentação. O emprego destes coalhos permitiu um melhor aproveitamento de gordura e de sólidos totais do leite no queijo, em comparação com o uso de coalho bovino.

2.9 Proteólise

A proteólise é o evento bioquímico mais complexo e importante que ocorre durante a maturação dos queijos. Considerando-se as diferenças entre práticas de fabricação e protocolos de maturação das muitas variedades de queijos, o padrão de proteólise pode ser resumido como se segue: as caseínas são hidrolisadas pela atividade do coagulante residual retido na massa; normalmente, 30% da renina adicionada ao leite permanecem no coágulo após a dessoragem;

esta renina residual quebra, principalmente, a α_1 -caseína e é mais ativa em pH mais baixo, e pela plasmina, produzindo grandes e médios peptídeos. Estes peptídeos são hidrolisados pelas enzimas das bactérias da cultura láctica e da microbiota secundária a pequenos peptídeos e aminoácidos (MCSWEENEY; OTTOGALLI; FOX, 2004).

A proteólise, na fabricação de queijos, é a degradação necessária e desejada, sem a qual seria impossível a produção. Esse processo é o resultado do conjunto de enzimas (proteínases e peptidases) provenientes do coalho (renina ou quimosina), do fermento láctico ou, ainda, originados pela microbiota contaminante (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). Segundo Minussi (1995), a proteólise do queijo, primariamente da caseína, é considerada o fenômeno mais importante na maturação, pois afeta, de uma só vez, a textura, a consistência e o sabor.

Segundo Fox (1989), a proteólise contribui para a maturação do queijo de, pelo menos, quatro formas, que são: (1) pela contribuição direta em “flavor” ou “off flavor”, como, por exemplo, sabor amargo, ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos a amins, ácidos, tióis, tioésteres, etc.; (2) pelo aumento da liberação de compostos com sabor durante a mastigação; (3) alterando o pH, via formação de NH_3 e (4) modificando a textura por meio da quebra da rede proteica, do aumento do pH e da ligação de água e formação de grupos amina e carboxila.

A hidrólise inicial da caseína é catalisada pela atividade residual do agente coagulante na massa, com menor atuação da plasmina e, talvez, de proteínases de células somáticas (por exemplo, a catepsina D), o que resulta na formação de peptídeos de alto e médio peso molecular. Os produtos formados continuam a ser degradados pelo coagulante, pela ação das enzimas das LAB presentes acidentalmente e do fermento láctico. A produção de pequenos

peptídeos e aminoácidos deve-se à ação de peptidases e proteinases produzidas pelos microrganismos presentes (MCSWEENEY; OTTOGALLI; FOX, 2004).

As reações primárias são responsáveis pela mudança da textura, devido à hidrólise da matriz proteica por enzimas proteolíticas. Os peptídeos e os aminoácidos são substratos para reações catabólicas que geram compostos sápidos e aromáticos, contribuindo diretamente para o sabor do queijo. A proteólise pode variar de muito limitada a muito extensiva, dependendo da característica do queijo produzido. Peptídeos e aminoácidos podem também conferir sabor amargo aos queijos, dependendo da extensão da proteólise e da especificidade da enzima proteolítica (FOX et al., 2000; MCSWEENEY; OTTOGALLI; FOX, 2004).

A proteólise é a responsável direta pelas alterações de textura no queijo e contribui significativamente para o desenvolvimento do sabor. O desenvolvimento da textura do queijo ocorre por meio da quebra da rede proteica, com redução da atividade de água e formação de novas ligações da água com grupos carboxila e amino liberados, e com o aumento do pH (principalmente em variedades de queijos maturados com fungos), facilitando a liberação de compostos sápidos durante a mastigação. Isso contribui diretamente para o sabor, por meio da formação de peptídeos e de aminoácidos livres, bem como a liberação de substratos (aminoácidos) para reações catabólicas secundárias, como transaminação, deaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações de aminoácidos com outros compostos (UPADHYAY et al., 2004).

Devido ao seu papel central na maturação de queijos, a proteólise é comumente utilizada como índice de maturação para diversos tipos de queijos e, de forma geral, envolve a quantificação dos compostos nitrogenados formados durante a maturação. Os métodos para avaliar a proteólise podem ser

classificados em dois tipos, os métodos específicos e os métodos não específicos.

2.10 Índices de maturação

As caseínas são insolúveis em diversos solventes, mas peptídeos produzidos a partir de sua quebra podem ser solúveis e, conseqüentemente, a proporção de nitrogênio solúvel irá aumentar com a proteólise. Este é o princípio de uma série de métodos amplamente utilizados para avaliar proteólise em queijos durante a maturação. Tais métodos são particularmente úteis para a determinação da extensão e da profundidade da proteólise, uma vez que diferentes tamanhos de peptídeos podem ser precipitados pela escolha do solvente e da faixa de pH.

O grau de maturação é definido como sendo a degradação proteica em um queijo produzido e estocado sob condições definidas. O uso da proteólise como um índice de maturação é comumente adotado para muitas variedades de queijos, e envolve separação, quantificação e caracterização dos componentes nitrogenados durante a cura (FARKEY et al., 1990).

A ação enzimática do coalho estende-se por todo o período de maturação do queijo, produzindo peptídeos de altos (e eventualmente baixos) pesos moleculares, porém, sem chegar à produção de aminoácidos (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). Em outras palavras, o coalho é responsável pela produção de grande parte do nitrogênio solúvel em água ou, a pH 4,6, em queijos maturados, embora pouco nitrogênio solúvel em TCA seja resultante de sua ação (FOX, 1989). A extensão da proteólise deve-se, principalmente, à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do queijo.

As proteinases e as peptidases do fermento láctico atuam sobre os peptídeos liberados, principalmente, pelo coalho, produzindo aminoácidos e

compostos de baixo peso molecular. Logo, o índice de profundidade de proteólise relaciona-se à atividade proteolítica do fermento na maturação de queijos (ARDO et al., 1989).

2.10.1 Índice de extensão da proteólise

O índice de extensão da proteólise é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo e expresso como porcentagem do nitrogênio total. A determinação analítica baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína em pH menor que 4,6, em uma amostra de queijo e a quantificação das substâncias solúveis pode ser efetuada pelo método de Kjeldahl. A solubilidade em água, a pH 4,6, é frequentemente utilizada para o fracionamento inicial do nitrogênio como índice da extensão de proteólise, devido, principalmente, à ação de enzimas do coagulante e, em menor extensão, à plasmina, o que resulta em peptídeos grandes (alguns ainda são insolúveis em água) e médios (solúveis em água). As substâncias nitrogenadas solúveis em pH 4,6 (NS) acumuladas no queijo podem ser expressas em relação com o percentual de nitrogênio total (NT), indicando a extensão da proteólise pela equação 1.

$$IEP (\%) = \frac{NS (\%)}{NT (\%)} \times 100 (\%) \quad (1)$$

2.10.2 Índice de profundidade da proteólise

O índice de profundidade da proteólise está relacionado às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular acumuladas durante o processo de maturação, devido à ação de proteases e peptidases sobre proteínas e peptídeos de diversos pesos moleculares, respectivamente. Os produtos são aminoácidos

livres, aminas e oligopeptídeos, entre outros de baixo peso molecular que são quantificados como teor de nitrogênio não proteico (NPN) do queijo. A concentração de NNP pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, utilizando-se o método de Kjeldahl ou, ainda, por determinação direta de aminoácidos. A concentração do teor NNP pode ser expressa com relação ao NT e indicar o índice de profundidade da proteólise pela equação 2.

$$IPP = \frac{NNP (\%)}{NT (\%)} \times 100 (\%) \quad (2)$$

A determinação deste índice é importante, pois ele está diretamente relacionado à ação de endo e exopeptidases bacterianas que venham a produzir aminoácidos e, por meio de descarboxilases e desaminases, outros compostos nitrogenados que colaboram para o sabor típico de cada queijo (SILVEIRA; ABREU, 2003).

2.11 Reologia de alimentos sólidos

A reologia é usualmente definida como sendo o estudo do escoamento e da deformação de materiais, quando estes são submetidos a uma determinada tensão (FOX et al., 2000; PRENTICE; LANGLEY; MARSHALL, 1993). Em alimentos, o termo é frequentemente utilizado referindo-se ao movimento, à deformação e à desintegração da amostra sob ação de uma força.

Estudos reológicos são realizados como método de controle de qualidade em laticínios e como técnica de estudo da estrutura do produto (TUNICK, 2000). Segundo Vélez-Ruiz e Barbosa-Cánovas (1997), a compreensão do comportamento reológico de qualquer alimento é importante nas seguintes etapas durante a sua fabricação: controle de qualidade dos

ingredientes e produtos finais; projetos e avaliação de processos e equipamentos de operações unitárias; caracterização e desenvolvimento de produtos alimentícios para aceitabilidade do consumidor e elucidação da estrutura e das propriedades da textura.

Segundo Rao (1992), a grande maioria dos alimentos apresenta características tanto de sólido elástico como de líquido viscoso, podendo, assim, ser classificados como viscoelásticos. O comportamento desses materiais pode ser explicado por teorias de elasticidade e viscoelasticidade. Sendo assim, o entendimento de conceitos básicos, como força, deformação, tensão e deformação relativa, é importante para descrever o seu comportamento reológico. Existem várias análises utilizadas para determinar as propriedades reológicas dos alimentos semissólidos, mas a análise de perfil de textura (TPA), o teste de relaxação de tensão e o teste de compressão uniaxial são os mais utilizados.

2.12 Perfil de textura

As características de textura da superfície do alimento estão entre os primeiros parâmetros de qualidade avaliados pelos consumidores, sendo fundamentais para a aceitação do produto, mesmo antes de ele ser levado à boca. A textura é composta por um conjunto de atributos sensoriais de elevada relevância, uma vez que estas influenciam ou determinam a aceitação/rejeição do alimento (FUNAMI et al., 2012; KOTWALIWALE; BAKANE; VERMA, 2007; MOJET; KÖSTER, 2005; SZCZESNIAK, 1963; TANIWAKI; HANADA; SAKURAI, 2006).

A análise do perfil de textura (TPA) é um método objetivo de avaliar as propriedades sensoriais. O teste consiste em comprimir uniaxialmente o alimento (amostra em estudo) duas vezes, num movimento recíproco, imitando a

ação da mandíbula. Assim, durante o teste, é realizada uma primeira compressão, seguida por um relaxamento e uma segunda compressão. Desse teste obtém-se um gráfico, força *versus* tempo (Figura 1), a partir do qual se calculam os parâmetros de textura (BOURNE, 1968; HERRERO et al., 2007; HONIKEL, 1998; LAU; TANG; PAULSON, 2000) estabelecidos por Friedman, Whitney e Szczesniak (1963), modificados por Bourne (1968) e apresentados por Vliet (1991), conforme descrito a seguir:

- a) dureza (*hardness*) (F2): força necessária para atingir uma dada deformação;
- b) fracturabilidade (*fracturability*) (F3): força com que o material fratura;
- c) coesividade (*cohesiveness*) ($A_{4,6}/A_{1,3}$): é a extensão até a qual o material pode ser distendido antes de romper irreversivelmente;
- d) elasticidade (*springiness*) ($t_{4,5}/t_{1,2}$): velocidade com que o material deformado volta à sua condição original, após ser retirada a força deformante;
- e) adesividade (*adhesiveness*) ($A_{3,4}$): quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este;
- f) gomosidade (*gumminess*) (dureza x coesividade): energia requerida para se desintegrar um alimento semissólido, ao ponto de ser engolido;
- g) mastigabilidade (*chewiness*) (elasticidade x gomosidade): energia requerida para mastigar um alimento sólido, até o ponto de ser engolido;

- h) resiliência (*resilience*) ($A_{2:3}/A_{1:2}$): medida de quanto a amostra recupera de sua deformação, tanto em termos de velocidade quanto em termos de suas forças derivadas.

A resiliência é um parâmetro que não pertence à análise de perfil de textura convencional, mas vem sendo aplicada ao TPA, por desenvolver um olhar mais próximo da recuperação elástica da amostra; quanto maior o comportamento elástico (propriedade de um material sólido) maior a resiliência (EXTRALAB, 2010).

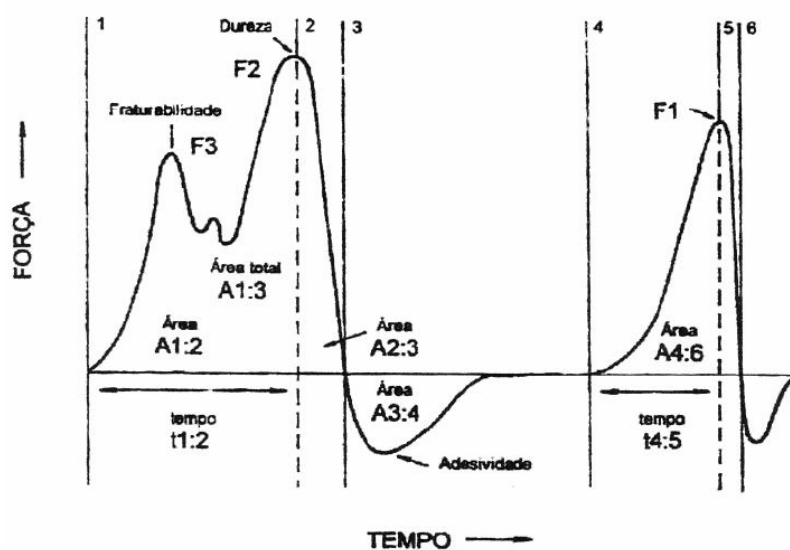


Figura 1 Típico gráfico força *versus* tempo da análise do perfil de textura

A análise de perfil de textura simula a mastigação, exigindo, assim, grandes deformações (de 20% a 50%) (HUANG et al., 2007). Essas deformações fazem com que as amostras entrem em colapso, não sendo adequado para o cálculo de alguns parâmetros, como a adesividade (PONS;

FISZMAN, 1996), uma vez que esse parâmetro é uma característica de superfície (ADHIKARI et al., 2001; BESBES et al., 2009; HUANG et al., 2007).

As características de textura de um queijo maturado estão relacionadas, principalmente, com a degradação das proteínas do queijo, influenciadas por outros fatores, tais como umidade, relação umidade/caseína, sal e atividade proteolítica e peptidolítica das culturas lácticas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Os queijos, em geral, são considerados materiais viscoelásticos (FOX et al., 2000). Vários fatores, principalmente de sua composição físico-química, são conhecidos por influenciar a textura dos queijos, como, por exemplo, os teores de proteína, gordura, sal, minerais e pH (VISSER, 1991).

2.13 Textura de queijos

Como a maioria dos alimentos sólidos e semissólidos, os queijos, em geral, são materiais viscoelásticos. As propriedades reológicas dos queijos são função da sua composição, microestrutura, do estado físico-químico de seus componentes, da força das interações entre os elementos estruturais que o compõe e de sua macroestrutura (presença de olhaduras) (FOX et al., 1998; KONSTANCE; HOLSINGER, 1992).

A textura, ou corpo, é uma característica relevante na determinação da identidade e da qualidade de queijos, interferindo na preferência do consumidor pela variedade específica (ANTONIOU et al., 2000; CREAMER; OLSON, 1982). Essa propriedade é claramente diferente para cada tipo de queijo. Primeiramente, o consumidor identifica e julga uma variedade de queijo pela aparência, a presença ou a ausência de olhaduras e a sensação bucal, características que são percebidas antes da determinação do sabor

(LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Em queijos de massa lavada, as olhaduras estão entre as características de textura.

Os três maiores constituintes dos queijos, caseína, gordura e água, contribuem para a estrutura e textura. As caseínas formam uma malha aberta em que os glóbulos de gordura estão incorporados e, enquanto parte da água encontra-se ligada à proteína, outra parte contém solutos preenchendo os interstícios. A natureza sólida do queijo é determinada pela matriz da paracaseína, que consiste de cadeias de estrutura tridimensional, agregadas e parcialmente fundidas. A rede resultante é uma matriz de natureza viscoelástica (KONSTANCE; HOLSINGER, 1992; VISSER, 1991) que sofre variações na textura e na sensação bucal, fatores perceptíveis considerados de importância pelo consumidor.

2.14 Viscoelasticidade e modelos viscoelásticos

As propriedades reológicas de um material viscoelástico (E, G, etc.) são função do tempo de aplicação da tensão ou da deformação. Um material viscoelástico pode apresentar viscoelasticidade linear ou não linear (RAO, 1992).

No primeiro caso, as propriedades mecânicas dependem apenas do tempo, e não da magnitude da tensão aplicada. Isto significa que, independente dos valores de tensão ou deformação a que o material é submetido, sempre haverá uma relação linear entre a tensão e a deformação (RAO, 1992). Alguns materiais apresentam comportamento viscoelástico linear apenas até certo limite de deformação (em geral muito pequeno). Isso ocorre porque, quando a deformação é pequena ou é aplicada de forma suficientemente lenta, os arranjos moleculares estão muito próximos ao equilíbrio. Nesse caso, a resposta mecânica é apenas uma reflexão dos processos dinâmicos em âmbito molecular

que mudam constantemente, e que ocorrem mesmo quando o sistema está em equilíbrio (CUNHA, 1999).

A segunda classe de materiais viscoelásticos, os não lineares, exibem propriedades mecânicas que variam não apenas com o tempo, mas também com a magnitude da tensão aplicada. Esse tipo de material não pode apresentar nenhuma zona elástica e, em geral, é representado por relações não lineares entre a tensão e a deformação (RAO, 1992). O modelo mais simples e mais comumente utilizado para explicar a viscoelasticidade de sólidos e semissólidos é o corpo de Maxwell, modelo de dois elementos, composto por um sólido elástico ideal conectado em série com um fluido newtoniano.

2.15 Teste de relaxação de tensão

As teorias clássicas, que descrevem o comportamento reológico de materiais idealmente elásticos, não são suficientes para explicar o comportamento de muitos materiais conhecidos, entre eles os alimentos sólidos e semissólidos. A grande maioria desses alimentos apresenta características de sólidos elásticos e líquidos viscosos, podendo, assim, ser classificada como viscoelástica. O comportamento desses materiais pode ser explicado por teorias de elasticidade. Sendo assim, o entendimento de conceitos básicos, como força, deformação, tensão e deformação relativa, é importante para descrever o seu comportamento reológico (RAO, 1992).

O teste de relaxação se baseia na aplicação de uma deformação instantânea a um corpo e na manutenção dessa deformação, durante todo o período do teste. A forma, como o corpo, reage à tensão imposta e é, então, monitorada em função do tempo, como demonstrado na Figura 2 (RAO, 1992; WARD; SWEENEY, 2004). No caso de alimentos, é importante que a

deformação aplicada seja suficientemente pequena para minimizar a ocorrência de alterações estruturais no material (CUNHA, 2002).

No caso de alimentos, é importante que o tempo e a deformação aplicada sejam suficientemente pequenos (na ordem de minutos, por exemplo, 10 minutos ou menos e de 2% a 10% de deformação), para minimizar a ocorrência de alterações físicas no material (CUNHA, 2002; PELEG, 1987), principalmente devido à troca de umidade com o ambiente.

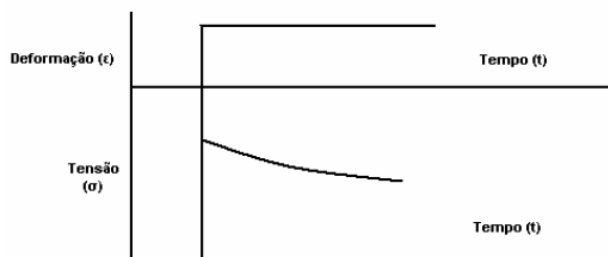


Figura 2 Curva de relaxação de tensão de polímeros semissólidos
Fonte: Ward e Sweeney (2004)

Uma curva de relaxação comum para muitos materiais viscoelásticos é aquela em que ocorre uma queda exponencial da tensão com o tempo, até um valor constante, porém, diferente de zero. Portanto, um corpo de Maxwell não seria suficiente para descrever o comportamento viscoelástico, sendo necessário incluir um elemento adicional, em paralelo, para representar a tensão residual. Esse modelo de três elementos é conhecido como o corpo de Poynting-Thomson (REINER, 1971).

2.16 Modelo de Maxwell

O modelo aplicado para exemplificar a viscoelasticidade de materiais viscoelásticos sólidos e semissólidos é o corpo de Maxwell, um modelo de dois elementos, composto por um sólido elástico ideal conectado em série com um fluido newtoniano (Figura 5a) e que constitui na representação física do modelo. Quando uma tensão é aplicada, o corpo sofre uma deformação inicial finita e instantânea (Figura 5b), devido, exclusivamente, ao elemento elástico. Após a deformação inicial, o elemento viscoso (líquido) começa a fluir, enquanto o elemento elástico permanece com a mesma deformação inicial. O elemento viscoso pode ser representado por um pistão, que se move em um cilindro cheio de líquido (RAO, 1992).

Ao contrário de sólidos elásticos, um fluido não suporta a tensão e, por isso, a deformação varia constantemente quando a tensão é mantida (FOX et al., 2000). Para líquidos viscosos ideais, a tensão de cisalhamento (τ) é proporcional à taxa de deformação ($d\gamma/dt$), sendo a constante de proporcionalidade conhecida como coeficiente de viscosidade (η) e demonstrada na equação 5., a qual demonstra a impossibilidade de um fluido newtoniano sofrer uma deformação instantânea, uma vez que, para isso, o coeficiente de viscosidade teria de ser igual a zero, o que não ocorre em situações reais (RAO, 1992).

No modelo de Maxwell intervêm dois elementos simples que, combinados de formas distintas, representam diferentes comportamentos. Esses dois elementos são o elemento elástico ideal, que pode ser representado como uma mola e cujo comportamento é definido pela constante elástica E , e o elemento viscoso ideal, que é representado por meio de um amortecedor e cujo comportamento é definido pela sua viscosidade η (CAMPUS et al., 2010). É classificado como a mais simples analogia mecânica para representar a viscoelasticidade, obtida pela associação de uma mola de módulo E em série com um amortecedor que contém um fluido de viscosidade η , representado na Figura 3. Esse modelo é comumente utilizado para a predição do comportamento

de relaxação da tensão, pelo fato de a associação em série resultar em tensões iguais nos dois elementos, mola e amortecedor, enquanto a deformação, ou alongamento total, é a soma das deformações nos dois elementos.

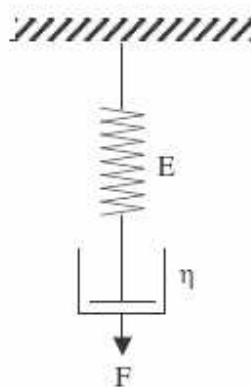


Figura 3 Representação esquemática do modelo de Maxwell
Fonte: Costell, Fiszman e Durán (1997)

No modelo de Maxwell com uma deformação constante (ϵ_0), a tensão ($\sigma(t)$) após um tempo t (NOBILE et al., 2007) é dada por

$$\sigma(t) = \epsilon_0 \left(E \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right) + E_e \right) \quad (1)$$

em que E é o módulo de elasticidade do material, E_e é o módulo de elasticidade de equilíbrio e λ é o tempo de relaxação, dado por η/E . Alguns alimentos viscoelásticos não seguem o modelo simplificado de Maxwell, necessitando de modelos mais complexos para descrever seu comportamento. Um exemplo desse caso é o modelo de Maxwell generalizado (Figura 4), que consiste em um número infinito de modelos de Maxwell mais uma mola em paralelo.

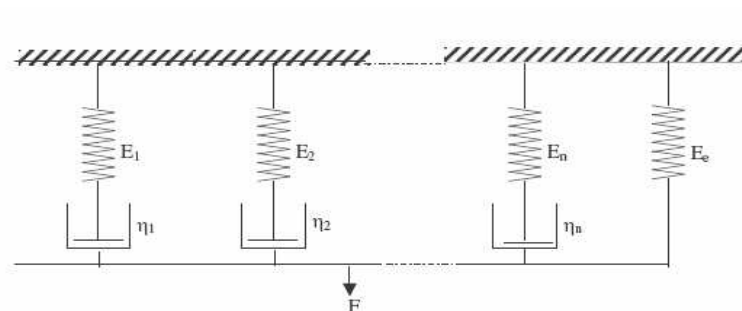


Figura 4 Representação esquemática do modelo de Maxwell generalizado
 Fonte: Costell, Fiszman e Durán (1997)

As curvas de relaxação (tensão *versus* tempo) podem ser ajustadas por meio da equação 2, que fornece parâmetros viscoelásticos do modelo generalizado de Maxwell.

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left(E_1 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + E_2 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right) + \dots + E_e \right) \quad (2)$$

em que $E_1, E_2 \dots$ são os módulos de elasticidade do corpo elástico ideal e $\lambda_1, \lambda_2 \dots$, são os tempos de relaxação.

A viscosidade do elemento i pode ser calculada conforme a equação 3.

$$\eta_i = E_i \lambda_i \quad (3)$$

As propriedades de elasticidade ($E_e, E_1, E_2 \dots$) quantificam a rigidez do material (PELEG, 1987; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009). Já em relação ao tempo de relaxação (λ), Bhattacharya (2010), Campus et al. (2010) e Nobile et al. (2007) afirmam que maiores valores dessa propriedade indicam materiais mais elásticos e, conseqüentemente, mais firmes. Quanto maiores os valores da viscosidade (η)

maior o comportamento sólido do material (PELEG, 1987; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009).

Rensis, Petenate e Viotto (2009) utilizaram o teste de relaxação para caracterizar reologicamente queijos tipo prato com teor reduzido de gordura, após 30 e 60 dias de armazenamento refrigerado. O modelo de Maxwell generalizado utilizado neste estudo foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico dos queijos, já que as curvas experimentais obtidas apresentaram boa correlação.

O corpo de Maxwell é apenas um exemplo de modelo reológico. Muitos alimentos apresentam comportamentos viscoelásticos mais complexos, que podem ser explicados por modelos que combinam elementos elásticos e viscosos arranjados de diferentes maneiras (CUNHA, 2002).

2.17 Modelo de Peleg

Com o objetivo de simplificar a análise dos parâmetros reológicos de alimentos, Peleg (1979) propôs a linearização da curva do modelo de Maxwell generalizado.

No modelo de Peleg, os dados da relaxação de tensão podem ser interpretados por dados da tensão normalizada *versus* o tempo (Figura 5), conforme a equação 4 (PELEG; NORMAND, 1983).

$$\frac{\sigma_0 t}{\sigma_0 - \sigma(t)} = k_1 + k_2 t \quad (4)$$

em que $\sigma(t)$ é a tensão no tempo t durante o teste, σ_0 é a tensão inicial, e k_1 e k_2 são constantes. O inverso de k_1 representa a taxa de decaimento inicial, enquanto k_2 é o valor hipotético da força assintótica normalizada que permanece sem

relaxar (RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009; TANG; TUNG; ZENG, 1998).

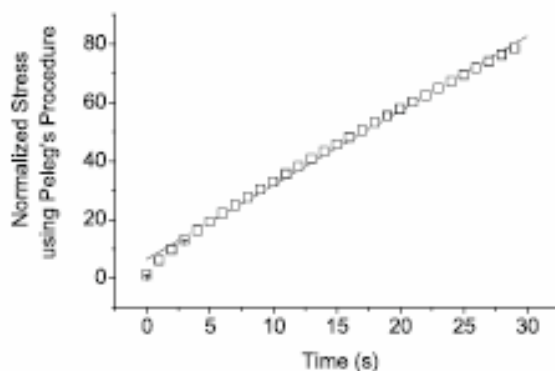


Figura 5 Representação esquemática da tensão normalizada *versus* tempo, do modelo de Peleg

Fonte: Bellido e Hatcher (2009)

De acordo com Bhattacharya, Narasimha e Bhattacharya (2006), Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero e Cuvelier (2009), Sozer e Dalgic (2007), Sozer, Kaya e Dalgic (2008) e Tang, Tung e Zeng (1998), a utilização do modelo de Peleg para descrever os dados de relaxação é um meio simples de descrever e comparar a relaxação de tensão com dados da literatura sobre reologia, uma vez que utiliza somente dois parâmetros: a taxa de decaimento inicial ($1/k_1$) e a tensão normalizada (k_2). O parâmetro k_1 é uma medida da facilidade com que o material se deforma, ou seja, valores mais altos k_1 sugerem um material mais duro, o qual dissipa menos energia, exigindo, assim, mais força para ser comprimido (GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009). Já o parâmetro k_2 representa o grau de relaxamento do material (BELLIDO; HATCHER, 2009; GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009)

e, segundo Peleg (1983) $1/k_2$ representa as condições de equilíbrio do material, ou seja, a porção do material que permaneceu sem relaxar no estado de equilíbrio.

Bellido e Hatcher (2009) utilizaram o modelo de Peleg para apresentar os dados de relaxação de tensão de macarrão asiático e observaram que o procedimento foi eficaz com o entendimento das propriedades viscoelásticas do material.

2.18 Teste de compressão uniaxial

Em ensaios de compressão uniaxial utiliza-se uma deformação suficientemente elevada para levar à ruptura do material. Com isso, é possível a caracterização do produto a baixas ou a altas deformações, independentemente do tipo de força aplicada (ISHIHARA et al., 2011; KARAMAN et al., 2011; KUMAGAI et al., 2009; LU; ABBOTT, 1996). No ponto de ruptura podem-se determinar as propriedades que fornecem informações sobre as características do material e correlacioná-las com a textura do produto. A tensão de ruptura (σ_{rup}) e a deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}), definidas, respectivamente, pelas Equações 5 e 6, devem ser utilizadas em ensaios de ruptura com altos valores de deformação porque consideram as modificações pelas quais o material passa durante o experimento (BAYARRI; DURÁN; COSTELL, 2003; BAYARRI et al., 2007; COSTELL; PEYROLÓN; DURÁN, 2000; SATO; SANJINEZ-ARGANDOÑA; CUNHA, 2004):

$$\sigma = F \left(\frac{h_0 - \Delta h}{A_0 h_0} \right) \quad (5)$$

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{h_0}{h_0 - \Delta h}\right) \quad (6)$$

em que F é a força aplicada, h_0 é a altura inicial, A_0 é a área inicial da amostra e Δh é a variação na altura da amostra durante a compressão.

A tensão de ruptura (σ_{rup}) é definida como a tensão necessária para romper a matriz alimentícia (CUNHA, 2002) e, de acordo com Marudova e Jilov (2003), maiores tensões de ruptura pressupõem um comportamento mais rígido. Já a deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}) indica o quão quebradiça é a textura do alimento, isto é, até que ponto o produto pode ser deformado sem se romper (CUNHA, 2002). Materiais com altas tensão e deformação de ruptura são rígidos e fortes, enquanto materiais com elevada tensão de ruptura, mas com baixo valor de deformação de ruptura, são rígidos e quebradiços.

O módulo de elasticidade (E) e o trabalho na ruptura (W_{rup}) são calculados por meio dos gráficos σ (tensão) – ε (deformação) (Figura 16), sendo W_{rup} dado pela área sob a curva até o ponto de ruptura e o módulo de elasticidade, pelo coeficiente angular da parte linear inicial da curva (THYBO; NIELSEN; MARTENS, 1999).

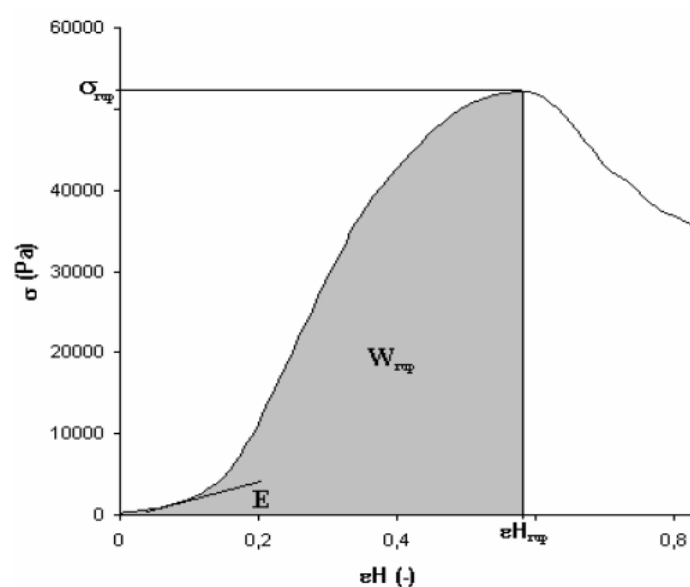


Figura 6 Representação esquemática da curva tensão *versus* deformação
 Fonte: Sato, Sanjinez-Argandoña e Cunha (2004)

2.19 Eletroforese em microchip

A separação e a quantificação de proteínas individuais do leite são considerações importantes na pesquisa de laticínios. Em muitos casos, a identificação e a nomenclatura das proteínas do leite basearam-se Na sua separação por meio de técnicas electroforéticas (FARRELL et al., 2004; SWAISGOOD, 1992). A técnica eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições redutoras e na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE reduzida) continua a ser uma metodologia importante para a separação, a identificação e a quantificação das proteínas do leite (CREAMER; LAWRENCE; GILLES, 1985; PATEL; MISTRY, 1997). Técnicas de PAGE são ferramentas poderosas de separação e, muitas vezes, podem ser adaptadas a outros sistemas.

Muitos dos métodos de separação também podem utilizar um grande volume de materiais, tais como tampões e solventes, muitos dos quais são tóxicos e caros. Nos últimos anos, uma nova técnica de microfluídica tem sido desenvolvida para a separação e a quantificação de proteínas, assim como DNA e RNA (WU; WANG; JENNINGS, 2008).

Atualmente, a técnica microfluídica vem sendo utilizada para separação e quantificação de proteínas do leite, e já pode ser até comparada com técnicas de separação tradicionais, como dodecil sulfato de sódio e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Por meio desta técnica podem-se separar, eficientemente, todas as principais proteínas do leite, que são α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína e κ -caseína, as quais podem ser separadas e quantificadas facilmente com resolução comparável com SDS-PAGE. No entanto, as imunoglobulinas, a lactoferrina e a albumina do soro bovino não podem ser bem separadas.

As condições de trabalho são vantajosas, visto que obtêm a separação e a quantificação de um número maior de amostras (tipicamente 10), dentro de 30 minutos. Além disso, nesta técnica utiliza-se pequena quantidade de materiais e amostras, tipicamente menos do que 0,5 mL no total do volume por chip (10 amostras), incluindo todas as amostras e reagentes. Este é um dos atrativos do método, pois os níveis de consumo de produtos químicos tóxicos utilizados por esta técnica de análise são muito baixos, e os volumes de amostra necessária são mínimos (ANEMA, 2009). A tecnologia de chip microfluídico pode ser uma alternativa rápida para a separação e a quantificação de proteínas em sistemas de leite à base de proteínas.

2.20 Microscopia eletrônica

A história da microscopia eletrônica iniciou-se com a descoberta da ótica eletrônica geométrica, em 1926, por Busch e da ótica eletrônica de ondas, por French. O microscópio eletrônico de transmissão foi descrito, em 1931, por Max Knoll e Ernst Ruskar e, somente em 1935, foi construído o primeiro microscópio eletrônico de varredura (BOGNER et al., 2007).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite observar e caracterizar microestruturas internas de materiais com alta resolução, enquanto a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é aplicada para observar a superfície de amostras (HINKS, 2009). A observação em MET em alta resolução requer o uso de cortes ultrafinos, com dimensões menores de 100 nm, no entanto, a maioria das bactérias apresenta medidas superiores a esta. Diante desse problema, técnicas convencionais de preparo de amostras de MET são utilizadas ao longo de muitos anos (ELTSOV; ZUBER, 2006).

O protocolo de preparo das amostras baseia-se na fixação química, que transforma o material biológico pela incorporação da substância química que, conseqüentemente, previne a degradação dos componentes celulares; a amostra fixada é desidratada, normalmente emprega-se o etanol, e embebida em resina, que permite realizar cortes ultrafinos e ainda promove resistência em relação ao ambiente do MET. Por fim, os cortes ultrafinos são embebidos em metais pesados para aumentar a dispersão dos elétrons, que aumenta o contraste (ELTSOV; ZUBER, 2006).

O microscópio eletrônico de varredura consiste em excelente sonda de elétrons com energia de 40 keV, que é focada sobre o espécime, do qual faz uma varredura em linhas paralelas (BOGNER et al., 2007). Dessa maneira, a principal aplicação do MEV baseia-se na análise da topografia de superfícies.

As principais vantagens no uso da MEV incluem fácil preparação da amostra, ampla variedade de magnitude, alta profundidade do campo e fácil interpretação das micrografias que são geradas e a diversidade do tipo de

informação, além de ser uma técnica que combina com aspectos da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. As desvantagens baseiam-se, predominantemente, na dificuldade de examinar espécimes isolados e a impossibilidade de examinar amostras hidratadas (JAMES, 2009).

A microscopia é, hoje, uma técnica bem estabelecida com propriedades estruturais e microestruturais para estudos de produtos lácteos. Esta técnica permite a visualização direta da estrutura do queijo. É empregada como uma ferramenta poderosa para entender os relacionamentos entre as propriedades estruturais com outras propriedades físico-químicas, como, por exemplo, observar o estado de gordura após o aquecimento de queijos de massa semicozida.

As razões para utilizar microscopia eletrônica de varredura são numerosas: alta resolução, que permite avaliar vários detalhes em nanômetros de diâmetro, habilidade para estudar superfícies como também estruturas internas (BUCHHEIM, 1982; KALAB, 1981 citados por KALAB, 1993), habilidade para examinar amostras no estado hidratado congelado, possibilidade de comparar resultados e confirmá-los utilizando-se diferentes procedimentos e possibilidade para realizar microanálise de raios X.

Muitas das propriedades do queijo, tais como a textura e o sabor, são determinadas pelo arranjo espacial de seus componentes, incluindo as partículas de caseína, que formam uma matriz proteica, glóbulos de gordura, e dispersa água e minerais (EVERETT, 2007). O arranjo desses componentes na escala micrométrica é conhecido como a microestrutura do queijo. Em queijos, esta microestrutura desenvolve-se quando o leite coagula para formar um gel, geralmente por meio da ação enzimática da quimosina. As alterações nas condições de processo ou a escolha de ingredientes podem alterar a microestrutura do gel, coalhada e queijo e, assim, consideravelmente, as propriedades funcionais do produto final. A capacidade de imagem e de

caracterizar estas mudanças fornece uma ferramenta importante para o controle de qualidade de queijo e outros produtos lácteos.

Os principais constituintes do leite são micelas de caseína, glóbulos gordurosos e proteínas do soro. Os dois componentes anteriores são corpusculares e as proteínas de soro se tornam corpusculares quando coagulam. Mudanças estruturais nestes componentes básicos provocadas pelos processos industriais têm sido estudadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (KALAB, 1993).

Um microscópio eletrônico de varredura opera sob alto vácuo e a preparação extensiva da amostra é necessária antes da análise, devido à alta umidade e ao teor de gordura do queijo. A desidratação é necessária para evitar a vaporização de água no interior da câmara do microscópio. Compostos voláteis, como gordura e outros, também devem ser corrigidos ou extraídos, com o propósito de evitar o derretimento quando a amostra está sob o feixe de elétrons. Essas modificações podem alterar a microestrutura e aumentar a possibilidade de artefatos, tornando a interpretação dos dados difícil.

Embora as técnicas microscópicas sejam as mais utilizadas nos estudos da estrutura do queijo, existem alguns problemas na interpretação das imagens, devido à presença de artefatos gerados durante o preparo da amostra. Dessa maneira, métodos tradicionais combinados com técnicas microscópicas revelam a complexa estrutura do queijo, permitindo, assim, um melhor entendimento do ciclo de desenvolvimento do mesmo.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem evoluído na direção de dar não apenas informações ultraestruturais, mas também analíticas das amostras estudadas. Contando, ainda, com um detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) com raios X, microanálise de raios X, pode-se, além de gerar imagens, determinar a composição química do espécime em estudo, proporcionando a detecção de elementos de interesse. A microanálise de raios X

é uma técnica que tem permitido a análise qualitativa e quantitativa de amostras, permitindo mensurar quase todos os elementos de interesse, ou seja, pode-se detectar o elemento e determinar a localização deste na amostra estudada.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 205 p.

ADHIKARI, B. et al. Stickiness in foods: mechanisms and test methods: a review. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-33, 2001.

ALBILLOS, S. M. et al. Prediction of ripening times of ewe's milk cheese by multivariate regression analysis of capillary electrophoresis casein fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 21, p. 8281-8287, Nov. 2006.

ANEMA, S. G. The use of lab-on-a-chip microfluid SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk protein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 4, p. 198-204, Apr. 2009.

ANTONIOU, K. D. et al. Texture assessment of French cheeses. **Journal Food Science**, Chicago, v. 65, n. 1, p. 168-172, 2000.

ARDO, Y. et al. Studies of peptidolysis during early maturation and its influence on low fat cheese quality. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 44, p. 485-489, 1989.

BARBANO, D. H.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 1, p. 1-2, Jan. 1992.

BAYARRI, S.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Compression resistance, sweetener's diffusion and sweetness of hydrocolloids gels. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 8, p. 643-653, 2003.

BAYARRI, S. et al. Influence of texture on the temporal perception of sweetness of gelled systems. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 7, p. 900-908, Aug. 2007.

BELLIDO, G. G.; HATCHER, D. W. Asian noodles: revisiting Peleg's analysis for presenting stress relaxation data in soft solid foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, n. 1, p. 29-36, Jan. 2009.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F. et al. (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, p. 287-317.

BESBES, S. et al. Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): composition, functional and sensory characteristics of date jam. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 2, p. 406-411, 2009.

BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 97, n. 3, p. 539-546, Mar. 2010.

BHATTACHARYA, S.; NARASIMHA, H. V.; BHATTACHARYA, S. Rheology of corn dough with gum arabic: stress relaxation and two-cycle compression testing and their relationship with sensory attributes. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 89-95, May 2006.

BOGNER, A. et al. A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-stem” imaging. **Micron**, New York, v. 38, n. 4, p. 390-401, July 2007.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic, 2002. 416 p.

_____. Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, p. 223-226, 1968.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 146**, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em: <<http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Portaria%20146.htm>>. Acesso em: 10 out. 2012.

_____. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19690.

_____. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA**. Brasília, 1980. 116 p.

CAMPUS, M. et al. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, n. 1, p. 192-198, Jan. 2010.

CICHOSCKI, A. J. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4, p. 329-336, 2002.

COGAN, T. M. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.

COSTELL, E.; FISZMAN, S. M.; DURÁN, L. Propiedades físicas I: reología de sólidos y textura. In: AGUILERA, J. M. (Ed.). **Temas em tecnologia de alimentos, CYTED - Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para el desarrollo**. Ciudad del México: Instituto Politécnico Nacional, 1997. p. 215-260.

COSTELL, E.; PEYROLÓN, M.; DURÁN, L. Note: influence of texture and type of hydrocolloid on perception of basic tastes in carrageenan and gellan gels. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 6, p. 495-499, 2000.

CREAMER, L. K.; LAWRENCE, R. C.; GILLES, J. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Melbourne, v. 20, p. 185-203, 1985.

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

CROW, V. L. Utilization of lactate isomers by *Propioni-bacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: regulatory role for intracellular pyruvate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 352-358, 1986.

CUNHA, C. R. **Efeito do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento, proteólise e propriedades viscoelásticas de queijo minas frescal de reduzido teor de gordura**. 2002. 129 p. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

_____. Reologia e a funcionalidade dos ingredientes. In: WORKSHOP REOLOGIA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS, 1., 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1999. 1 CD-ROM.

DALGLEISH, D. G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P. E. (Ed.). **Cheese: chemistry physics and microbiology**. London: AVI, 1987. v. 1, p. 71-87.

DENDER, A. G. F. van et al. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 41, n. 247, p. 3-13, 1986.

DUTRA, E. P. R. **Fundamentos de fabricação de queijos**. Juiz de Fora: ILCT/EPAMIG, 1997. 127 p.

ELTSOV, M.; ZUBER, B. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. **Journal of Structural Biology**, New York, v. 156, n. 2, p. 246-254, Nov. 2006.

EVERETT, D. W. Microstructure of natural cheese. In: TAMIME, A. Y. (Ed.). **Structure of dairy products**. London: Blackwell, 2007. p. 170-201.

EXTRALAB, B. **Programa exponent lite Express**. Versão 5.0. Jarinú: TEE32, 2010. Software.

FARKYE, N. Y. et al. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874-880, Apr. 1990.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, June 2004.

FLEISCHMANN, W. **Tratado de Lecheria**. Barcelona: G. Gili, 1924. 240 p.

FOLEGATTI, M. L. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* (var. awamori) na fabricação do queijo tipo Prato**. 1994. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 389-438.

_____. Cheese rheology and texture. In: _____. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p. 177-185.

_____. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 1998. 587 p.

FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J. E.; SZCZESNIAK, A. S. The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, p. 390-396, 1963.

FUNAMI, T. et al. Texture design for products using food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 412-420, Mar. 2012.

FURTADO, M. M. **Tecnologia de fabricação de queijos**. 3. ed. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1973. 215 p.

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

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento, parte 1, determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-9, set./out. 1979.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; VENTURA, R. F. P. Pasteurização do leite por ejetor de vapor: considerações sobre a diluição do leite e rendimento da fabricação do queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 43, n. 256, p. 3-9, mar./abr. 1988.

GREEN, M. L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 159-188, 1977.

GUO, Z.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. Characterization of masa and low-moisture corn tortilla using stress relaxation methods. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 30, n. 2, p. 197-215, July 1999.

GUTIERREZ, É. M. R. et al. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 596-601, out./dez. 2004.

HASHZUME, K.; SATO, T. Gel-forming characteristic of milk proteins: effects of heat treatment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 1439-1446, Dec. 1988.

HERRERO, A. M. et al. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. **Meat Science**, Barking, v. 77, n. 3, p. 331-338, Nov. 2007.

HINKS, J. A. A review of transmission electron microscopes with in situ ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 267, n. 23/24, p. 3652-3662, Dec. 2009.

HONIKEL, K. O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 4, p. 447-457, Aug. 1998.

HUANG, Y. et al. Characterization of sol-gel transitions of food hydrocolloids with near infra-red spectroscopy. **Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 6, p. 1018-1026, Aug. 2007.

IBARROLA, J. J. et al. Robust controller design for uncertain systems with variable time delay. **Control Engineering Practice**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 713-725, 2002.

ISHIHARA, S. et al. Viscoelastic and fragmentation characters of model bolus from polysaccharide gels after instrumental mastication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1210-1218, July 2011.

JAMES, B. Advances in “wet” electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 3/4, p. 114-124, Apr. 2009.

KALAB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. **Food Structure**, Chicago, v. 12, p. 95-114, 1993.

KARAMAN, S. et al. Dynamic oscillatory shear properties of O/W model system meat emulsions: linear viscoelastic analysis for effect of temperature and oil concentration on protein network formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 107, n. 2, p. 241-252, Dec. 2011.

KONSTANCE, R. P.; HOLSINGER, V. H. Development of rheological test methods for cheese. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 105-109, 1992.

KOSIKOWSKI, F. New cheese-making producers utilizing ultrafiltration. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 6, p. 71-77, 1986.

KOTWALIWALE, N.; BAKANE, P.; VERMA, A. Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, n. 4, p. 1207-1211, Feb. 2007.

KUMAGAI, H. et al. Relationship between flow properties of thickener solutions and their velocity through the pharynx measured by the ultrasonic pulse Doppler method. **Food Science and Technology Research**, Yamagata, v. 15, n. 3, p. 203-210, 2009.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 365-400.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Effect of polymer ration and calcium concentration on gelation properties of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 10, p. 879-886, 2001.

LAWRENCE, R. C. Cheese yield potential of milk. In: _____. **Factors affecting the yield of cheese**. Brussels: International Dairy Federation, 1993. chap. 7. (Bulletin of the International Dairy Federation Special, 9301).

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, Aug. 1987.

LU, R.; ABBOTT, J. A. A transient method for determining dynamic viscoelastic properties of solid food. **Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 39, n. 4, p. 1461-1467, 1996.

MAGALHÃES, F. A. R. **Evolução de características físico-químicas e sensoriais durante a maturação do queijo tipo gorgonzola**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

MARTINS, J. F. P. et al. Maturação de queijo prato: evolução da microflora láctica. **Coleção do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 10, p. 59-72, 1979.

MARUDOVA, M.; JILOV, N. Influence of sodium citrate and potassium-sodium tartrate on gelation of low-methoxyl amidated pectin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 59, n. 2/3, p. 177-180, Sept. 2003.

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, p. 361-371.

MCSWEENEY, P. L. H.; OTTOGALLI, G.; FOX, P. F. Diversity of cheese varieties: an overview. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 2, p. 1-23.

MINUSSI, R. C. et al. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 31-42, 1995.

MOJET, J.; KÖSTER, E. P. Sensory memory and food texture. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 3, p. 251-266, Apr. 2005.

NOBILE, M. A. et al. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, n. 3, p. 978-983, Feb. 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986. 146 p.

PACIULLI, S. O. D. et al. Análise físico-química do leite pasteurizado pelos sistemas HTST e ejetor de vapor e do queijo tipo Gorgonzola elaborado com estes leites. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 318, p. 21-30, 2001.

PELEG, M. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 1, p. 277-281, 1979.

- _____. The basics of solid foods rheology. In: MOSKOWITZ, H. R. (Ed.). **Food texture: instrumental and sensory measurement**. New York: M. Dekker, 1987. p. 3-33.
- PELEG, M.; NORMAND, M. D. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid foods. **Rheological Acta**, Cambridge, v. 22, p. 108-113, 1983.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, mar./abr. 2004.
- PHELAN, Y. A. Standarization of milk for cheesemaking at factory level. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 152-156, 1981.
- PONS, M.; FISZMAN, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 27, n. 6, p. 597-624, Dec. 1996.
- PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001. 128 p.
- PRENTICE, J. H.; LANGLEY, K. R.; MARSHALL, R. J. Cheese rheology. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry physics and microbiology**. 2nd ed. New York: Chapman & Hall, 1993. p. 597-624.
- RAO, V. N. M. Classification description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: ROA, M. A.; STEFFE, J. F. (Ed.). **Viscoelastic properties of solid foods**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 3-47.
- REINER, M. **Advanced rheology**. London: H. K. Lewis, 1971. 862 p.
- 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. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 488-494, 2009.
- RETTL, C.; SGHEDONI, A. Considerações sobre a pasteurização de leite para fabricação de queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 7, n. 139, p. 21-22, jul./ago. 1969.

RETTL, C.; SGUEDONI, A.; JULIANO, A. M. M. Coalhos e coagulantes. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 2, n. 7, p. 27-30, 1992.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 1, p. 202-206, 2009.

SAN JOSÉ, C. Efeitos de la temperatura sobre la leche y sus componentes. **Revista Española de Lechería**, Madrid, v. 34, n. 114, p. 193-211, 1979.

SATO, A. C. K.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CUNHA, R. L. Avaliação das propriedades físicas, químicas e sensorial de preferência de goiabas em calda industrializadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 550-555, out./dez. 2004.

SBAMPATO, C. G.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M. Influência de dois sistemas de pasteurização na composição do leite e do soro do queijo tipo gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, p. 15-22, 1998.

_____. Queijo gorgonzola fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor e HTST: parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 191-200, jan. 2000.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1340-1347, nov./dez. 2003.

SOUZA, E. A. **Tecnologia da fabricação de queijos**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 1960. 116 p.

SOZER, N.; DALGIC, A. C. Modelling of rheological characteristics of various spaghetti types. **European Food Research Technology**, Dresden, v. 225, n. 2, p. 183-190, June 2007.

SOZER, N.; KAYA, A.; DALGIC, A. C. The effect of resistant starch additions on viscoelastic properties of cooked spaghetti. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2008.

SPADOTI, L. M. **Avaliação de propriedades do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação**. 2003. 229 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

STOBBERUP, J. **Elaboración de quesos**: modulo 111-B. Santiago: FAO, 1985. 310 p.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**: I, proteins. 2nd ed. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 63-110.

SZCZESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **Food Science**, Chicago, v. 28, p. 385-389, 1963.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Characterization of gellan gels using stress relaxation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 38, n. 3, p. 279-295, Nov. 1998.

TANIWAKI, M.; HANADA, T.; SAKURAI, N. Device for acoustic measurement of food texture using a piezoelectric sensor. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 10, p. 1099-1105, Dec. 2006.

THYBO, A. K.; NIELSEN, M.; MARTENS, M. Influence of uniaxial compression rate on rheological parameters and sensory texture prediction of cooked potatoes. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 31, n. 1, p. 25-40, 1999.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 2003. 166 p.

TUNICK, M. H. Dairy products rheology: rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 83, n. 8, p. 1892-1898, Aug. 2000.

UPADHYAY, V. K. et al. Proteolysis in cheese during ripening. In: FOX, P. F. et al. (Ed.). **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. p. 391-434.

VAKALESIS, D. G.; PRICE, W. V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, Feb. 1959.

VÉLEZ-RUIZ, J. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheological properties of selected dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 37, n. 4, p. 311-359, 1997.

VENTURA, R. F. **Caracterização do sistema ejetor de vapor na pasteurização de leite destinado à fabricação de queijos**. 1981. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

VENTURA, R. F. et al. Queijo prato: comparação de fabricação usando leite pasteurizado por sistema de placas e ejetor de vapor: nota prévia. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n. 235, p. 59-70, set./out. 1984.

VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semihard cheese. In: WALSTRA, P.; VLIET, T. van (Ed.). **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels: International Dairy Federation, 1991. p. 49-61.

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

WALSTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T. J. Dutch: types varieties. In: _____. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd ed. Maryland: Aspen, 1999. p. 39-82.

WARD, I. M.; SWEENEY, J. **The mechanical properties of solid polymers**. Sussex: J. Wiley, 2004. 382 p.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, nov. 1983.

WU, H. J.; WANG, A. H. J.; JENNINGS, P. M. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 93-101, Feb. 2008.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO: DIFERENTES TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E ENZIMAS COAGULANTES

RESUMO

O experimento foi conduzido na Planta Piloto do Laboratório de Laticínios da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Avaliaram-se o rendimento, a transição de gordura e proteínas do leite para a coalhada e as características físico-químicas do queijo tipo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas de injeção direta de vapor (IDV) e *high temperature short time* (HTST). Também foram avaliados o perfil proteico do leite e soro e o conhecimento da composição físico-química do soro proveniente da manufatura deste queijo, além das taxas de transferência de gorduras e proteínas. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial 2 x 2 x 5 inteiramente casualizado, sendo dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV), duas enzimas coagulantes e cinco períodos de maturação (1, 15, 30, 45, e 60 dias) com três repetições (fabricações). A pasteurização por injeção direta de vapor e coagulante quimosina, resultou em tempo de coagulação maior. O sistema de injeção direta de vapor (IDV) e enzima coagulante quimosina resultou maior influência na transferência de componentes do leite para a coalhada, após o corte, com uma melhor retenção de gordura, quando comparado com o leite pasteurizado com HTST. Houve incorporação média de 15% de água do leite pasteurizado pelo sistema IDV. Os queijos produzidos com leite pasteurizado pelo sistema IDV apresentaram maior valor de proteólise, profundidade e extensão da maturação, quando comparados aos queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema HTST. Os maiores rendimentos de fabricação em L/kg foram observados nos queijos com o uso do coalho bovino, porém, quando o rendimento foi avaliado levando-se em consideração a composição do queijo, o maior índice (gST/L) foi observado nos queijos fabricados com o coalho genético. O sistema de pasteurização por injeção direta proporcionou a menor acidez tanto do leite quanto do queijo. Os queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor apresentaram maior teor de umidade e de gordura no extrato seco, resultando uma massa mais macia e fechada. O uso do coagulante genético resultou em queijos com menor umidade e maiores teores de gordura, proteínas e sólidos totais, não tendo a gordura no extrato seco sido diferente em nenhum dos tratamentos. Os queijos elaborados com o coalho bovino obtiveram os maiores índices de umidade e cloreto de sódio.

Palavras-chave: Pasteurização, enzimas, maturação

ABSTRACT

The experiment was conducted on the Planta Piloto of the Dairy Laboratory of the Universidade Federal de Lavras, in Lavras, MG. The yield, the transition of milk fat and protein to curd and the physicochemical characteristics of the prato-type cheese produced with milk pasteurized by the systems of direct steam injection (IDV) and *high temperature short time* (HTST). The protein profile and soro and the knowledge of the physicochemical composition of the whey coming from making of this cheese, in addition to the rates of fat and protein transfer were also evaluated. The experimental design utilized in this experiment was a completely randomized 2 x 2 x 5 factorial, that is, two pasteurization systems (HTST e IDV), two clotting enzymes and five maturation periods (1, 15, 30, 45 and 60 days) with three replications (makings). The direct steam injection and clotting chymosin, resulted into increased clotting time. The direct steam system (IDV) and clotting enzyme chymosin resulted into greater influence on the transfer of the milk components to the curd after the cut, with a better fat retention when compared with the HTST-pasteurized milk. Houve incorporaco média de 15% de água do leite pasteurizado pelo sistema IDV. The cheeses produced with IDV system-pasteurized milk presented greater value of proteolysis, depth and maturation extent when compared with the cheeses made with HTST- system-pasteurized milk. The highest cheesemaking yields in L/kg were found in the cheeses with the use of the calf rennet, but, when the rendimento was evaluated, taking into consideration the cheese composition, the **greatest index** (gST/L) was observed in the genetic rennet-made cheeses. The direct injection pasteurization system provided the lowest acidity both of the milk and of the cheese. The cheeses made with the milk pasteurized by the direct steam injection system presented higher moisture and fat content in the dry extract, resulting into a softer and closer curd. The use of the genetic rennet resulted into cheeses with less moisture and higher fat, protein and total solid contents, the fat in the dry extract not having been different in any of the treatments. The cheeses manufactured with the calf rennet obtained the highest indices of both moisture and sodium chloride.

Key words: pasteurization, enzymes, maturation.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os métodos de aquecimento da massa de queijos, existem dois grupos principais, com base na existência ou não de uma parede condutora de calor entre os meios interferentes. No primeiro, são denominados sistemas indiretos e, no segundo, sistemas diretos, ambos são ainda caracterizados segundo fluxo, ou seja, contínuo ou descontínuo. Praticamente a totalidade dos aquecedores em laticínios utiliza o sistema indireto. Tal princípio é empregado principalmente nos pasteurizadores de placas e tubulares em fluxo contínuo e tanques de pasteurização lenta em fluxo descontínuo. Tais equipamentos são utilizados para leite de consumo e leite como matéria-prima para derivados.

O sistema de injeção direta de vapor (IDV) é considerado o primeiro sistema de pasteurização do leite destinado à industrialização de queijos no Brasil. Baseia-se na condensação de vapor diretamente no leite, permitindo um aquecimento rápido em fluxo contínuo. Seu custo é relativamente mais baixo e de fácil funcionamento, quando comparado a um sistema de pasteurização mais complexo, o que permitia a sua utilização em um grande número de pequenas e médias indústrias queijeiras com menor poder aquisitivo.

O controle do rendimento de fabricação é de grande relevância econômica, visto que a viabilidade da produção de queijos é determinada pelo rendimento de fabricação. A escolha do tipo de coagulante é um fator importante no rendimento, uma vez que a enzima deve aliar a ação coagulante com elevada especificidade. No Brasil, o coalho bovino tem sido utilizado para a coagulação do leite na produção de vários tipos de queijos. Este coalho é extraído do abomasso de ruminantes, principalmente de bovinos jovens ou adultos e composto de quimosina e pepsina. O coalho extraído de animais jovens contém, em média, 80% de quimosina e 20% de pepsina bovina, enquanto no de animais adultos a proporção se inverte.

Em razão do crescimento da produção mundial de queijos, outras fontes de enzimas coagulantes do leite têm sido pesquisadas, para se encontrar substitutos de renina adequados e econômicos. Dentre os substitutos de renina utilizados comercialmente estão a quimosina obtida por fermentação (coalho genético) e os coagulantes microbianos (FOX et al., 2000).

Recentemente, técnicas avançadas de engenharia genética permitiram a produção de um coalho a partir da fermentação de microrganismos transgênicos, composto de 100% de quimosina. O coalho obtido por fermentação apresenta algumas vantagens, se comparado aos coalhos tradicionais, incluindo pureza, oferta constante no mercado, custo reduzido e elevada eficiência no rendimento.

A substituição do coalho bovino em queijos tipo prato pode resultar em diferenças no rendimento e na composição química, já que diferentes tipos de agentes coagulantes apresentam diferenças na atividade coagulante e na atividade proteolítica.

Em face do exposto, neste trabalho foram avaliadas alternativas na caracterização do queijo tipo prato. Avaliaram-se a influência do tipo de pasteurização pelos sistemas de aquecimento indireto HTST e injeção direta de vapor (IDV) e a influência da utilização de duas diferentes enzimas coagulantes na fabricação destes queijos. Como objetivos específicos, avaliaram-se o rendimento, o tempo de fabricação e a composição dos queijos em função destes tratamentos, além do comportamento das enzimas coagulantes (coalho bovino e da quimosina produzida por fermentação ou coalho genético), durante a maturação dos queijos e seu papel na proteólise.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

O experimento foi desenvolvido nas instalações da Planta Piloto do Laboratório de Laticínios localizado no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. As análises de perfil eletroforético do leite, do soro e dos queijos foram realizadas na Embrapa Gado de Leite, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG.

2.2 Pasteurização do leite

O leite de plataforma (tipo C), padronizado a 3,5% de gordura e proveniente de um mesmo tanque, foi dividido em duas partes, depois de retiradas amostras para análises físico-químicas. A primeira parte foi destinada à pasteurização pelo sistema de injeção direta de vapor (IDV) e a segunda, pelo sistema HTST, ou sistema de placas. No sistema HTST, o leite foi aquecido a 72°C, por quinze segundos, enquanto, no sistema IDV, utilizou-se o binômio tempo/temperatura de 65 °C/5 min. Em ambos os processos foi utilizado o resfriador de placas para o resfriamento do leite.

2.3 Tratamentos

Foram realizadas três fabricações de queijos para cada tratamento, num total de doze fabricações. Os tratamentos foram divididos da seguinte forma:

T1) leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®);

T2) leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina obtida por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

T3) leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®);

T4) leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina obtida por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

2.4 Análises físico-químicas do leite

2.4.1 Amostragem do leite

Foram coletadas amostras (300 mL) do leite cru e pasteurizado pelos dois sistemas, considerando as normas técnicas de coleta de amostras. Depois de coletadas, as amostras foram devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas e conduzidas ao laboratório para as devidas análises. Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas do leite cru:

- a) **fosfatase alcalina e peroxidase** - as análises de peroxidase e fosfatase foram realizadas segundo técnicas descritas por Brasil (2006);
- b) **gordura** - o teor de gordura das amostras de leite foi determinado pelo método butirométrico de Gerber (BRASIL, 2006);
- c) **densidade a 15 °C** - a densidade do leite foi determinada utilizando-se termolacto-densímetro (BRASIL, 2006);
- d) **proteína** - as proteínas foram quantificadas pelo método de Kjeldahl, conforme descrito pela Association of the Official

Analytical Chemists - AOAC (2005), tendo os valores de nitrogênio sido multiplicados pelo fator de conversão 6,38, para os valores equivalentes de proteína;

- e) **sólidos totais** – para a determinação do teor de sólidos totais do leite foi adotado o método de secagem em estufa, a 105 °C (BRASIL, 2006);
- f) **d) acidez titulável** - a acidez titulável foi determinada por meio de titulação com solução Dornic (indicador: fenolftaleína a 1,0%) e os resultados expressos em porcentagem de ácido láctico (BRASIL, 2006);
- g) **pH** - o pH dos queijos foi determinado com o auxílio de um potenciômetro da marca Tecnal (modelo Tec-3MP) previamente calibrado, efetuando-se quatro leituras por amostra;
- h) **cinzas** - o teor de cinzas foi medido gravimetricamente, após calcinação das amostras em mufla, a 550 °C, segundo AOAC (2005);
- i) **cloretos** - o teor de cloretos foi determinado por titulação potenciométrica dos íons cloretos em meio ácido com solução padrão de nitrato de prata de acordo com Brasil (2006);
- j) **eletroforese em microchip.**

Amostras de leite foram submetidas à ultracentrifugação em triplicata (40.000 x g), a 4 °C, por 60 minutos, utilizando ultracentrífuga Hitachi – Modelo Himac CR21, Japão. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante (fase solúvel) foi separado para análise do perfil proteico. O perfil proteico foi determinado pela técnica de eletroforese microfluídica utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany) e kit específico para a determinação proteica (Protein 80 LabChip kit) (COSTA et al., 2008, 2010; DOOLEY et al., 2010).

As condições de trabalho utilizadas foram: solução tampão (pH= 3,0), usada para separar as proteínas presentes na solução, era constituída de 6,0 M de ácido cítrico e 0,05% (m/v) de hidroxipropilmetil celulose. Foi adicionado 2-mercaptoetanol (5 μ L: 1 μ L de tampão) à solução tampão das amostras. As amostras das soluções proteicas foram diluídas na proporção de 1:4, com a solução tampão das amostras e deixadas em repouso, por 2 horas, antes de preparadas para serem colocadas no chip. Frações de α -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Sigma-Aldrich/St Louis, MO, EUA) foram utilizadas como padrões. Os reagentes foram preparados de acordo com as instruções do protocolo do fabricante; o kit contém Gel Dye Mix, solução de descoloração, solução de desnaturação e um *ladder*. As amostras para a eletroforese foram preparadas em tubos de pequeno volume (0,5 mL); uma alíquota da solução de *ladder* (6 μ L) foi colocada em um tubo separado. Foram combinados 4 μ L da amostra de proteína diluída com 2 μ L de solução de desnaturação do kit Protein 80, em tubos de 0,5 mL. Depois desse procedimento, as amostras (4 μ L) foram desnaturadas (aquecidas), a 100 °C, por 5 minutos, juntamente com o *ladder* (6 μ L). Logo após o aquecimento, as amostras e o *ladder* foram resfriados em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados para assegurar que a amostra de líquido permanecesse no fundo dos tubos, antes de ser diluída com 84 μ L de água, agitada e colocada nos poços do chip. Todos os chips foram carregados com dez amostras, em três repetições cada um.

2.5 Caracterização dos queijos tipo prato

2.5.1 Fabricação dos queijos

Neste experimento foram realizados quatro processamentos em datas diferentes. Em cada processamento foram fabricados três lotes de queijos tipo

prato. Um lote foi elaborado com seis fabricações (tratamentos - T1 e T2), assim que o leite pasteurizado por injeção direta de vapor foi recebido na planta piloto e os outros lotes (tratamentos - T3 e T4) foram elaborados com leite pasteurizado por sistema HTST no dia subsequente. Os queijos foram analisados com cinco idades de maturação (1, 15, 30, 45 e 60 dias) e com três repetições (fabricações) cada tratamento. Os queijos, após a embalagem, foram armazenados em câmara fria, a 10-12% de umidade, à temperatura de 12 °C, iniciando-se, então, a contagem dos dias de maturação.

Para a fabricação dos queijos, foram utilizados tanques com capacidade para 50 litros de leite. Os processos de fabricação dos queijos foram idênticos para cada partida de leite, assim como as quantidades dos constituintes utilizados. A tecnologia adotada foi segundo Furtado e Lourenço Neto (1994) e está apresentada no fluxograma da Figura 1.

No leite coletado, foram realizadas as análises físico-químicas e a medição de seu volume para cálculo de ingredientes e rendimento. O leite (correspondente a cada tratamento) já pasteurizado foi aquecido a 35 °C e adicionado de fermento mesofílico de uso direto no tanque, na dosagem recomendada pelo fabricante. Posteriormente, após 30 minutos, foram adicionados cloreto de cálcio (250 mgL^{-1}), corante à base de urucum (80 mgL^{-1}), fermento láctico mesofílico tipo O (1%) e coalho (agente coagulante correspondente a cada tratamento). Após a coagulação, depois de conferido o ponto ideal para o corte, o gel foi cortado em cubos de cerca de 0,5 cm de aresta. Após o corte, a coalhada permaneceu em repouso por, aproximadamente, cinco minutos. A mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos (1ª mexedura), com aumento gradativo da velocidade de agitação. Em seguida, foi feita a primeira dessoragem, com a retirada de 30% do soro e foi adicionada água a 80°C, com objetivo de cozimento da massa (2ª mexedura), aumentando-se a temperatura da mistura soro/coágulo em 1 °C, a cada 3 minutos, até atingir 42 °C.

Atingido o ponto da massa, foram realizadas a dessoragem, a pré-prensagem e a enformagem em formas retangulares de 0,5 kg, que foram encaminhadas para a prensagem progressiva dos queijos. A prensagem foi realizada da seguinte forma: 1ª prensagem – 9 kg, durante 30 minutos; 2ª prensagem – 12 kg, por 30 minutos; 3ª prensagem – 15 kg, por 2 horas e 4ª prensagem – 15 kg, por 2 horas. Após a prensagem, os queijos foram salgados por imersão em salmoura 20%, durante 12 horas e secos, por 24 horas, a 12 °C. Depois de secos, os queijos foram embalados a vácuo, em plástico termoencolhível e armazenados, a 12 °C, para maturação, durante 60 dias.

A cultura láctica utilizada foi a Lyofast MOS 0,62®, da marca Sacco, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, na proporção de 40:40:20 respectivamente.

Os coagulantes utilizados foram a quimosina, obtida por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina) e o coalho bovino (Abomasum®), fornecido pela Sacco. Os coagulantes foram utilizados em quantidades suficientes para coagular 25 L de leite, em 40 minutos, à temperatura de 35 °C.

O corante empregado foi o corante natural de urucum diluído em água, na proporção de 8 mL/100 litros de leite.

Para verificar a influência do tipo de tratamento térmico (IDV e HTST) e do tipo de agente coagulante na composição e no rendimento, foram realizados ensaios em triplicata, resultando em 12 ensaios, previamente aleatorizados, para efeito da ordem de execução.

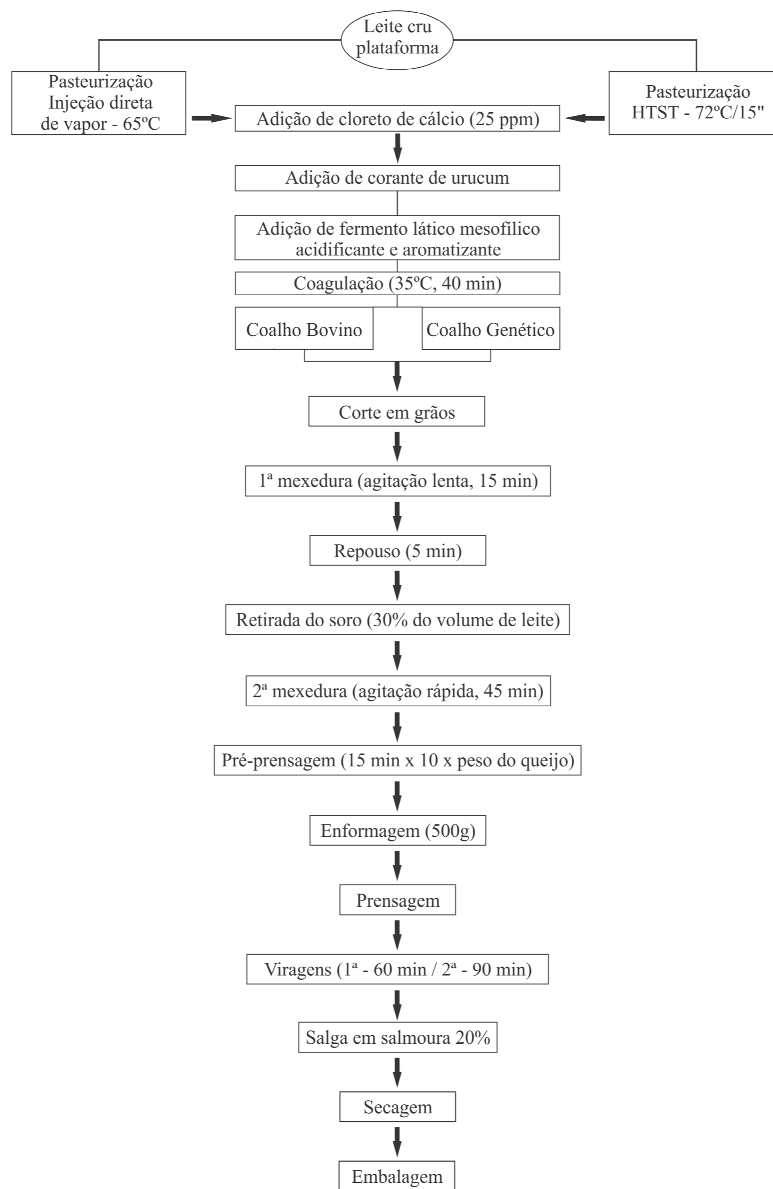


Figura 1: Fluxograma de processamento do queijo tipo prato

Fonte: Furtado e Lourenço Neto (1994)

2.5.2 Análises físico-químicas do queijo tipo prato

2.5.2.1 Amostragem do queijo

Todas as análises foram realizadas no dia da fabricação dos queijos e após 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. As amostras para as análises de composição dos queijos foram preparadas da seguinte forma: para constituição de uma amostra representativa, cada peça de 0,5 kg de queijo foi retirada aleatoriamente da câmara de maturação, de acordo com o planejamento dos experimentos. Cada peça foi dividida em três partes, cortadas em cubos menores, trituradas em multiprocessador e homogeneizadas manualmente para serem utilizadas nas determinações analíticas. O material assim obtido foi acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre (4 a 7 °C) até a sua utilização para as análises de composição do queijo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O acompanhamento da maturação foi conduzido após D, D₊₁₅, D₊₃₀, D₊₄₅ e D₊₆₀ dias, sendo D o dia de fabricação, com armazenamento a 12 °C.

2.5.2.2 Análises físico-químicas do soro no corte

Após a coagulação da massa, procedeu-se ao corte da mesma com auxílio de duas liras, sendo uma vertical e outra horizontal. O soro foi amostrado durante a dessoragem parcial da massa, antes do aquecimento por adição de água, em todos os tratamentos.

As amostras de soro no corte foram coletadas em frascos de vidro, cerca de 5-10 minutos após o corte da massa. O soro foi medido e analisaram-se os teores de gordura e sólidos totais, densidade, acidez, nitrogênio total, nitrogênio

solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12% e cinzas, segundo metodologias descritas nos subitens para leite.

Avaliou-se também o perfil eletroforético dos soros. As amostras de soro do corte analisadas não foram submetidas à ultracentrifugação; as mesmas foram introduzidas diretamente no equipamento, seguindo a mesma metodologia para leite.

2.6 Análises físico-químicas dos queijos

- a) **Umidade** - o teor umidade dos queijos foi determinado segundo o método da AOAC (2005), baseado na técnica de secagem em estufa a 105 °C, por 3 horas e pesagem até peso constante. O conteúdo de umidade foi expresso em porcentagem (g/100 g de amostra).
- b) **Nitrogênio total (NT)** - o teor de nitrogênio total (NT) do queijo foi determinado pelo método Kjeldahl, diretamente sobre uma alíquota de 5 mL, extraída em citrato de sódio 0,5 Mol L⁻¹. As amostras foram digeridas em blocos digestores modelo TE 008/50 e destiladas em destilador Modelo TE-036. Foi utilizado o fator de 6,38 para a estimativa do teor de proteína total.
- c) **Fracionamento do nitrogênio total**
Nitrogênio solúvel a pH 4,6 - Foi determinado após precipitação isoelétrica das caseínas com solução de ácido clorídrico 1,41 Mol/L até pH 4,6, em uma amostra de queijo previamente solubilizada em citrato de sódio 0,5 mol/L. Esta mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman número 42, coletando-se uma solução límpida, coletando-se uma solução límpida, contendo a fração hidrolisada da proteína do queijo, solúvel a pH 4,6. A quantificação destas

substâncias solúveis foi pelo método de Kjeldahl, partindo-se de 5 mL do filtrado.

- d) **Nitrogênio solúvel em TCA 12%** - Após solubilizar as amostras de queijo em citrato de sódio $0,5 \text{ Mol L}^{-1}$, estas foram precipitadas em solução a 12%, com ácido tricloroacético (TCA) e filtradas em papel de filtro Whatman número 42, coletando-se uma solução límpida, que contém peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos. O nitrogênio contido nesta solução foi denominado nitrogênio solúvel e foi quantificado pelo método Kjeldahl, partindo-se de 5 mL do filtrado.
- e) **Cinzas** - O conteúdo de cinzas dos queijos foi determinado segundo metodologia descrita por Brasil (2006), a qual tem como fundamento a eliminação da matéria orgânica à temperatura de $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo-se resíduo mineral fixo.
- f) **pH** - o pH dos queijos foi determinado com o auxílio de um potenciômetro da marca Tecnal (modelo Tec-3MP) previamente calibrado, efetuando-se quatro leituras por amostra.
- g) **Acidez titulável** - a porcentagem de ácido láctico dos queijos foi determinada pelo método de titulação com hidróxido de sódio $0,10 \text{ Mol L}^{-1}$, em presença de fenolftaleína (solução indicadora), conforme descrito por Brasil (2006).
- h) **Gordura total e gordura no extrato seco (GES)** - o teor de gordura total das amostras de queijo foi determinado pelo método butirométrico para queijo, utilizando-se centrífuga tipo Gerber, como descrito por Brasil (2006). Os teores de gordura no extrato seco (GES) foram calculados dividindo-se os teores de gordura do queijo pelo seu teor de extrato seco total.

- i) **Sal e sal na umidade (sal/umidade)** - o teor de sal nos queijos foi determinado pelo método de Volhard modificado, descrito por Kosikowski e Mistry (1997), por meio da titulação do excesso de nitrato de prata adicionado, com solução de tiocianato de potássio. Os teores de sal na umidade dos queijos foram determinados pela fórmula: $\text{sal/umidade (\%)} = (\text{sal/sal} + \text{umidade}) \times 100$.
- j) **Determinação da proteólise** - a proteólise dos queijos foi avaliada por meio da determinação dos teores de nitrogênio solúvel, em tampão de acetato a pH 4,6 e em ácido tricloroacético (TCA) 12%, seguido por Microkjedahl, conforme descrito por Brasil (2006). Os índices de extensão e profundidade de proteólise foram calculados, respectivamente, pelas seguintes fórmulas: $\text{IEP} = (\text{NS pH4,6/NT}) \times 100$ e $\text{IPP} = (\text{NS TCA 12\%/NT}) \times 100$.
- k) **Avaliação da cor** - a cor foi avaliada pelo sistema CIE $L^* a^* b^*$, em que L^* representa o índice de luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); a^* (+), o teor de vermelho e o a^* (-), o teor de verde e b^* (+), o teor de amarelo e o b^* (-), o teor de azul. As medidas de cores foram realizadas com a utilização de um colorímetro (Minolta Chroma Meter, M CR-300b) calibrado para um padrão branco em ladrilho (AOAC, 2005). As leituras foram realizadas em três pontos distintos.
- l) **Atividade de água** - foi determinada em aparelho digital Aqualab, no qual o queijo foi colocado em cápsulas de plástico em quantidade suficiente para cobrir o fundo e, em seguida, foi realizada a leitura até a estabilização do valor.

2.7 Cálculo do rendimento dos queijos

O rendimento da fabricação do queijo, expresso em litros de leite por quilo de queijo ($L\ kg^{-1}$), foi obtido pela divisão do volume total de leite (L) pelo peso total dos queijos (kg), após 24 horas de fabricação. O rendimento foi ajustado ao teor de umidade dos queijos, utilizando a fórmula descrita por Furtado (2005).

Também foram calculados as cifras de perda de gordura e sólidos totais do leite no soro e o aproveitamento de sólidos totais do queijo por litro de leite (FURTADO, 2005).

n) **Cálculo de rendimento e cifras de transferência**

Rendimento técnico - a equação adotada para cálculo de rendimento, em gramas de sólidos totais de queijos por litro de leite (g ST/L), foi

$$R(g\ ST/L) = \frac{P \times ST \times 10}{V}$$

em que

P = peso dos queijos;

ST = sólidos totais dos queijos;

V = volume de leite utilizado.

Para a determinação da cifra de transição, utilizou-se cálculo matemático segundo Furtado (2005). Estes cálculos foram baseados na composição físico-química do leite e do soro de cada fabricação, bem como na composição físico-química dos queijos obtidos pelos dois sistemas de pasteurização e o seu rendimento. A fórmula utilizada para o cálculo de perdas de gordura e proteína bruta no soro está representada a seguir, de acordo com

$$\% \text{ perda gordura soro} = \frac{(\text{kgI} - \text{P}) \text{Gs}}{(\text{kgI}/\text{DI}) \text{GI} \times \text{Ds}} \times 100$$

em que

Ds = densidade (15 °C) do soro

DI = densidade (15 °C) do leite

kgI = quilos de leite

GI = % gordura do leite

Gs = % gordura do soro

P = produção de queijo (kg)

Rendimento econômico

Litros de leite = litros de leite gastos para produzir 1 kg de queijo
kg de queijo

2.8 Análises estatísticas

Foi avaliada a influência do tipo de pasteurização pelos sistemas de aquecimento indireto *high temperature short time* (HTST) e injeção direta de vapor (IDV) e avaliar a influência de duas diferentes enzimas coagulantes na fabricação similar do queijo de tipo prato. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial 2 x 2 x 5 inteiramente casualizado, sendo dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV), duas enzimas coagulantes e cinco períodos de maturação (1, 15, 30, 45, e 60 dias), com três repetições (fabricações).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição físico-química do leite cru e pasteurizado (HTST e IDV)

Os valores médios relativos à composição do leite cru destinado aos tratamentos térmicos e do leite pasteurizado, pelos sistemas HTST e IDV são apresentados na Tabela 1. Os resultados da composição físico-química do leite cru destinado à fabricação dos queijos encontram-se dentro dos padrões de identidade e qualidade do leite fluido de uso industrial. Os valores médios de composição química foram semelhantes aos descritos por outros autores para o leite de vaca. O extrato seco total tem influência importante sobre a coagulação, o que é um fator determinante na qualidade do queijo produzido e na sua qualidade. A variação da composição química do leite depende do efeito de diversos fatores, como tipo de raça, alimentação, amamentação, estágio, etc.

Tabela 1 Valores médios de composição físico-química do leite cru e do pasteurizado, pelos sistemas de placas (HTST) e injeção direta de vapor (IDV).

Parâmetros	Cru	HTST	IDV
Acidez (% ácido láctico)	0,173 a	0,166 a	0,163 a
Gordura (%)	3,47 a	3,27 a	3,17 a
Sólidos totais (%)	12,58 a	12,48 b	11,44 c
Proteína (%)	3,37 b	3,32 a	2,68 a
Crioscopia (°H)	- 0,540 b	- 0,540 b	- 0,487 a
Densidade	1,032 a	1,031 a	1,028 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

Para o leite cru e o pasteurizado pelo processo de placas (HTST), os dados estão dentro da faixa normal, para todos os parâmetros analisados. Entretanto, para o leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor

(IDV), houve variação significativa de maioria dos seus componentes, com exceção dos valores de acidez titulável e gordura, embora ambos apresentassem valores menores, comparados ao do leite cru e do sistema de placas (HTST), devido à incorporação de água ao leite pelo sistema de injeção direta de vapor e, como consequência, diluição dos componentes do leite pasteurizado por este sistema de pasteurização, tais como diluição da acidez e diminuição dos componentes sólidos, o que leva ao abaixamento da densidade. A elevação do teor de água eleva o ponto de congelamento (DPC), fazendo-o se aproximar do da água pura. Para o leite de consumo é uma prática fraudulenta, mas é importante ressaltar que a incorporação de água ao leite pelo processo de pasteurização por injeção direta de vapor para fabricação de queijos não é considerada fraude. Este sistema de pasteurização é muito utilizado em fabricações de queijos e pode ser considerado como uma etapa do processamento, tornando possível um aumento significativo do rendimento, razão de se tornar um sistema unicamente permitido para a produção de queijos. Diante do exposto, o sistema de injeção direta de vapor (IDV) se torna vantajoso para a produção de queijos.

Pode-se observar na Tabela 1 que os valores de acidez titulável, gordura, sólidos totais, proteína bruta e crioscopia foram modificados em função da incorporação de água, no leite pasteurizado, pelo sistema de injeção de vapor. A porcentagem de água diluída ao leite pasteurizado por injeção direta de vapor (IDV) foi de 15%, valor este dentro dos limites de 7% a 15%, citados por Ventura (1981), que alterou as características físico-químicas do leite, pela incorporação de água, alterações essas que variam de acordo com a porcentagem de diluição.

A acidez titulável do leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor se deve à redução do teor de gás carbônico do leite. A diluição do leite, aumentando o seu volume pela condensação de vapor, além da diluição e da

saída do gás carbônico, concorre para que o leite, após o tratamento, apresente perdas de até 2 °Dornic ou 0,16% de ácido láctico 0,2 g (g ácido láctico/100g de amostra). Não houve diferença significativa, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), entre a acidez titulável dos leites crus e pasteurizados pelos sistemas HTST e IDV. O leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor (IDV) apresentou valores numericamente menores de acidez titulável e gordura, devido à incorporação de água de condensação pela injeção de vapor. O índice crioscópico variou ($p < 0,05$), no leite cru, de -0,540 a -0,487, para o leite pasteurizado por injeção direta de vapor, devido à incorporação de água de condensação da injeção de vapor, cuja média foi de 15%. O valor de densidade pelo sistema de injeção direta de vapor foi estatisticamente menor ($p < 0,05$), em relação ao sistema HTST, devido à incorporação de água por meio da injeção de vapor. As proteínas apresentaram diferenças ($p < 0,05$), com valores menores para o leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor (IDV).

Costa Júnior e Pinheiro (1998), Furtado e Partridge (1988) e Silveira e Abreu (2003) encontraram valores próximos aos encontrados no presente estudo. Os valores de sólidos totais foram modificados ($p < 0,05$) em função da incorporação de água, resultados semelhantes aos observados por Silveira e Abreu (2003).

Ventura (1981) observou que as características físico-químicas do leite foram alteradas pela incorporação de água, alterações essas que variam de acordo com a porcentagem de diluição. Silveira e Abreu (2003) observaram diferenças na composição físico-química do leite pasteurizado pelo sistema de injeção de vapor, em relação ao leite pasteurizado pelo sistema HTST. Costa Júnior e Pinheiro (1998) e Furtado e Partridge (1988), trabalhando com leite pasteurizado pelo sistema HTST e pelo ejetor de vapor, que é um sistema semelhante de pasteurização ao IDV, com incorporação de água ao leite, observaram também diferenças na composição do leite.

A composição do leite é um dos fatores importantes no rendimento em queijos, sendo que a percentagem de matéria seca do leite concentra principalmente proteínas e gordura. As variações de raça, estágio de lactação e estado de saúde do animal influenciam a composição do leite, repercutindo na composição final do queijo (PHELAN, 1981), que é extremamente dependente e influenciada pelas características físico-químicas do mesmo, comprometendo, principalmente, os teores de proteínas e gordura que são fundamentais para o rendimento.

3.2 Fosfatase alcalina e peroxidase

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos testes enzimáticos do leite cru e pasteurizado pelos sistemas de placas (HTST) e injeção direta de vapor (IDV) para fosfatase alcalina e peroxidase.

Tabela 2 Testes de fosfatase alcalina e peroxidase no leite cru e pasteurizado, pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor (IDV).

Teste	Cru	HTST	IDV
Fosfatase alcalina	Positiva	Negativa	Negativa
Peroxidase	Positiva	Positiva	Positiva

As enzimas fosfatase alcalina e peroxidase são enzimas naturais presentes no leite. Os testes de fosfatase alcalina e peroxidase foram realizados com objetivo de verificar a eficiência da pasteurização do leite, as curvas de desnaturação destas enzimas encontram-se próximas àquelas da pasteurização. A fosfatase alcalina é inativada em temperatura menor do que a de pasteurização e a peroxidase é um pouco mais resistente e tem temperatura de inativação um pouco mais alta do que a temperatura de pasteurização. O leite pasteurizado

deve apresentar atividade da fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva, o que foi alcançado nos resultados nos dois sistemas de pasteurização utilizados, demonstrando que ambos os leites foram eficientemente pasteurizados (Tabela 2).

A fosfatase é inativada em temperaturas superiores a 72 °C. A peroxidase, por ser mais termorresistente que a fosfatase, permanece ativa por suportar tratamentos térmicos mais elevados que os utilizados na pasteurização normal. Os resultados do presente estudo demonstraram que, em ambos os tratamentos térmicos aplicados ao leite, houve eficiência no processo. O calor aplicado pelos sistemas de pasteurização foi suficiente para inativar a enzima fosfatase alcalina e eliminar os microrganismos de origem patogênica presentes no leite, sem provocar superaquecimento do mesmo (peroxidase preservada).

3.3 Composição físico-química do soro dos queijos no corte

Para a fabricação de queijos é importante o conhecimento da composição do soro. Seu maior ou menor teor de componentes fornece boa indicação das perdas ocorridas durante a fabricação, uma vez que os sólidos do leite serão repartidos entre os grãos de coalhada, que irão formar o queijo e o soro. Quanto menor teor de componentes o soro apresentar, maior será o rendimento do queijo. O sistema de pasteurização por injeção direta de vapor incorpora água ao leite, que irá fazer parte do soro durante a fabricação; o excesso de água sai no soro durante a fabricação, aumentando o seu volume, com conseqüente diluição dos seus sólidos. Pode ser observada, na Tabela 3, a composição físico-química do soro dos queijos no momento do corte.

Tabela 3 Valores médios de composição físico-química do soro do queijo prato.

Parâmetros	SORO CORTE	
	HTST	IDV
Acidez (% ácido láctico)	11,67 b	10,33 a
Gordura (%)	0,53 b	0,37 a
Sólidos totais (%)	7,22 b	7,07 a
Sólidos desengordurados (%)	6,69 a	6,70 a
Crioscopia (°H)	- 0,540 b	- 0,487 a
Densidade	1,028 a	1,024 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

Pode-se observar que o leite pasteurizado por injeção direta de vapor produziu soro com menor teor de gordura (Tabela 3). Provavelmente, dois aspectos devem ser considerados: o primeiro é que ocorre, neste sistema, maior produção de soro, em função da incorporação de água ao leite, como também outro aspecto de maior retenção de gordura nos grãos; a maior retenção de gordura no interior dos grãos ocorre em função da homogeneização do leite pelo sistema por injeção direta de vapor, melhorando a retenção de gordura no interior dos grãos, promovendo um aumento do teor de gordura do queijo, diferença também encontrada por Costa Júnior e Pinheiro (1998) e Silveira e Abreu (2003).

Houve diminuição dos teores de acidez e diluição dos sólidos totais no soro proveniente do sistema de injeção direta de vapor, provavelmente devido à menor diluição do teor de gordura. Os sólidos desengordurados não apresentaram diferença significativa com a utilização dos sistemas de pasteurização HTST e IDV, possivelmente devido ao maior carreamento de sólidos solúveis pelo excesso de água, o que provocou a manutenção da densidade.

3.4 Análise das frações proteicas do leite e soro por eletroforese microfluídica

Os valores médios relativos às frações proteicas do leite cru destinado aos tratamentos térmicos e do leite pasteurizado pelos sistemas de placas (HTST) e injeção direta de vapor (IDV) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Valores médios da distribuição das frações proteicas do leite cru e do pasteurizado, pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor (IDV).

Frações proteicas	Tratamentos		
	Leite cru	Leite IDV*	Leite HTST*
α -lactalbumina	10,8 b	8,8 a	9,60 a
β -lactoglobulina	20,5 a	18,4 b	18,70 a
β -caseína	43,4 a	35,5 b	43,10 a
α_s -caseína	18,35 b	17,34 a	18,08 a
κ -caseína	6,62 b	5,54 a	6,55 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

*Leite IDV (pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor), Leite HTST (pasteurizado pelo sistema de placas).

Para o leite cru e o pasteurizado pelo processo de placas (HTST), os dados estão dentro da faixa normal, para todos os valores de proteínas analisadas. Entretanto, para o leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor (IDV), houve variação significativa de maioria de suas frações proteicas. Para o leite pasteurizado por este sistema, os valores foram menores, comparados ao do leite cru e do sistema HTST, devido à incorporação de água ao leite pelo sistema de injeção direta de vapor e, como consequência, diluição dos componentes do leite pasteurizado por este sistema de pasteurização.

Na Figura 1, aqui apresentada somente para fins ilustrativos, são mostrados os resultados dos eletroferogramas da porcentagem de frações de proteína total das amostras de leite cru, leite pasteurizado pelos sistemas de injeção direta de vapor e HTST, respectivamente. A ordem de eluição é: α -

lactalbumina (pico 1), β -lactoglobulina (pico 2), β -caseína (pico 3), α _s-caseína (pico 4) e κ -caseína (pico 5). Os eletroferogramas são apresentados como unidades de fluorescência (UF) e tempo (S) e da migração do tempo (FU \times S; FU \times tempo).

Na Tabela 5 apresentam-se os valores da distribuição das frações proteicas solúveis do soro, no momento do corte, referentes aos tratamentos em que se utilizaram leite pasteurizado pelo sistema IDV e HTST. Os valores médios para o soro obtido com leite pasteurizado pelo sistema IDV apresentaram os menores valores devido a incorporação de água no leite.

Tabela 5 Valores médios da distribuição das frações proteicas solúveis do soro, leite cru e do pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor (IDV).

Frações proteicas	Tratamentos	
	Leite IDV*	Leite HTSH*
α -lactalbumina	22,80 a	27,70 b
β -lactoglobulina	30,80 a	34,00 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

*Leite IDV (pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor), Leite HTST (pasteurizado pelo sistema de placas).

Na Figura 2 apresentam-se as porcentagens da distribuição das proteínas solúveis α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Os valores para estas duas proteínas foram mais baixos para o leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor, pela incorporação de água do sistema e a consequente diluição dos componentes.

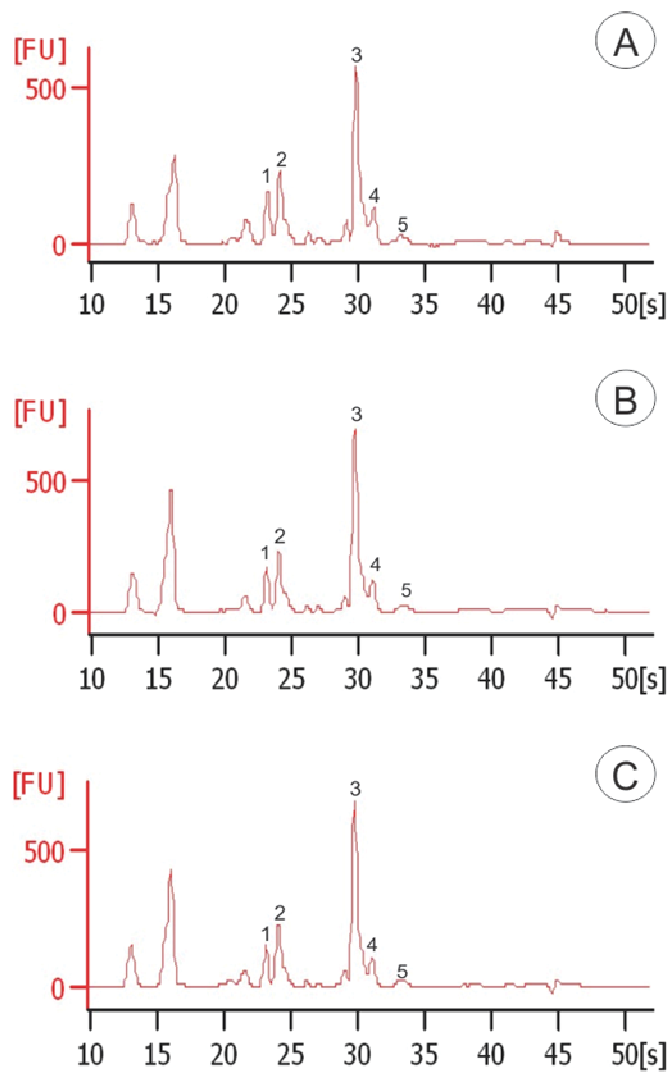


Figura 1 Eletroferogramas das amostras de leite cru (A), leite pasteurizado por injeção direta de vapor (B) e leite pasteurizado por HTST (C). Identificação dos picos α -lactalbumina (pico 1), β -lactoalbumina (pico 2), β -caseína (pico 3), α_s -caseína (pico 4) e κ -caseína (pico 5). Unidade de fluorescência x tempo (FU x segundos).

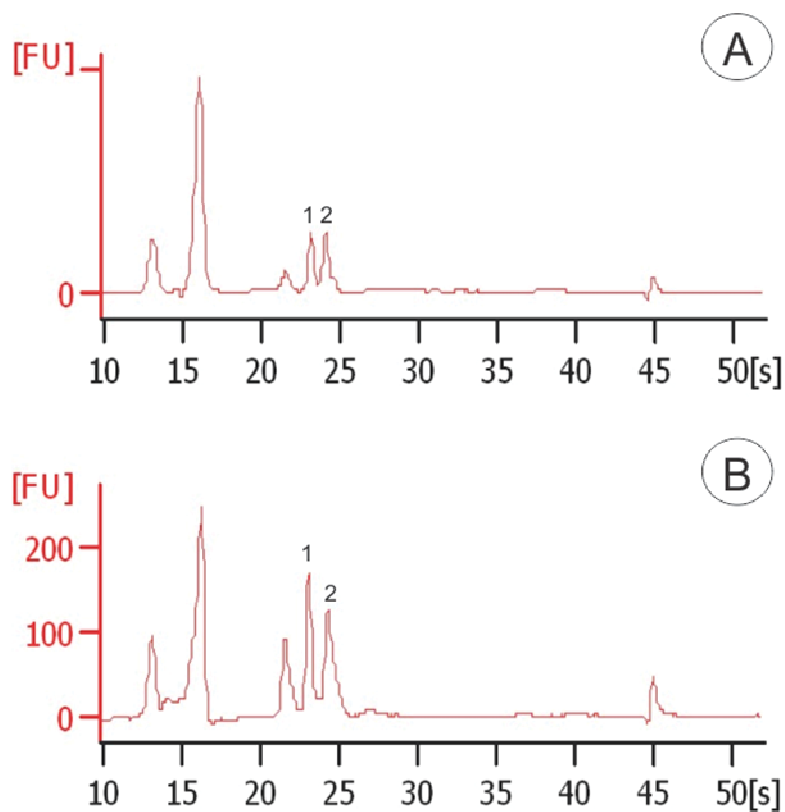


Figura 2 Eletroferogramas das amostras de soro proveniente da pasteurização do leite por injeção direta de vapor (A) e soro proveniente de leite pasteurizado por HTST (B). Identificação dos picos α -lactalbumina (pico 1), β -lactoalbumina (pico 2). Unidade de fluorescência x tempo (FU x segundos).

3.5 Tempo de coagulação do leite nas doze fabricações do queijo tipo prato

O tempo de coagulação para o leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor foi ligeiramente superior ao tempo de coagulação do leite pasteurizado pelo sistema HTST. Este comportamento, provavelmente, é devido à incorporação de água pelo sistema IDV.

Foram observadas diferenças no tempo de coagulação do leite pelos dois tipos de enzimas coagulantes, mesmo utilizando-se quantidades padronizadas dos coalhos, com base em sua atividade. A enzima coagulante que apresentou maior tempo de coagulação foi a quimosina.

De acordo com os dados da Tabela 6, o coalho que apresentou maior tempo de coagulação foi o genético. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Berg e Koning (1990) que, comparando os tempos de coagulação do leite por coalho genético (*Kluyveromyces lactis*) e de vitelo em queijo gouda, encontraram tempos ligeiramente mais altos de coagulação para o genético. O maior tempo de coagulação quando utilizado o coalho genético pode ser explicado pelo fato de que todos os experimentos realizados para comparação da atividade do coagulante genético com outros agentes coagulantes têm sido conduzidos em queijos que utilizam fermento láctico e salga em salmoura.

Tabela 6 Tempos médios, em minutos, para a coagulação do leite pelos diferentes tratamentos avaliados.

Processamentos	Tempo médio de coagulação (minutos)
IDV + Coalho bovino	59
IDV + Quimosina	67
HTST + Coalho bovino	46
HTST + Quimosina	54

3.6 Cálculo do volume de soro obtido da fabricação dos queijos

3.6.1 Cálculo do volume de soro obtido da fabricação do queijo pelo sistema IDV, com utilização do coalho bovino (T1)

$$75 \text{ litros de leite} \times 1,028 \text{ (densidade do leite)} = 77,1 \text{ kg de leite}$$

$77,1 \text{ kg de leite} - 6,55 \text{ kg (quilograma de queijo)} = 70,55 \text{ kg}$

$70,75 \text{ kg}/1,025 \text{ (densidade do soro)} = 68,82 \text{ litros de soro}$

3.6.2 Cálculo do volume de soro obtido da fabricação do queijo pelo sistema IDV, com utilização do coagulante quimosina (T2)

$75 \text{ litros de leite} \times 1,028 \text{ (densidade do leite)} = 77,1 \text{ kg de leite}$

$77,1 \text{ kg de leite} - 6,34 \text{ kg (quilograma de queijo)} = 70,76 \text{ kg}$

$70,76 \text{ kg}/1,025 \text{ (densidade do soro)} = 69,03 \text{ litros de soro}$

3.6.3 Cálculo do volume de soro obtido da fabricação do queijo pelo sistema HTST, com utilização do coalho bovino (T3)

$75 \text{ litros de leite} \times 1,031 \text{ (densidade do leite)} = 77,3 \text{ kg de leite}$

$77,3 \text{ kg de leite} - 6,16 \text{ kg (quilograma de queijo)} = 71,14 \text{ kg}$

$71,14 \text{ kg}/1,028 \text{ (densidade do soro)} = 69,20 \text{ litros de soro}$

3.6.4 Cálculo do volume de soro obtido da fabricação do queijo pelo sistema HTST, com utilização do coagulante quimosina (T4)

$75 \text{ litros de leite} \times 1,031 \text{ (densidade do leite)} = 77,3 \text{ kg de leite}$

$77,3 \text{ kg de leite} - 5,86 \text{ kg (quilograma de queijo)} = 71,44 \text{ kg}$

$71,44 \text{ kg}/1,028 \text{ (densidade do soro)} = 69,49 \text{ litros de soro}$

3.7 Rendimento econômico

O rendimento com base no volume de leite necessário para produzir 1 kg de queijo é um método prático, tradicionalmente empregado nos laticínios, para

avaliação da eficiência do processamento de queijos. O rendimento econômico, encontrado na fabricação dos queijos, está apresentado na Tabela 7, separado por tratamentos.

Tabela 7 Rendimento dos queijos tipo prato.

	IDV + coalho bovino	IDV + coalho genético	HTST + coalho bovino	HTST + coalho genético
Rendimento econômico (L/kg)	7,63 a	7,89 a	8,10 b	8,51 b

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

Pode ser observado, na Tabela 7, que os queijos fabricados com agente coagulante quimosina (tratamentos - T2 e T4) apresentaram o maior rendimento, enquanto os que foram elaborados com coalho bovino (tratamentos - T1 e T3) apresentaram menor rendimento. Os queijos fabricados com leite pasteurizado por injeção direta de vapor apresentaram maior rendimento, quando comparados aos elaborados com leite pasteurizado por sistema de placas. O maior rendimento está relacionado com o maior aproveitamento dos constituintes do leite no sistema de injeção direta de vapor. Em consequência, os queijos fabricados pelo sistema IDV produzem-se queijos com maior teor de gordura total e gordura no extrato seco.

O aumento do rendimento na fabricação pelo sistema IDV foi devido ao maior aproveitamento de todos os constituintes do leite, em função da redução do tamanho dos glóbulos de gordura, fazendo com que houvesse maior retenção dos mesmos na coalhada, permitindo também maior retenção de algumas proteínas do soro, algumas até possivelmente complexadas com as caseínas, devido à intensidade do tratamento.

Estes resultados são coincidentes com os obtidos com Costa Júnior (2003), Furtado e Partridge (1988) e Silveira e Abreu (2003) em que, mesmo

quando os resultados não foram significativos ($p < 0,05$), na maioria dos parâmetros avaliados, apresentaram valores superiores.

A avaliação desses dados aponta o tratamento com pasteurização pelo sistema IDV e coalho bovino como o mais eficiente, uma vez que emprega o menor volume de leite para a produção da mesma quantidade de queijo. Entretanto, o rendimento expresso em litros de leite kg^{-1} de queijo desconsidera a umidade dos queijos obtidos nos diferentes tratamentos. Portanto, a obtenção de maiores quantidades de queijo não significa, necessariamente, que ocorreu um melhor aproveitamento dos componentes sólidos do leite no queijo, podendo ter ocorrido uma maior retenção de umidade. Por este motivo, a avaliação correta deve ser baseada no teor de sólidos totais do queijo.

Pequenas variações no rendimento devido ao coagulante têm sido registradas na literatura (BARBANO; RASMUSSEM, 1992; FOLEGATTI, 1994). Apesar das diferentes atividades proteolíticas das enzimas estudadas, a maioria dos trabalhos mostra diferenças da ordem de, no máximo, 1% no rendimento.

3.8 Rendimento técnico

O rendimento técnico, encontrado na fabricação dos queijos, está apresentado na Tabela 8, em gramas de sólidos totais por litro de leite, separado por tratamentos.

Dentre os métodos de aquecimento (pasteurização), existem dois grupos principais, baseados na existência ou não de uma parede condutora de calor entre os meios interferentes. Praticamente a totalidade dos aquecedores em laticínios utiliza o sistema indireto. Tal princípio é empregado principalmente nos pasteurizadores de placas e tubulares em fluxo contínuo. Por meio da composição inicial do leite, é possível constatar que o leite de maior

concentração de sólidos totais e gordura foi o correspondente ao leite pasteurizado pelo sistema de placas (HTST), tratamentos T3 e T4, o que explicaria este fato, por se tratar de um método de aquecimento indireto, não ocasionando incorporação de água à matéria-prima, como o leite pasteurizado pelo sistema IDV, que pode ter seus valores de sólidos totais modificados em função da incorporação de água no leite.

Tabela 8 Rendimento, em g de ST L⁻¹ de queijo, dos queijos tipo prato.

	IDV + coalho bovino (T1)	IDV + coalho genético (T2)	HTST + coalho bovino (T3)	HTST + coalho genético (T4)
Rendimento em g ST L⁻¹	65,06 b	62,82 b	61,40 a	58,60 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

*ST L⁻¹ Sólidos totais por litro de leite.

3.9 Determinação das cifras de transição do queijo tipo prato

Para a determinação da cifra de transição, utilizou-se cálculo matemático segundo Furtado e Wolfschonn-Pombo (1979). Estes cálculos foram baseados na composição físico-química do leite e soro de cada fabricação, bem como na composição físico-química dos queijos obtidos pelos dois sistemas de pasteurização e o seu rendimento.

Segundo Furtado e Wolfschonn-Pombo (1979), na fabricação de queijos não se obtêm rendimentos iguais de todos os componentes do leite. Os mesmos autores citam que a caseína e a gordura se aproveitam em maiores proporções, aproveitamento que depende, principalmente, do tipo de queijo elaborado e do tamanho dos grãos, entre outros fatores.

No leite com maior teor de gordura, transita uma porcentagem maior de sólidos totais do leite ao queijo, à exceção do leite pasteurizado pelo sistema de injeção direta de vapor, pela diluição do mesmo, devido à incorporação de água

de condensação do ejetor de vapor. Segundo Furtado e Wolfschonn-Pombo (1979), esta afirmação nem sempre é verdadeira, uma vez que foi observado, em várias fabricações, que a porcentagem de sólidos que passou para o queijo se manteve invariável, mesmo quando a quantidade de gordura mudava. Segundo os mesmos autores, este fato está relacionado com o teor de proteína presente no leite e sua relação com a gordura, o que pode ser demonstrado estabelecendo-se uma relação caseína/gordura que influencia de maneira proporcional o rendimento do queijo, ocorrendo maior perda de gordura no soro com o aumento da relação caseína/gordura do leite. Quando se mantém fixa a quantidade de proteínas no leite aumentando-se o fator gordura/proteína, a cifra de transição do sólido do leite para o queijo parece diminuir. Pode-se afirmar que o aumento da gordura provoca aumento no rendimento, porém, é fator interdependente com o teor de proteína.

Os valores médios de rendimento e de transição de sólidos totais e gordura nos processos de fabricação utilizando leite pasteurizado pelos sistemas de placas e IDV e diferentes tipos de enzimas coagulantes (coalho bovino e coalho genético) podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 Retenção de gordura e proteínas dos diferentes tratamentos analisados.

Parâmetros	Tratamentos			
	IDV + coalho bovino (T1)	IDV + quimosina (T2)	HTST + coalho bovino (T3)	HTST + quimosina (T4)
Transição da gordura (%)	89,58 b	88,41 b	83,95 a	84,12 a
Transição de proteínas (%)	72,84 a	71,59 a	71,89	70,92

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

3.11 Composição físico-química dos queijos tipo prato

Na Tabela 4 apresentam-se os valores médios da composição físico-química dos queijos obtidos com os tratamentos T1 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor; com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®)), T2 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor; com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina)), T3 (leite pasteurizado pelo sistema HTST ou sistema de placas, com a adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®)) e T4 (leite pasteurizado pelo sistema HTST ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtida por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina)).

O uso do coagulante genético resultou em queijos com menor umidade e maiores teores de gordura, proteína e sólidos totais, não tendo a gordura no extrato seco sido diferente em nenhum dos tratamentos. Os queijos elaborados com o coalho bovino obtiveram os maiores índices de umidade e cloreto de sódio.

Tabela 10 Resultados médios da composição física e química dos queijos, após secagem.

Parâmetros avaliados	IDV + Abomasum®	IDV + Albamax®	HTST + Abomasum®	HTST + Albamax®
pH	5,07 b	5,12 b	4,94 a	4,92 a
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,72 a	0,75 a	0,87 b	0,81 b
EST (%)	48,69 a	49,02 a	49,48 a	50,61 b
Umidade (%)	51,31 b	50,98 b	50,52 b	49,39 a
Gordura (%)	25,00 a	25,50 a	24,00 a	24,50 a
GES (%)	44,82 a	46,09 a	47,50 a	49,60 b
Nitrogênio total (%)	2,95 a	2,73 a	2,99 a	2,97 a
Proteína total (%)	18,85 a	17,42 a	19,11 a	18,94 a
Cinzas (%)	3,52 a	3,67 a	3,53 a	3,58 a
Sal (%)	1,72 b	1,76 b	1,61 a	1,59 a
Sal/umidade (%)	3,24 b	3,33 b	3,08 a	3,11 a

Atividade de água (Aw)	0,973 a	0,977 a	0,980 a	0,987 a
-----------------------------------	---------	---------	---------	---------

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Valores médios obtidos de seis repetições.

a) Umidade

Ocorreu variação no conteúdo de extrato seco total entre as amostras dos diferentes processos, para o mesmo período de maturação (primeiro tempo) (Tabela 10). A variação do teor de umidade em um mesmo lote está relacionada a variações decorrentes da prensagem coletiva dos queijos (OLIVEIRA, 1986). Os produtos foram prensados uns sobre os outros e, dessa forma, os queijos que ficam embaixo receberam maior pressão, sendo, portanto, mais desidratados. Visando minimizar esta diferença, inverteu-se a posição dos queijos, após 30 minutos da primeira prensagem. Pode também ter havido falta de uniformidade na distribuição da massa nas formas, embora esta seja colocada em uma mesma altura. A etapa de drenagem do soro foi padronizada para que sempre se retirasse a mesma quantidade de soro em todos os queijos fabricados, visando diminuir esta fonte de erros. Porém, o rendimento dos queijos varia conforme a época em que são fabricados; dependendo das características físico-químicas do leite utilizado, diferentes quantidades de soro são geradas.

Os valores de umidade dos queijos fabricados com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e IDV apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo sido encontrados maiores valores para aqueles produzidos com leite pasteurizados pelo sistema IDV. Pode-se observar um maior aumento de umidade nos queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema IDV, em relação aos queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema HTST, tendo os valores da umidade variado de 49,28% a 49,95% e, para IDV, de 50,56% a 51,89%. O sistema IDV apresentou maiores valores, devido à incorporação de água de condensação. Os queijos elaborados com coalho bovino apresentaram valores de

umidade maiores, quando comparados com os queijos fabricados com coagulante quimosina.

Em parte, a menor porcentagem de sólidos totais dos queijos elaborados com coalho bovino pode ser justificada pelo menor teor de gordura nestes queijos. Obviamente, por apresentarem maior teor de umidade, a concentração de sólidos totais é menor. A quebra de ligações peptídicas causada por uma proteólise extensiva origina formação de grupos iônicos que competem pela água disponível no sistema, resultando num aumento do conteúdo de umidade do queijo. Sendo assim, os tratamentos que empregam os queijos fabricados com coalho bovino, composto predominantemente por pepsina, resultariam em queijos mais úmidos, conforme observado. Os dados obtidos neste experimento estão de acordo com Folegatti (1994). Berg e Koning (1990), Corradini et al. (1990) e Disegna et al. (1991), que também não observaram diferenças significativas nas porcentagens de sólidos totais e umidade nos queijos gouda, cheddar, montasio e grana, produzidos com coalho de vitelo e quimosina. Barbano e Rasmussen (1992) não encontraram diferenças significativas entre os tratamentos com os coalhos bovino, de vitelo e quimosina, para o queijo cheddar.

b) Sal na umidade

O teor de sal na umidade em queijo é determinado como a relação percentual em teores de NaCl e NaCl mais a umidade da amostra e é segundo Minussi (1994) utilizado para padronizar o teor de NaCl em queijos, uma vez que esta se encontra solúvel na água do mesmo. Os valores de sal na umidade foram maiores nos queijos obtidos com leite pasteurizado pelo sistema IDV, proporcionando maior difusão de sal na massa dos queijos mais úmidos, o que

também alterou os valores de A_w desses queijos, com uma ligeira redução (Tabela 10).

c) Gordura

As porcentagens de gordura não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 10). A utilização de diferentes tipos de coalhos com atividade proteolítica não específica excessiva pode resultar na retenção de gordura do queijo. Dentre os coalhos empregados, o bovino apresenta maior porcentagem de pepsina bovina (80%), em sua composição. A ação da pepsina sobre uma cadeia peptídica é muito menos específica do que a da quimosina, enzima predominante no coalho obtido por fermentação (100%) (FOX, 1988; VISSER, 1981).

d) Sólidos totais

Os valores de sólidos totais dos queijos fabricados pelo sistema HTST foram superiores aos queijos fabricados pelo sistema IDV (Tabela 10). Em estudos anteriores foram encontrados resultados semelhantes aos do presente estudo. Furtado e Lourenço Neto (1994), trabalhando com queijo prato, encontraram valores variando de 55,40% a 63,31%. Silveira e Abreu (2003), trabalhando com leites pasteurizados pelos sistemas HTST e IDV, encontraram valores de sólidos totais de 52,2% e 52,62%, respectivamente. Costa Júnior e Pinheiro (1998) apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo, de 57,41% e 55,13% de umidade, para HTST e EDV, respectivamente.

Os sólidos totais dos queijos fabricados com coagulante quimosina foram superiores aos fabricados com coalho bovino. O conteúdo de extrato seco

total foi semelhante aos encontrados por Silva et al. (2005), de 57,41%, aos 30 dias e 56,03%, aos 48 dias de maturação de queijo prato *light*.

e) Nitrogênio total

Os teores de nitrogênio observados foram maiores que a variação de 3,90% a 4,34% relatada por Silva et al. (2005), provavelmente pelo maior conteúdo de extrato seco total nos queijos deste trabalho.

A variação entre o conteúdo de nitrogênio total, nos diferentes processamentos dos queijos (T1, T2, T3, T4) e nos diferentes dias de maturação, pode ocorrer devido à falta de uniformidade da massa e às características físico-químicas do leite utilizado na fabricação dos produtos, entre outros fatores. Em diversos estudos com queijo prato, observou-se a variação deste parâmetro entre os diferentes processamentos e/ou nos diferentes dias de maturação, sendo obtidos valores mínimos e máximos de conteúdo de nitrogênio total de 3,21% e 4,67%, respectivamente (DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004; GOROSTIZA et al., 2004; LEITE et al., 2004; LEITE; PITARELLO; PENNA, 2002; MORENO et al., 2002; MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004; NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004; SILVA et al., 2005), menores que os encontrados neste trabalho.

A determinação do teor de nitrogênio total é importante, pois, por meio desta análise, juntamente com as de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%, é possível analisar o índice de extensão da maturação e o índice de profundidade da maturação, respectivamente, acompanhando, dessa forma, o tipo de degradação resultante da ação das enzimas presentes no leite, sendo as do coagulante, da cultura láctica e as adicionadas.

f) Proteína total

A caseína, principal fração proteica, tem estrutura estável, encontra-se sob a forma coloidal, sendo extremamente importante para a coagulação e está estreitamente ligada ao rendimento de queijos, ou seja, quanto maior o conteúdo de caseína do leite, maior o rendimento (WALSTRA; JENNES, 1984).

Os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), apesar de serem diferentes numericamente (Tabela 10). Foram observadas menores concentrações de proteína total nos queijos fabricados com coagulante quimosina. A diferença entre os tratamentos não implica, necessariamente, em queijos com porcentagens de proteína diferentes. A obtenção de queijos com a mesma concentração final de proteínas não significa que os coalhos, de composição diferente, tenham apresentado o mesmo comportamento durante a coagulação. É possível obter quantidades diferentes de queijo com a mesma concentração de proteína. Isto indicaria uma diminuição no aproveitamento de proteínas do queijo, que pode ser revelado pela avaliação do rendimento do queijo (BARBANO; RASMUSSEN, 1992).

g) Atividade de água (A_w)

É importante observar que, apesar da pequena diferença nos teores de umidade, os valores de atividade de água nos queijos não diferiram ($p > 0,05$) (Tabela 10) entre os tratamentos. Apresentaram valores numericamente menores os queijos fabricados pelo sistema de injeção direta de vapor, pelo fato de incorporação de água deste sistema. No intuito de evitar perda excessiva de água e consequente rachaduras na superfície, os queijos foram maturados e acondicionados em embalagens termoencolhíveis, justificando os dados obtidos.

h) Cinzas

Os valores de cinzas foram menores, provavelmente pelo menor conteúdo de extrato seco total dos queijos. O conteúdo de cinzas de um alimento corresponde ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, sendo, em produtos lácteos, constituída, principalmente, por cálcio, fósforo, sódio e enxofre (CECCHI, 1999). Em queijos, o teor de cinzas varia de 2,1% a 5,3% (DENDER et al., 1986).

3.12 Composição dos queijos tipo prato durante a maturação

a) pH

A evolução do pH dos queijos durante o processo de cura pode ser observada nas Figuras 3 e 4. Como se acredita, conforme a maturação ocorre, o pH dos queijos tende a aumentar com o tempo de pasteurização, variando de 5,27 a 5,63, para o queijo prato produzido pelo sistema IDV e de 5,16 a 5,53, para o sistema HTST, utilizando o coagulante bovino.

No início da maturação, o pH foi mais baixo nos queijos fabricados com leite pasteurizado pelos dois sistemas, aumentando, no decorrer da maturação, devido à formação de compostos nitrogenados alcalinos e, provavelmente, ao catabolismo de aminoácidos. Os valores médios de pH observados para o queijo prato fabricado com leite pasteurizado pelos dois sistemas diferiram ($p < 0,05$), provavelmente devido à delactosagem da massa dos queijos elaborados com leite pasteurizado.

O pH dos queijos de massa lavada pode aumentar durante a maturação, dependendo do conteúdo de lactose residual na sua massa. Nos queijos de massa lavada, em que parte do soro é substituída por água, ocorre remoção parcial da lactose com a lavagem da massa e a lactose residual é metabolizada rápida e

totalmente, ocorrendo depois de um aumento do pH, em função de compostos resultantes da proteólise do queijo (FOX et al., 2000). Durante a maturação, o pH do queijo aumenta, como consequência da formação de NH_3 (resultante da proteólise) e do catabolismo do ácido láctico (FARKEY et al., 1990; FOX, 1988). Em estudos realizados por Costa Júnior e Pinheiro (1998) e Silveira e Abreu (2003) foi demonstrado que o pH aumenta durante o período de maturação.

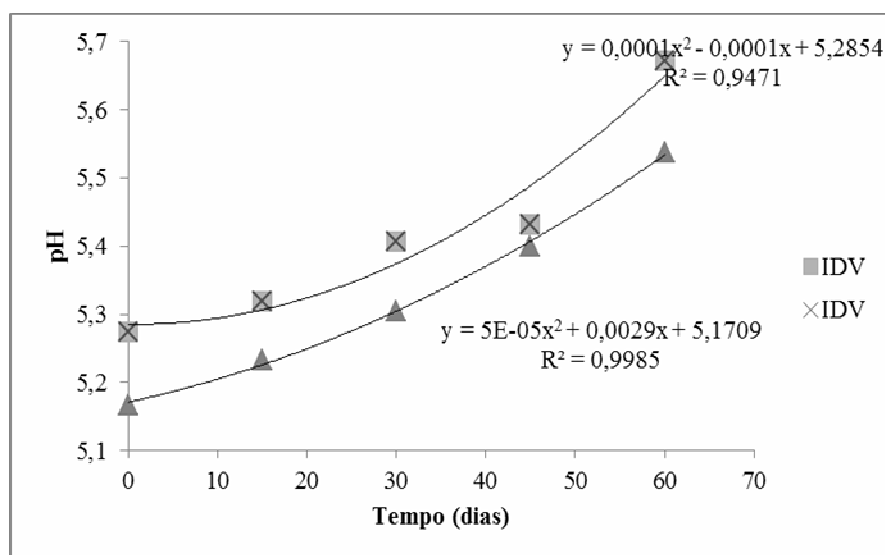


Figura 3 Curva de regressão para a evolução dos valores de pH obtidos em diferentes tempos de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor e coalho bovino.

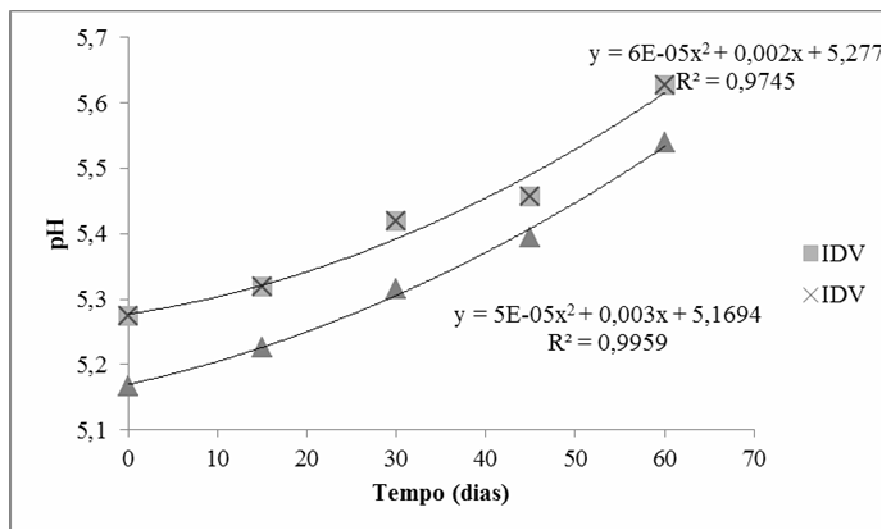


Figura 4 Curva de regressão para evolução dos valores de pH obtidos em diferentes tempos de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor e coagulante quimosina

b) Acompanhamento da proteólise dos queijos

Os índices de proteólise, extensão (relação nitrogênio solúvel/nitrogênio total ou NS/NT) e profundidade de maturação (relação nitrogênio não proteico/nitrogênio total ou NNP/NT) são utilizados como indicadores da qualidade dos queijos comercializados no mercado. Estes índices são de grande importância na composição final e nas características sensoriais do produto. O conhecimento destes dados permite definir o índice de aproveitamento dos elementos do leite na coalhada, a atividade proteolítica do coalho e do fermento e, também, o momento ideal de lançamento do queijo no mercado.

c) Índice de extensão e profundidade da maturação do queijo prato

Durante os 60 dias de maturação, os queijos foram analisados, para acompanhamento dos índices de proteólise, extensão e profundidade. Os resultados encontram-se na Figura 3.

A maior intensidade de proteólise do queijo prato ocorreu na fabricação com leite pasteurizado pelo sistema IDV, devido ao maior teor de umidade no início da maturação e, nos queijos fabricados com leite pasteurizado com sistema HTST, foram encontrados valores menores de umidade o que deve ter causado alterações relativamente grandes na sua atividade proteolítica.

O índice de extensão constitui a relação nitrogênio solúvel/nitrogênio total, representado, sobretudo, por peptídeos de baixo e médio peso molecular, produzidos basicamente pelas enzimas do coalho. Portanto, este é um índice importante para avaliação do comportamento do coalho na maturação dos queijos. Observou-se um aumento ($p < 0,05$) polinomial do índice de extensão em função da idade de maturação, variando de 7,92% a 15,69%, para o sistema HTST e de 7,06% a 15,12%, para o sistema IDV, com variação de um a sessenta dias de maturação, utilizando na fabricação o coalho bovino. Também foi observado um aumento ($p < 0,05$) polinomial do índice de extensão para a fabricação dos queijos com coagulante quimosina, variando 7,8% a 15,74%, para o sistema HTST e de 6,87% a 15,27%, para o sistema IDV. No sistema de injeção direta de vapor, a maior incorporação de água ao leite se perde durante a sinerese, liberando maior quantidade de coalho do grão, ocasionando menor proteólise inicial. Isso ocorre porque o coalho constitui o principal agente proteolítico na primeira fase da maturação, com recuperação mais rápida ao final dela, fazendo com que os valores de extensão e profundidade de maturação de queijos pelo sistema HTST sejam mais elevados quando comparados aos produzidos pelo sistema IDV. Segundo Lawrence et al. (1987), pequenas alterações na umidade dos queijos podem resultar em alterações relativamente grandes na atividade proteolítica dos queijos.

A extensão da proteólise é um fator indicativo da proteólise primária e ocorre, principalmente, pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual no queijo sobre a α_{s1} -caseína e, em menor escala, sobre a β -caseína, dando origem a peptídeos de alto e médio peso molecular (CHOISY et al., 1987; FOX, 1989). A proteólise primária, que resulta na formação de compostos nitrogenados solúveis a pH 4,6, é atribuída, principalmente, à ação do coagulante residual, mas o sistema proteolítico das culturas lácticas também contribui, no decorrer do tempo, para a hidrólise da caseína e o consequente aumento da extensão de proteólise (RODRÍGUEZ, 1998).

Os valores de extensão da proteólise dos queijos fabricados com coagulante quimosina foram menores quando comparados aos queijos produzidos com coalho bovino, provavelmente devido à especificidade deste coagulante (Figura 5). A quimosina produzida por fermentação é idêntica, química e funcionalmente, à quimosina do coalho de vitelo. Quanto às propriedades tecnológicas, a atividade hidrolítica sobre a caseína, durante o processo de coagulação, e a característica e o grau de proteólise na maturação (responsável pelo desenvolvimento de sabor e textura no queijo) são indistinguíveis nestas duas enzimas. Mas, quando comparadas ao coalho bovino, apresentam especificidade maior, produzindo, portanto, menores concentrações de peptídeos de médio e baixo peso molecular, que são os peptídeos de média e baixa massa molecular, que vem compor o nitrogênio solúvel em pH 4,6.

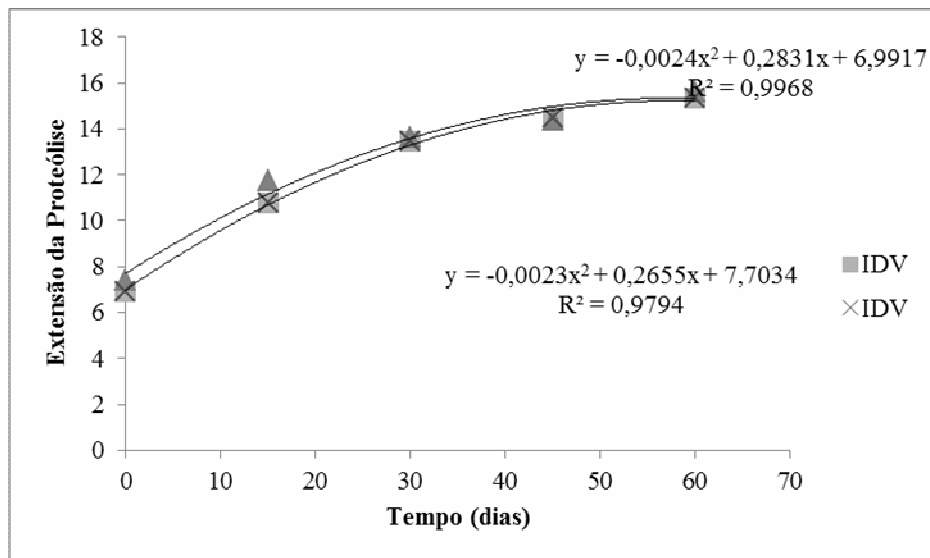


Figura 5 Evolução do pH dos queijos durante a maturação. Valores médios, regressão polinomial e coeficiente de correlação para o pH dos queijos fabricados com dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV) e coalho bovino.

Isso indica que a produção de queijo prato com coagulante quimosina pode ser bem executada sob condições convencionais de fabricação.

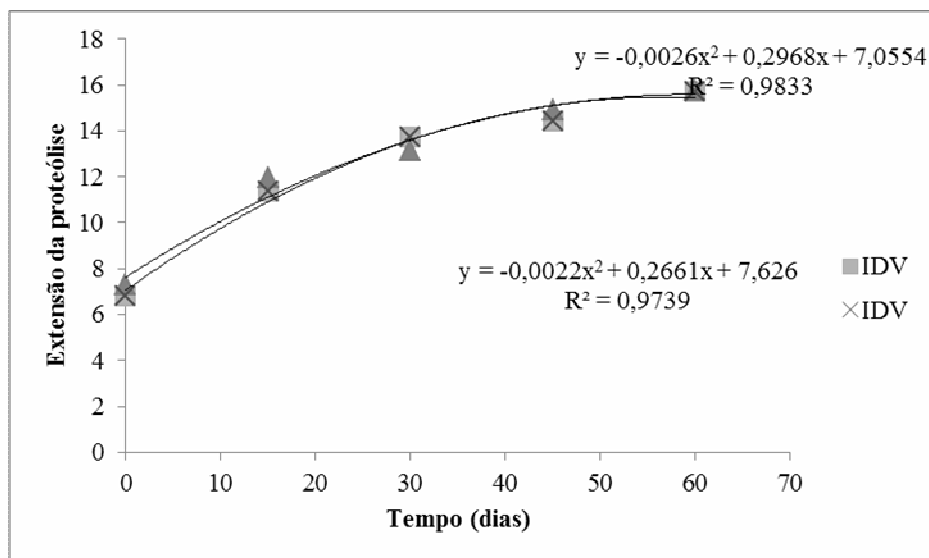


Figura 7 Curva de regressão para os valores do índice de extensão da maturação (NS/NT) obtidos em diferentes idades de maturação. Queijos fabricados com dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV) e coalho genético.

O índice de profundidade da proteólise está relacionado à presença de enzimas proteolíticas (endo e exopeptidases bacterianas (descarboxilases e desaminases) que hidrolisam os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989). Este índice está relacionado às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular acumuladas durante o processo, tendo como componentes os aminoácidos, os oligopeptídeos e as aminas, entre outros, podendo ser quantificado pelo teor de nitrogênio não proteico (NNP), medido pelo nitrogênio solúvel em TCA 12%.

Observou-se um aumento ($p < 0,05$) polinomial dos índices de profundidade de maturação em função da idade de maturação, variando de 7,75% a 13,09%, para o sistema HTST e de 7,23% a 13,83% para o sistema IDV, com variação de um a sessenta dias de maturação, utilizando, na fabricação, o coalho bovino. Também pode ser observado um aumento ($p < 0,05$)

polinomial do índice de extensão para A fabricação dos queijos com coagulante quimosina, variando 7,68% a 12,98%, para o sistema HTST e DE 7,15% a 13,69%, para o sistema IDV. Estes resultados mostram que a degradação proteica em substâncias de baixo peso molecular, devido à ação de enzimas naturalmente presentes no queijo, como as do leite e da cultura lática, ocorrida nos queijos fabricados com coagulante quimosina, apesar de não significativa ($p > 0,05$), foi numericamente menor que promovida pela utilização do coalho bovino. O teor de nitrogênio solúvel em TCA inclui substâncias de baixo peso molecular acumuladas durante o período de maturação, devido, principalmente, à ação proteolítica das enzimas microbianas sobre os compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína que foi inicialmente proteolisada pela ação do coalho ou do agente coagulante.

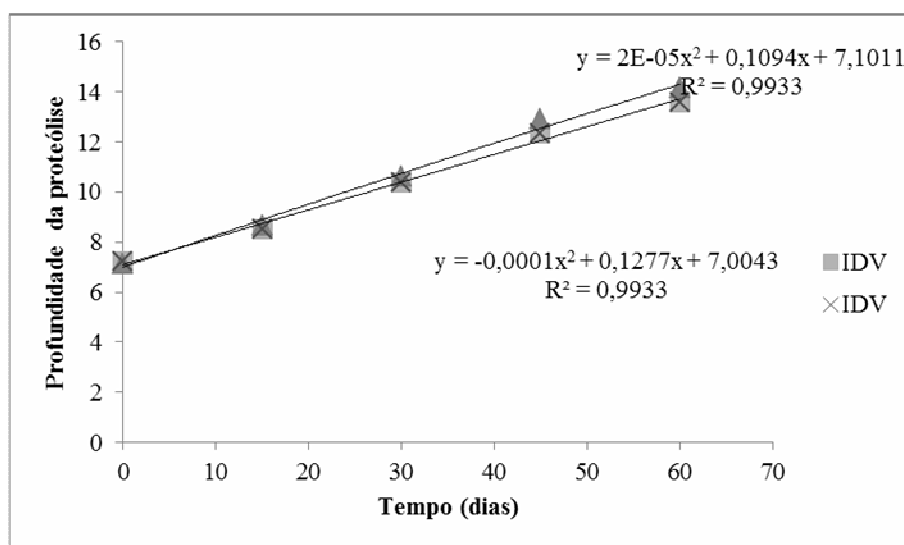


Figura 7 Curva de regressão para os valores do índice de profundidade da maturação (NNP/NT), obtidos em diferentes idades de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor e coalho bovino.

A diferença dos valores dos queijos fabricados com leite pasteurizados pelo sistema HTST e leite pasteurizados pelo sistema de injeção direta de vapor pode estar relacionada com o maior teor de umidade dos queijos produzidos pelo sistema de injeção direta de vapor, conforme já discutido. É provável que o aumento do teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% no final da maturação, nos queijos feitos com coalho bovino e coagulante quimosina, esteja relacionado com a maior degradação proteica inicial (consequente principalmente da atuação do coalho), responsável pelo aumento da disponibilidade de peptídeos, substrato para a ação das peptidases do fermento láctico.

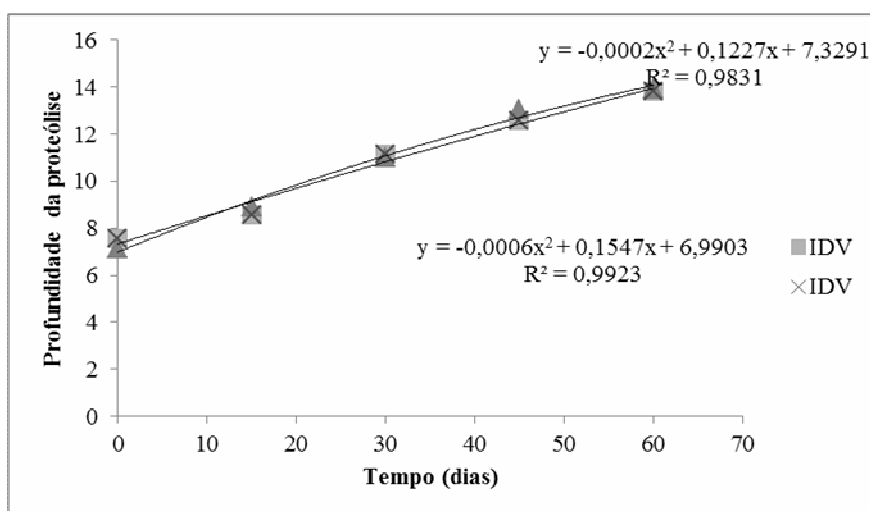


Figura 8 Curva de regressão para os valores do índice de profundidade da maturação (NNP/NT), obtidos em diferentes idades de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor, e coalho genético.

A atividade proteolítica do coalho é dependente do pH. A atividade máxima de proteólise sobre a caseína é reportada em pH 6,0 (HOOYDONK; HAGEDOORN; BOERRIGTER, 1986), embora a atividade ótima varie de acordo com o coalho utilizado. A clivagem das unidades de macropéptido da κ -

caseína pelo coalho reduz o potencial de superfície e a repulsão estérica entre o caseinomacropéptido, permitindo a maior aproximação das micelas e facilitando sua agregação. A ação mais rápida do coalho em pH baixo, portanto, resulta na coagulação mais rápida (HANNON et al., 2006).

d) Aw

A disponibilidade de água em um alimento regula e limita a atividade biológica de microrganismos e de reações químicas e enzimáticas, sendo importante durante a maturação. A atividade de água, assim como o ponto de congelamento, está relacionada à quantidade de sólidos solúveis, podendo-se estabelecer uma relação entre estes dois parâmetros. Dessa forma, o ponto de congelamento (crioscópico), no caso de queijos, refere-se à fase aquosa obtida pela preparação de um extrato de queijo e água destilada, após a separação da fase sólida, a qual é constituída por sólidos insolúveis e gordura (MARCOS et al., 1988). Segundo Dender et al. (1986), uma diminuição do ponto de congelamento do extrato aquoso dos queijos reflete em uma diminuição da atividade de água.

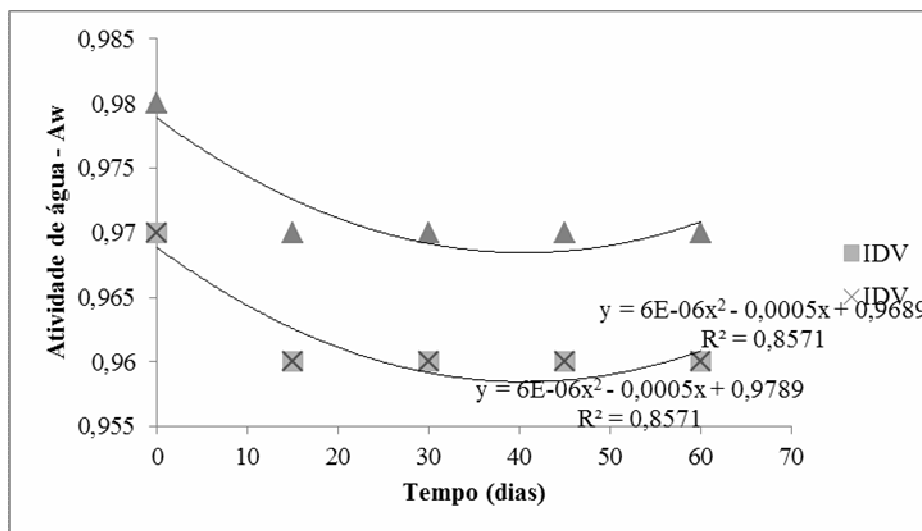


Figura 9 Curva de regressão para os valores de Aw, obtidos em diferentes idades de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor, e coagulante quimosina.

Os queijos foram embalados a vácuo e a umidade permaneceu constante durante o armazenamento. Assim, a diminuição na Aw, que foi observada neste experimento, ocorreu, possivelmente, devido à dissolução do sal na umidade e pela hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos, e triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos.

e) Cor

Cor é uma propriedade de aparência atribuída à distribuição espectral da luz. A primeira impressão que se tem de um alimento é, geralmente, visual, e a maior parte da nossa tendência em aceitá-lo depende da sua cor. A cor exerce grande influência na decisão de compra do consumidor, além de estar relacionada com a sua qualidade e com o uso de corantes.

Nas Figuras 9 e 10 verifica-se que, com o transcorrer da maturação, a luminosidade diminui. No início da maturação, os queijos, de forma geral, se

apresentavam esbranquiçados e, no transcorrer do período de maturação foram ficando mais amarelos e com a coloração mais homogênea.

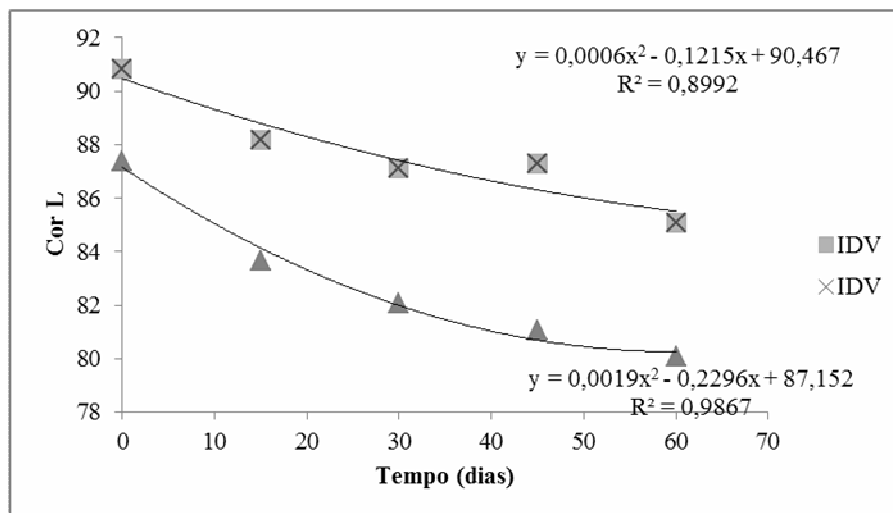


Figura 9 Curva de regressão para os valores de A_w , obtidos em diferentes idades de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor, e coagulante quimosina.

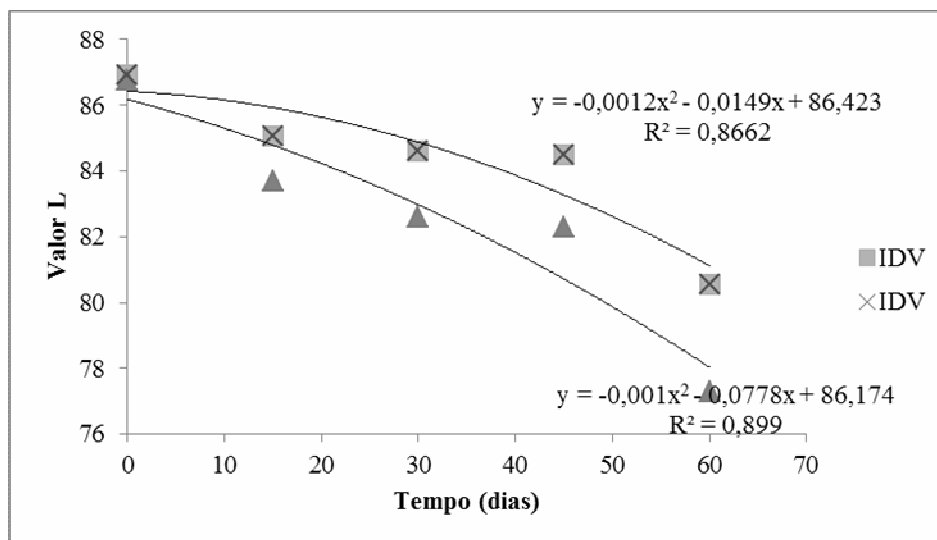


Figura 10 Curva de regressão para os valores L, obtidos em diferentes idades de maturação do queijo prato produzido com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor, e coalho genético.

Resultados da caracterização dos parâmetros de cor

Na Tabela 14 apresentam-se os resultados dos parâmetros de cor (L, a*, b*) das amostras dos queijos, aos 30 e aos 60 dias de maturação.

Tabela 5 Caracterização dos parâmetros de cor das amostras dos queijos dos diferentes tratamentos, aos 30 e 60 dias de maturação.

Parâmetros	Dias	Tratamentos			
		T1	T2	T3	T4
L	30	88,18 Ac	84,75 Ab	81,31 Aa	82,34 Aa
	60	87,12 Bc	80,55 Bb	80,60 Ab	77,22 Aa
a*	30	10,38 Aa	11,30 Ab	10,93 Aa	9,53 Aa
	60	9,99 Aa	10,74 Bb	10,38 Bb	9,40 Ba
b*	30	24,49 Aa	26,47 Aa	29,22 Bb	29,53 Bb
	60	23,60 Ab	22,68 Ba	23,23 Ab	22,82 Aa

a, b, c Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). A, B Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste Skott-Knott

(Tratamento 1= leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); 2 = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); 3 = leite pasteurizado pelo sistema HTST ou sistema de placas; com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); 4 = leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

As mudanças nos parâmetros de cor são utilizadas para avaliar o processo de maturação de queijos em função do tempo. Os valores de L^* , em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco), indicam a luminosidade. Aos 30 dias de maturação, os valores de L mostraram maior luminosidade na amostra de queijo do processamento T1 (pasteurização por injeção direta de vapor e coalho bovino), em relação aos demais. Os queijos correspondentes aos tratamentos T1 e T2 (pasteurização por injeção direta de vapor e coalho bovino e pasteurização por injeção direta de vapor e enzima coagulante quimosina, respectivamente) foram considerados os mais escuros, enquanto correspondentes aos tratamentos T3 e T4 (pasteurização indireta HTST e coalho bovino) foram considerados os mais claros.

O valor de a^* positivo, que representa a intensidade da cor vermelha, variou significativamente entre as amostras. As amostras apresentaram o valor de b^* positivo, que representa a intensidade de cor amarela, a qual é característica do queijo de massa semicozida (OLIVEIRA, 1986; PERRY, 2004).

Buffa et al. (2001) observaram diminuição do valor de L , aumento do valor de b^* e não observaram uma tendência definida de aumento ou diminuição no valor de a^* , durante a maturação de queijos fabricados com leite cru, pasteurizado ou tratado a alta pressão. Rohm e Jaros (1997) obtiveram diminuição nos valores de L e aumento nos valores de a^* e b^* , durante a maturação de queijo emmental. Segundo Ginzinger et al. (1999), o índice de

“amarelamento” dos queijos, correlacionado ao valor de b^* , aumenta com o tempo.

Os valores de b^* foram maiores para os tratamentos T3 e T4. O leite utilizado para a fabricação dos queijos para estes tratamentos foi pasteurizado por HTST (aquecimento indireto), em que a matéria-prima não entra em contato com o meio calefator, portanto, não é incorporada água no leite e, conseqüentemente, é atribuído um menor teor de umidade aos queijos. Esta diferença pode ser devido à quantidade de corante adicionada e ao teor de umidade, pois quanto menor teor de umidade maior será a concentração do corante na massa.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio da avaliação do uso de dois sistemas de pasteurização do leite (IDV e HTST) e uso dos coalhos bovino e coagulante genético em queijos tipo prato permitiram concluir que:

a) a utilização do sistema injeção direta de vapor (IDV) na pasteurização do leite para a elaboração do queijo tipo prato resultou em maior rendimento de fabricação (litros de leite/kg de queijo). Isto ocorre porque este sistema permite melhor aproveitamento de gordura, comparando com o sistema *high temperature short time* (HTST);

b) os maiores rendimentos de fabricação, em L/kg, foram observados nos queijos com o uso do coalho bovino, porém, quando o rendimento foi avaliado levando-se em consideração a composição do queijo, o maior índice (gSTIL) foi observado nos queijos fabricados com o coalho microbiano. A diferença não foi significativa ($p>0,05$);

c) o sistema de pasteurização por injeção direta proporcionou a menor acidez tanto do leite quanto do queijo;

d) os queijos fabricados com leite pasteurizado pelo sistema de injeção de vapor apresentaram maior teor de umidade e de gordura no extrato seco, resultando uma massa mais macia e fechada;

e) o uso do coagulante genético resultou em queijos com menor umidade e maiores teores de gordura, proteína e sólidos totais, e a gordura no extrato seco não foi diferente em nenhum dos tratamentos. Os queijos elaborados com o coalho bovino obtiveram os maiores índices de umidade e cloreto de sódio;

f) o tempo de fabricação ($p<0,05$) foi maior com o uso do coagulante genético e menor para o coalho bovino. O maior tempo de coagulação para o coagulante genético é, provavelmente, consequência da alteração da estrutura

primária da K-caseína, prejudicando a fase primária da coagulação pela quimosina, enzima predominante neste coalho.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, 2005. 1117 p.

BARBANO, D. H.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 1, p. 1-2, Jan. 1992.

BERG, C. van den; KONING, P. J. Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and Microbially produced chymosin. **Netherlands and Milk Dairy Journal**, Wageningen, v. 44, n. 2, p. 189-205, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BUFFA, M. N. et al. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 11, p. 927-934, 2001.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: UNICAMP, 1999. 208 p.

CHOISY, C. et al. Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage. In: ECK, A. (Ed.). **Le fromage**. Paris: Paris Technique et Documentation, 1987. p. 62-100.

CORRADINI, C. et al. Formaggio grana com chimosina do *Kluyveromyces lactis* (Maxiren). **Il Latte**, Génova, v. 15, p. 860-865, ott. 1990.

COSTA, F. F. et al. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 6, p. 2165-2174, June 2008.

_____. Protein distribution in a supernatant of milk ultra-centrifuged using lab-on-a-chip microfluid electrophoresis. In: LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM LACE, 16., 2010, Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: LACE, 2010. 1 CD-ROM.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 29-49, 1998.

DENDER, A. G. F. et al. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 41, n. 247, p. 3-13, 1986.

DISEGNA, L. et al. Impiego di chimosina B de *Kluyveromyces lactis* nello tecnologia indicativa deI Montasio. **Il Latie**, Génova, p. 480-490, magg. 1991.

DOOLEY, J. et al. **Determining the milk content of milk-based food products**. London: Food Standards Agency, 2010. (FSA Final Report, Q01117). Disponível em: <http://www.foodbase.org.uk/results.php?f_report_id=396>. Acesso em: 10 dez. 2012.

DRUNKLER, N. L.; KATSUDA, M. S.; DRUNKLER, D. A. Efeito da padronização do teor caseína/gordura sobre as características físico-químicas do queijo Prato durante a maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 386-388, 2004.

FARKYE, N. Y. et al. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874-880, Apr. 1990.

FOLEGATTI, M. L. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* var *awamori* na fabricação de queijo tipo Prato**. 1994. 65 Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, June 1989.

_____. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 10, n. 6, p. 522-535, Dec. 1988.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: AN Aspen, 2000. 587 p.

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

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

FURTADO, M. M.; PARTRIDGE, J. A. Characterization of nitrogen fractions during ripening of soft cheese made from ultrafiltration retentates. **Journal of Dairy Science**, Michigan, v. 71, p. 2877-2884, 1988.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento, parte 1, determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-9, set./out. 1979.

GINZINGER, W. et al. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase: 3., physical and sensory properties, and conclusions. **Lait**, Les Ulis, v. 79, n. 4, p. 411-421, 1999.

GOROSTIZA, A. et al. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese: a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Control**, Guildford, v. 85, n. 3, p. 407-414, 2004.

HANNON, J. A. et al. Altering renneting pH changes microstructure, cell distribution, and lysis of *Lactococcus lactis* AM2 in cheese made from ultrafiltered milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 3, p. 812-823, Mar. 2006.

HOOYDONK, A. C. M. van; HAGEDOORN, H. G.; BOERRIGTER, I. J. The effect of various cations on the renneting of milk. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, Wageningen, v. 40, p. 369-390, 1986.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd ed. Westport: LLC, 1997. 2 v.

LEITE, T. D. et al. Estudo comparativo entre técnicas de fabricação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 379-382, 2004.

LEITE, T. D.; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Avaliação da maturação do queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 136-139, 2002.

MORENO, I. et al. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 270-273, 2002.

MORETTI, B. R.; NABUCO, A. C.; PENNA, A. L. B. Evolução dos índices de maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 363-366, 2004.

NABUCO, A. C.; MORETTI, B. R.; PENNA, A. L. B. Avaliação do perfil de tirosina e triptofano durante a maturação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 360-363, 2004.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986. 146 p.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, mar./abr. 2004.

PHELAN, Y. A. Standarization of milk for cheesemaking at factory level. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 152-156, 1981.

RODRÍGUEZ, J. Recent advances in the development of low-fat cheeses. **Trends in Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 9, n. 6, p. 249-254, Dec. 1998.

ROHM, H.; JAROS, D. Colour of hard cheese-2: factors of influence and relation to compositional parameters. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 204, n. 4, p. 259-264, Dec. 1997.

SILVA, C. R. B. et al. Maturação de queijo Prato: comparação entre o produto integral e o produzido com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 235-238, 2005.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1340-1347, nov./dez. 2003.

VENTURA, R. F. **Caracterização do sistema ejetor de vapor na pasteurização de leite destinado à fabricação de queijos**. 1981. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

VISSER, S. Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 332, p. 20-24, 1998.

WALSTRA, J. S. R. **Dairy chemistry and physics**. New York: J. Wiley, 1984. 423 p.

CAPÍTULO 3

**TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES COAGULANTES NO
COMPORTAMENTO DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES PROTEICAS,
DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO**

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas alternativas na caracterização do queijo tipo prato, sendo a influência do tipo de pasteurização pelos sistemas de aquecimento indireto *high temperature short time* (HTST) e injeção direta de vapor (IDV) e a influência da utilização de duas diferentes enzimas coagulantes. O delineamento experimental utilizado foi um fatorial 2 x 2 x 5 inteiramente casualizado, sendo dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV), duas enzimas coagulantes e cinco tempos de maturação (1, 15, 30, 45 e 60 dias), com três repetições (fabricações). As enzimas coagulantes estudadas foram coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina, obtida por fermentação (coalho genético). Foram analisadas as amostras de queijo quanto à determinação do perfil proteico. As análises foram realizadas por meio da eletroforese microfluídica. Esta técnica foi eficiente na separação e na quantificação das principais frações proteicas dos queijos tipo prato dos quatro tratamentos estudados. O tratamento em que se utilizou a enzima quimosina, apesar de mais específica, demonstrou maior desdobramento das frações de α -caseína e β -caseína, quando comparado aos tratamentos em que foi utilizado o coalho bovino como agente coagulante (T1 e T3).

Palavras-chave: eletroforese, frações proteicas, enzima, queijo.

ABSTRACT

In this work, alternatives in the characterization of the prato-type cheese were evaluated, the influence being from the pasteurization type by the indirect heating systems *high temperature short time* (HTST) and direct steam injection (IDV) and the influence of the utilization of two different clotting enzymes. The experimental design utilized was a factorial $2 \times 2 \times 5$ completely randomized, namely, two pasteurization systems (HTST and IDV), two clotting enzymes and five maturation times (1, 15, 30, 45 and 60 days) with three replications (makings). The clotting enzymes studied were rennet (20% chymosin and 80% pepsin) and chymosin, obtained by fermentation (genetic rennet). The cheese samples were analyzed as to the determination of the protein profile. The analyses were performed by means of the microfluidic electrophoresis. This technique was efficient in the separation and quantification of the main protein fractions of the prato-type cheeses of the four treatments studied. The treatment in which the chymosin enzyme was utilized in spite of being more specific, demonstrated greater development of the fractions of α -casein and β -casein, when compared with the treatments in which calf rennet was utilized as a clotting agent (T1 and T3).

Key words: eletrophoresis, protein fractions, enzyme, cheese.

1 INTRODUÇÃO

A caseína, principal fração proteica, possui estrutura estável, encontra-se sob a forma coloidal, sendo extremamente importante para a coagulação e está estreitamente ligada ao rendimento de queijos, ou seja, quanto maior o conteúdo de caseína, maior o rendimento. Estas proteínas constituem cerca de 78% a 82% das proteínas do leite bovino e são subdivididas em quatro grupos principais: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína, formando uma estrutura supramolecular conhecida como micelas (DALGLESHI; MORRIS, 1988; EIGEL et al., 1984). A composição das proteínas do leite bovino é um importante fator para a rentabilidade da indústria de laticínios. Um aumento na proporção das caseínas, em particular de α -CN e β -CN, resulta em um melhor rendimento dos produtos derivados, especialmente queijos.

A separação e a quantificação de proteínas individuais do leite são considerações importantes na pesquisa de laticínios. Em muitos casos, a identificação e a nomenclatura das proteínas do leite basearam-se a sua separação por meio de técnicas eletroforéticas (FARRELL et al., 2004). A técnica eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE), sob condições redutoras e na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE reduzida), continua a ser uma metodologia importante para a separação, a identificação e a quantificação das proteínas do leite (CREAMER; OLSON, 1985; PATEL; MISTRY, 1997). Técnicas de PAGE são ferramentas poderosas de separação e, muitas vezes, podem ser adaptadas a outros sistemas.

Muitos dos métodos de separação podem utilizar um grande volume de materiais, tais como tampões e solventes, muitos dos quais são tóxicos e caros. Nos últimos anos, uma nova técnica de microfluídica "lab-on-a-chip" tem sido desenvolvida para a separação e a quantificação de proteínas, assim como DNA e RNA. A técnica de microchip foi baseada na eletroforese capilar e foi introduzida, primeiramente, por Harrison et al. (1992). A eletroforese em si pode

ser realizada muito mais eficazmente em dispositivos microfluídicos porque a dissipação de calor é muito melhor no formato de chip do que num formato de capilaridade.

Até agora, tem-se mantido a eletroforese a fonte primária de separação em chip microfluidico. A maioria dos trabalhos publicados na separação de microfluidos é eletroforese baseada, em vez de cromatografia. Eletroforese pode ser realizada mais direta e convenientemente em um chip microfluidico. Em primeiro lugar, a força motriz da eletroforese é o campo elétrico, e pode ser aplicada por meio do contato dos eletrodos com os tampões e sem necessidade de alta pressão, como na cromatografia (WU; WANG; JENNINGS, 2008).

A tecnologia chamada eletroforese microfluídica ou "lab-on-a-chip", também tem sido empregada com sucesso para a separação e a quantificação das frações de proteína do leite. Por esta técnica pode separar eficientemente todas as principais proteínas do leite, são elas; α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína e κ -caseína.

A tecnologia de chip microfluídico pode ser uma alternativa rápida para a separação e a quantificação de proteínas em sistemas de leite à base de proteínas. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de diferentes tipos de pasteurização e diferentes tipos de agentes coagulantes sobre o comportamento das principais frações proteicas, durante o período de maturação de queijos tipo prato, bem como correlacionar estes parâmetros com índices de extensão e profundidade da proteólise.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização dos queijos tipo prato

2.1.1 Fabricação dos queijos

A fabricação dos queijos foi realizada conforme metodologia adotada para o capítulo 2.

2.2 Análises do perfil proteico

2.2.1 Amostragem do queijo

Uma parte das amostras foi reservada para análises físico-químicas, enquanto a segunda foi reservada para análises do perfil proteico. O acompanhamento da maturação foi conduzido após D, D₊₁₅, D₊₃₀, D₊₄₅ e D₊₆₀ dias, sendo D o dia de fabricação, com armazenamento a 12 °C.

2.6.2 Eletroforese em microchip

O perfil proteico dos queijos, durante o período de maturação (1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação), foi determinado pela técnica de eletroforese microfluídica, utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany) e kit específico para a determinação proteica (Protein 80 LabChip kit) (COSTA et al., 2008, 2010; DOOLEY et al., 2010).

Após o preparo das amostras que foram reservadas para a determinação do perfil proteico, adotou-se a metodologia descrita a seguir. As condições de trabalho utilizadas foram: a solução tampão (pH = 3,0) usada para dissolver as proteínas presentes na solução era constituída de 7,0 M de ureia e 20 mM de bis-tris-propano. Logo após a dissolução das proteínas, foi utilizada a solução

tampão (pH = 3,0), usada para separar as proteínas presentes na solução, constituída de 6,0 M de ácido cítrico e 0,05% (m/v) de hidropropilmetil celulose. Imediatamente depois do uso, 2-mercaptoetanol (5 μ L:1 μ L) foi adicionado à solução tampão das amostras. As amostras das soluções proteicas foram diluídas na proporção de 1:4 com a solução tampão das amostras e deixadas em repouso, por 2 horas, antes de serem preparadas para serem colocadas no chip. Frações de α -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Sigma-Aldrich/St Louis, MO, EUA) foram utilizadas como padrões. Os reagentes foram preparados de acordo com as instruções do protocolo do fabricante, cujo kit contém Gel Dye Mix, solução de descoloração, solução de desnaturação e um *ladder*. As amostras para a eletroforese foram preparadas em tubos de pequeno volume (0,5 mL), tendo uma alíquota da solução de *ladder* (6 μ L) sido colocada em um tubo separado. Foram combinados 4 μ L da amostra de proteína diluída com 2 μ L de solução de desnaturação do kit Protein 80, em tubos de 0,5 mL. Após este procedimento, as amostras (4 μ L) foram desnaturadas (aquecidas), a 100 °C, por 5 minutos, juntamente com o *ladder* (6 μ L). Depois do aquecimento, as amostras e o *ladder* foram resfriados em banho de gelo e os tubos foram centrifugados para assegurar que a amostra de líquido permanecesse no fundo. Antes, as amostras foram diluídas com 84 μ L de água, agitadas e colocadas nos poços do chip. Todos os chips foram carregados com dez amostras, em três repetições cada um.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do perfil proteico das principais frações proteicas dos queijos

Na Tabela 1 apresentam-se os valores médios da porcentagem das frações proteicas individuais dos queijos tipo prato obtidos com os tratamentos T1 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor; com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®)), T2 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor; com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina)), T3 (leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®)) e T4 (leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina)).

Tabela 1 Distribuição das principais frações proteicas referentes aos diferentes tratamentos do queijo tipo prato, durante o período de maturação.

Frações proteicas	Processos	Dias				
		1	15	30	45	60
α_s -caseína	T1	25,98 Da	21,76 Cb	17,98 Bb	16,71 Bb	13,16 Aa
	T2	25,18 Db	20,66 Ca	18,40 Ba	17,45 Ba	16,48 Aa
	T3	23,93 Ca	18,03 Ba	17,10 Ba	15,21 Aa	15,48 Aa
	T4	22,56 Bc	20,35 Ab	19,40 Ab	20,50 Bc	18,37 Aa
β -caseína	T1	47,93 Bb	49,91 Bc	42,08 Bc	45,05 Bc	42,70 Ab
	T2	41,41 Ba	41,83 Bb	40,21 Bb	37,16 Aa	36,56 Aa
	T3	47,38 Cb	47,66 Cb	44,06 Cc	38,43 Aa	39,58 Bb
	T4	42,03 Ba	33,01 Aa	39,60 Ba	37,90 Aa	35,25 Aa
κ -caseína	T1	4,58 Cb	3,48 Ba	3,11 Bb	2,93Aa	2,08 Aa
	T2	6,33 Cc	5,88 Cb	4,70 Bc	3,90 Aa	2,00 Aa
	T3	3,25 Ba	3,86 Ba	2,09 Aa	2,90 Aa	1,21 Aa
	T4	4,37 Bb	5,25 Bb	3,40 Ab	3,60 Aa	2,60 Ab

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas, e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Observa-se, pelos dados da Tabela 1, que a eletroforese microfluídica foi eficiente na separação e na quantificação das principais frações proteicas dos queijos tipo prato dos quatro tratamentos estudados. Observou-se, para os dados de α_s -caseína, que houve diferença significativa para os quatro tratamentos, nos 45 dias de maturação. Durante os 30 primeiros dias, esta fração proteica comportou-se de forma semelhante para os tratamentos em que foi utilizada a enzima coagulante quimosina (T2 e T4).

Independente do tipo de pasteurização, a α_s -caseína foi degradada mais lentamente. Pode-se observar, na Tabela 1, um maior desdobramento desta fração caseínica, quando comparada aos dois tratamentos T1 e T3, em que se utilizou o coalho bovino. Durante os 30 dias subsequentes, o comportamento da α_s -caseína foi diferente, tendo a degradação sido menos extensa para os tratamentos T2 e T4 e uma crescente hidrólise desta fração nos demais tratamentos (T1 e T3), em que foi utilizado o coalho bovino como enzima coagulante. A ação residual do coagulante influenciou os tratamentos analisados.

A análise eletroforética demonstrou claramente que a incorporação de diferentes tipos de enzimas coagulantes levou a diferenças quantitativas nas frações proteicas dos queijos dos distintos tipos de tratamentos. De forma geral, as amostras de queijos dos tratamentos que utilizaram o sistema de pasteurização por injeção direta de vapor apresentaram as maiores médias de α_s -caseína.

Fox, O'Connor e McSweeney (1996) e Law (1987) afirmam que a quimosina, enzima envolvida na degradação da caseína na fabricação de queijos, também participa da degradação desta proteína durante a maturação. Aproximadamente 6% da quantidade adicionada durante o processamento ficam retidos no coágulo, mesmo após dessoragem e prensagem da massa.

Ressalta-se que os resultados das frações de β -caseína sofreram redução durante todo o tempo de maturação, para todos os tratamentos analisados. As maiores médias das frações de β -caseína foram observadas nos tratamentos em

que foi utilizado o coalho bovino como agente coagulante (T1 e T3). Em contrapartida, a β -caseína foi degradada mais lentamente e com menor possibilidade de formação de produtos de degradação pelos tratamentos T2 e T4.

Mazal et al. (2007) observaram diminuição da concentração de α_{s1} -caseína e β -caseína, ao longo do período de maturação, tendo os queijos fabricados a partir de leite com baixa contagem de células somáticas apresentado sempre maior concentração das frações citadas que os queijos fabricados a partir de leite com alta contagem de células somáticas.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos com queijo prato. Augusto (2003), analisando o mesmo tipo de queijo fabricado a partir de diferentes tipos de coagulante, observou o desdobramento gradual e crescente da α_{s1} -caseína em α_{s1-T} caseína com o tempo de maturação, para os queijos dos diversos tratamentos, mostrando a ação residual do coagulante.

No entanto, os resultados discordam dos obtidos por Silva (1998), em estudos com adição de enzimas proteolíticas em queijo prato, que observou que o processamento em que a quantidade de enzima adicionada foi menor apresentou menor concentração de produtos de degradação da α_{s1} e β -caseína. Observou também que um processamento com menor quantidade de enzima apresentou perfil eletroforético semelhante ao de outro com maior quantidade, provavelmente devido ao menor pH da massa, com maior retenção de coalho e maior quantidade de enzima retida na massa.

Silva, Dender e Baldini (1999) determinaram o perfil eletroforético de queijo prato obtido com incorporação da enzima proteolítica neutrasea, em diferentes concentrações, no intuito de acelerar a maturação. A análise eletroforética demonstrou claramente que a incorporação de enzimas levou a diferenças quantitativas nas frações proteicas dos queijos adicionados de enzimas, quando comparados aos tradicionais. Houve maior degradação das

frações α_{S1} - e β -caseínas, com acúmulo maior de alguns produtos de degradação destas duas frações nos queijos modificados.

No Gráfico 1 verificam-se os valores médios de β -caseína para os distintos tratamentos analisados durante 60 dias de maturação. Observa-se que os valores do perfil eletroforético para a fração da β -caseína para os diferentes tipos de pasteurização e diferentes enzimas coagulantes, nos cinco tempos de maturação, se mostraram, em sua maioria, com valores tendendo a diminuir até o tempo 45 dias e com certa estabilização entre 45 e 60 dias, para todos os tratamentos, com exceção do tratamento T4, sistema de pasteurização por HTST e enzima coagulante quimosina, que obteve seus menores valores e distribuição no tempo de 15 dias. O tratamento com pasteurização do leite por IDV e coalho bovino (T1), ao final dos 60 dias, apresentou os maiores valores e distribuições dos valores das análises, tendo o tratamento T4 apresentado os menores valores, porém, com uma distribuição maior que o T2 (IDV e enzima coagulante quimosina).

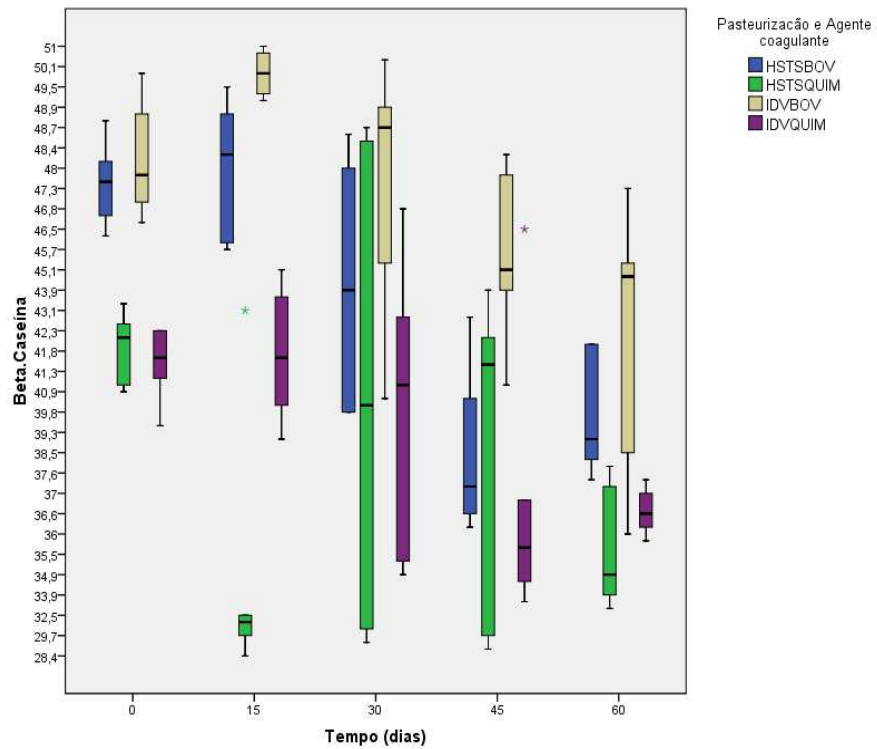


Gráfico 1 Valores médios de β -caseína dos quatro tratamentos analisados durante 1; 15; 30; 45 e 60 dias de maturação.

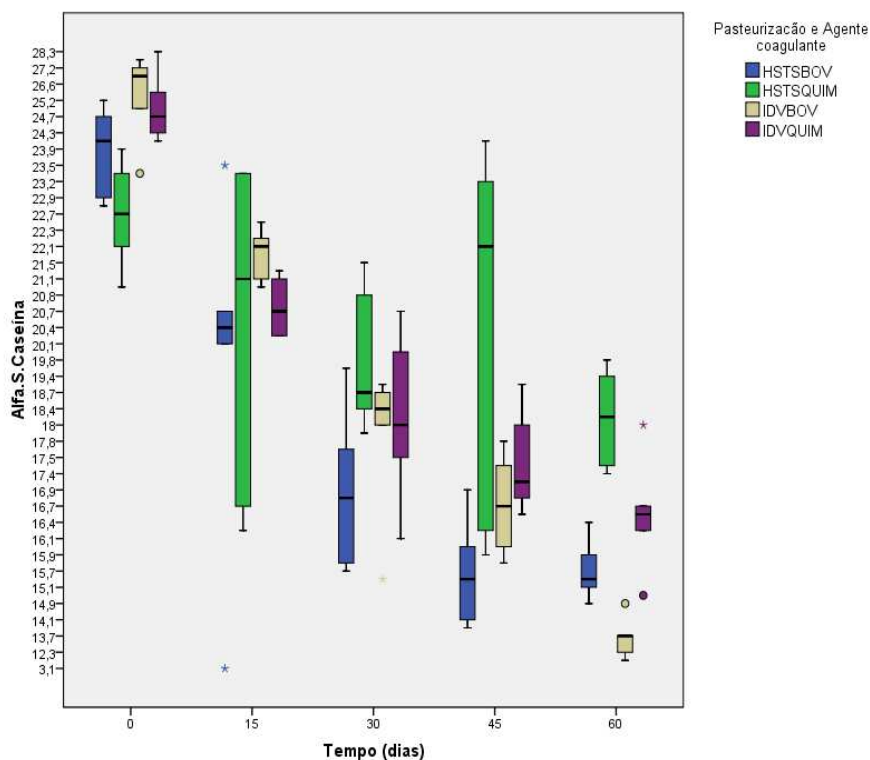


Gráfico 2 Valores médios de α -caseína dos quatro tratamentos analisados durante 1; 15; 30; 45 e 60 dias de maturação.

Pelos dados do Gráfico 2 é possível constatar que os valores de α -caseína do tratamento com pasteurização do leite por HTST e enzima coagulante quimosina (T4) obteve maiores valores de distribuição (maior variação de dados), quando comparado com os demais tratamentos (T1, T2 e T3). O tratamento que apresentou a menor variação de resultados foi aquele em que se utilizou a pasteurização do leite pelo sistema de IDV e coalho bovino como agente coagulante.

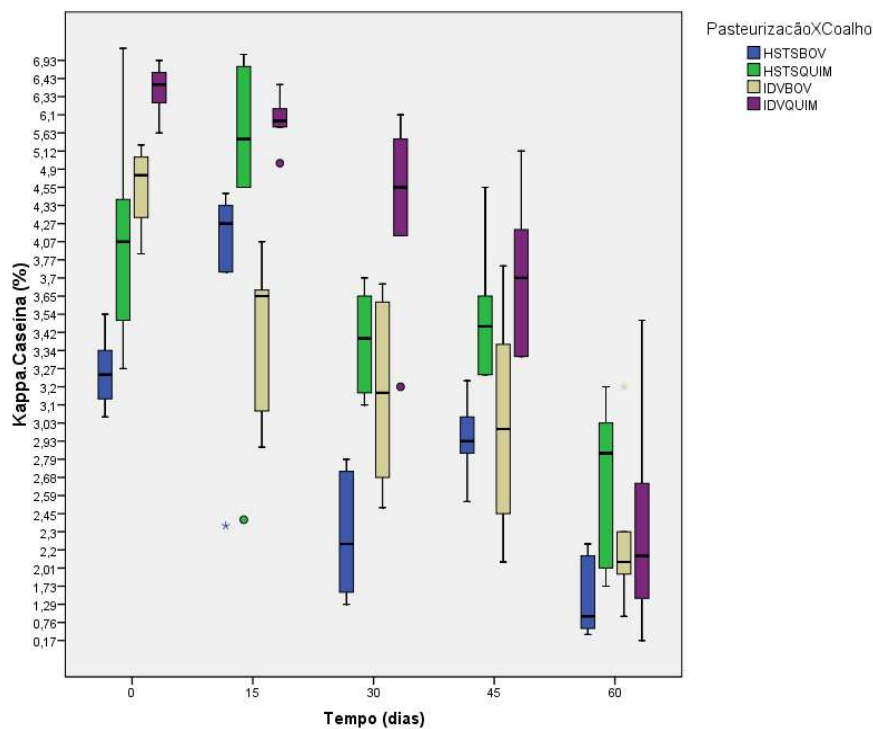


Gráfico 3 Valores médios de kapa-caseína dos quatro tratamentos analisados durante 1; 15; 30; 45 e 60 dias de maturação.

Os resultados de kapa-caseína foram os que apresentaram menor variação entre os demais resultados das frações proteicas (Gráfico 3).

Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 estão apresentados, apenas para fins ilustrativos, resultados da porcentagem total das frações proteicas presentes nas amostras de queijos tipo prato dos quatro tratamentos estudados. A ordem de eluição foi: α -lactalbumina (pico 1), β -lactoglobulina (pico 2), β -caseína (pico 3), α_s -caseína (pico 4) e κ -caseína (pico 5). Os eletroferogramas são apresentados de acordo com: (FU: unidade de fluorescência), o peso molecular (KDa) e o tempo de migração (FU x KDa; FU x Tempo).

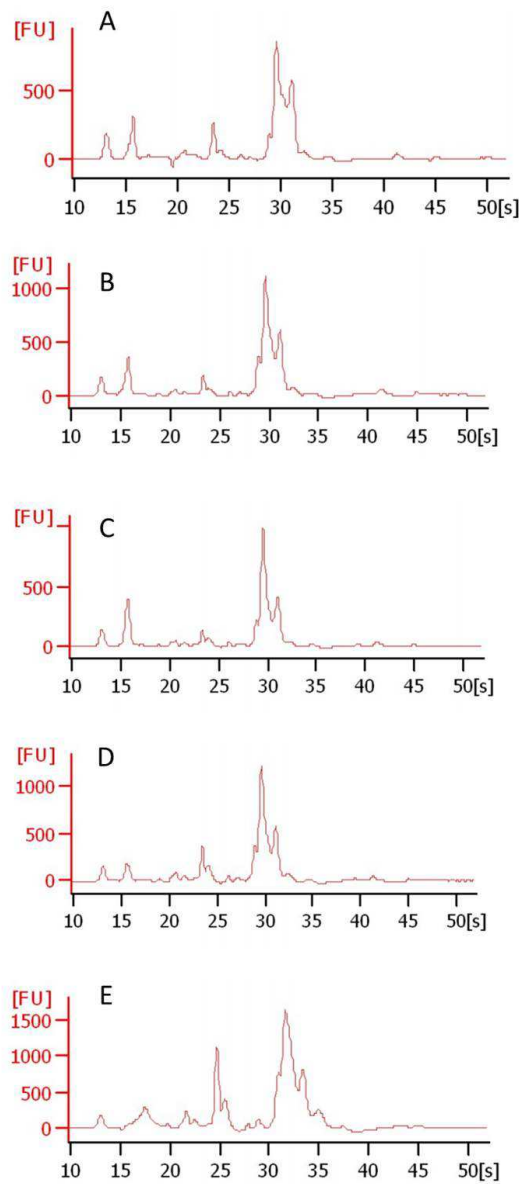


Figura 2 Eletroferogramas das amostras de queijo de tipo prato do tratamento 1: leite pasteurizado por injeção direta de vapor (A): tempo 0, (B): tempo 15, (C) tempo 30, (D):tempo 45, (E): tempo 60. Identificação dos picos β -caseína (pico 1), α_s -caseína (pico 2) e κ -caseína (pico 3).

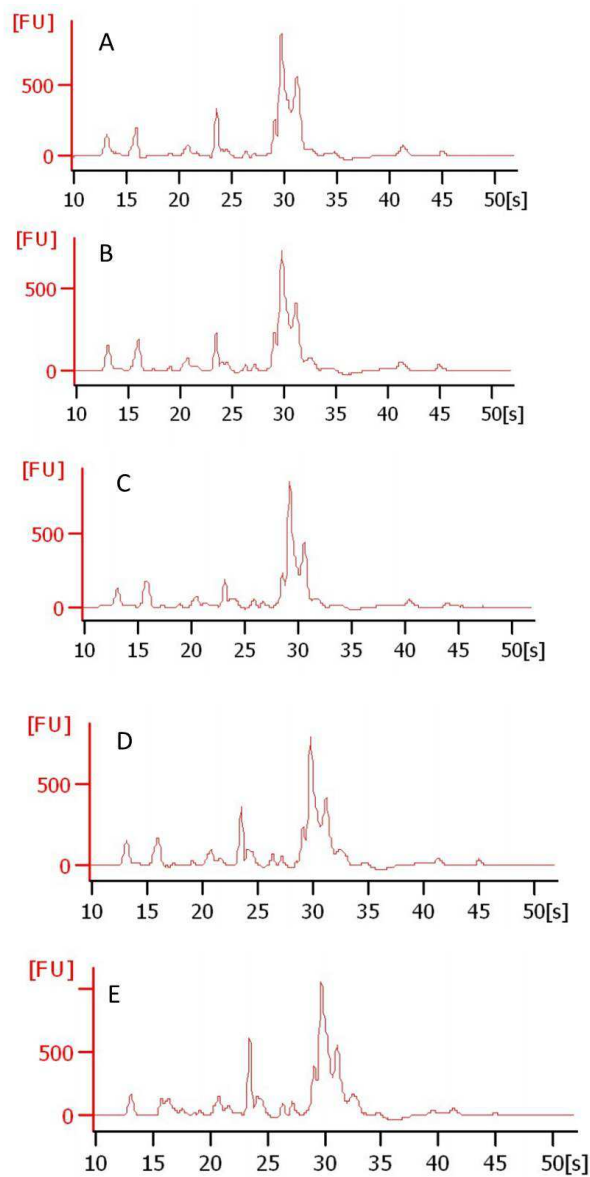


Figura 3 Eletroferogramas das amostras de queijo de tipo prato do tratamento 1: leite pasteurizado por injeção direta de vapor (A): tempo 0, (B): tempo 15, (C) tempo 30, (D):tempo 45, (E): tempo 60. Identificação dos picos β -caseína (pico 1) α_s -caseína (pico 2) e κ -caseína (pico 3).

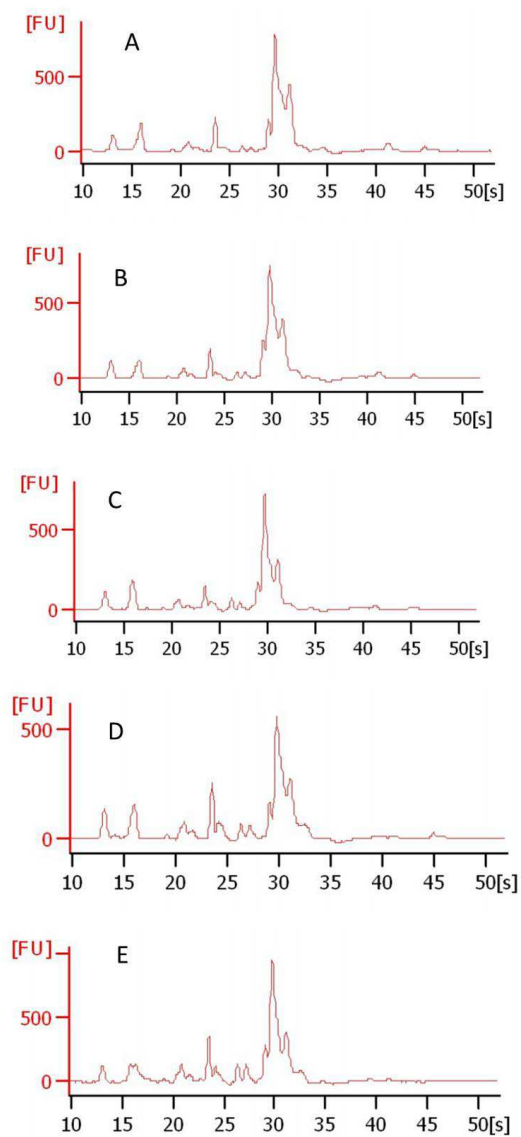


Figura 4 Eletroferogramas das amostras de queijo tipo prato do tratamento 1: leite pasteurizado por injeção direta de vapor (A): tempo 0, (B): tempo 15, (C) Tempo 30, (D):tempo 45, (E): tempo 60. Identificação dos picos β -caseína (pico 1), α_s -caseína (pico 2) e κ -caseína (pico 3).

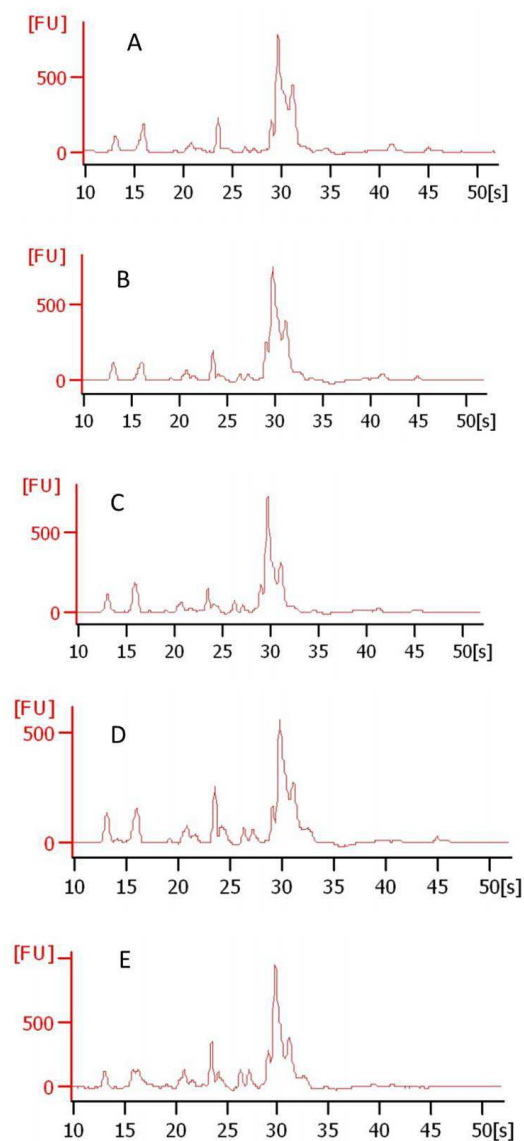


Figura 5 Eletroferogramas das amostras de queijo tipo prato do tratamento 1: leite pasteurizado por injeção direta de vapor (A): tempo 0, (B): tempo 15, (C) tempo 30, (D):tempo 45, (E): tempo 60. Identificação dos picos β -caseína (pico 1), α_s -caseína (pico 2) e κ -caseína (pico 3).

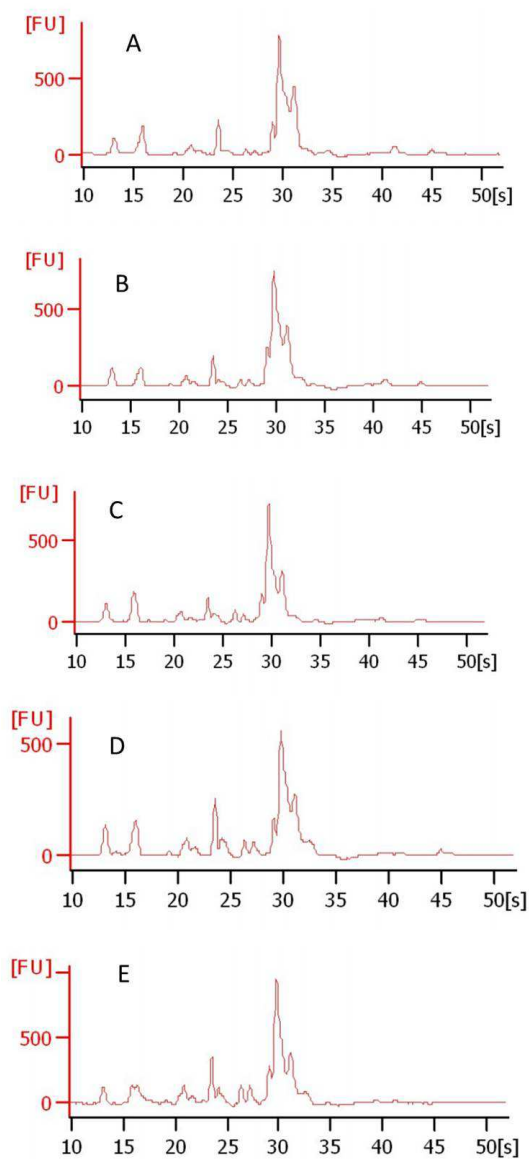


Figura 6 Eletroferogramas das amostras de queijo tipo prato do tratamento 1: leite pasteurizado por injeção direta de vapor (A): tempo 0, (B): tempo 15, (C) tempo 30, (D):tempo 45, (E): tempo 60. Identificação dos picos β -caseína (pico 1), α_s -caseína (pico 2) e κ -caseína (pico 3).

4 CONCLUSÃO

A enzima coagulante quimosina é altamente específica. A quimosina produzida por fermentação é idêntica, química e funcionalmente, à quimosina do coalho de vitelo. Contudo, a enzima coagulante quimosina produz menores concentrações de peptídeos de média e baixa massa molecular.

A enzima quimosina, apesar de mais específica, demonstrou maior desdobramento das frações de α -caseína e β -caseína, na comparação com os tratamentos em que foi utilizado o coalho bovino como agente coagulante (T1 e T3).

REFERÊNCIAS

AUGUSTO, M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 2003. 190 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

COSTA, F. F. et al. Effect of calcium chloride 379 addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 2165-2174, Oct. 2008.

_____. Protein distribution in a supernatant of milk ultra-centrifuged using lab-on-a-chip microfluid electrophoresis. In: LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM LACE, 16., 2010, Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: UFSC, 2010. 1 CD-ROM.

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

DALGLEISH, D. G.; MORRIS, E. R. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 2, p. 311-320, 1988.

DOOLEY, J. et al. **Determining the milk content of milk-based food products**. London: Food Standards Agency, 2010. (FSA Final Report, Q01117). Disponível em: <http://www.foodbase.org.uk/results.php?f_report_id=396>. Acesso em: 10 dez. 2012.

EIGEL, W. N. et al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth edition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1599-1600, 1984.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, June 2004.

FOX, P. F.; O'CONNOR, T. P.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, 1996.

HARRISON, A. et al. Cheese: nutritional aspects. **Analytical Chemical**, London, v. 64, p. 1962-1932, 1992.

LAW, B. A. Proteolysis is in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 365-400.

MAZAL, G. et al. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 630-636, Feb. 2007.

PATEL, R. S.; MISTRY, V. V. Physicochemical and structural properties of ultra filtered buffalo milk and milk powder. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 3, p. 812-817, Mar. 1997.

SILVA, A.; DENDER, A. G. F. van; BALDINI, V. L. S. Perfil eletroforético do queijo tipo Prato obtido com incorporação de enzimas proteolíticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 311, p. 150-156, ago. 1999.

SILVA, A. T. **Maturação de queijo tipo Prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo**. 1998. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

WU, H. J.; WANG, A. H. J.; JENNINGS, P. M. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 93-101, Feb. 2008.

CAPÍTULO 4

TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES COAGULANTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO QUEIJO TIPO PRATO, AO LONGO DO TEMPO DE MATURAÇÃO

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de diferentes tipos de pasteurização e diferentes tipos de agentes coagulantes sobre o comportamento reológico de queijos tipo prato, ao longo do tempo de maturação, bem como correlacionar estes parâmetros reológicos ao longo desse tempo. Para este fim, foram utilizados os três tipos de análise de textura (perfil de textura, tensão de relaxação e compressão uniaxial). As análises foram realizadas com o texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA - XT2i) e os resultados obtidos foram analisados por meio de teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, e correlação de Pearson. O comportamento reológico dos queijos foi avaliado nos dias 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento refrigerado a 12 °C, por meio de testes de compressão uniaxial e de relaxação. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na dureza entre os tratamentos T1, T2 e T3, no início da maturação, tendo o T4 apresentado uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Nos demais tempos de maturação (15, 30, 45 e 60 dias) foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Para a adesividade, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, no primeiro dia de maturação e com 30 dias de maturação (armazenamento refrigerado a 12 °C); para os demais tempos foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos analisados. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para o parâmetro de elasticidade dos queijos durante os 30 primeiros dias do período de maturação. A coesividade dos queijos diminuiu significativamente durante o tempo de maturação, entretanto, diminuiu mais rápido e atingiu valores menores para os queijos obtidos com leite pasteurizado por injeção direta de vapor (IDV) e agente coagulante bovino. Na análise de teste de relaxação, os parâmetros do modelo de Maxwell proporcionaram melhor discriminação entre as amostras do que os parâmetros do modelo de Peleg. Correlações positivas e negativas foram observadas e os parâmetros de adesividade, dureza e módulo de elasticidade ideal (E_1) foram as mais correlacionadas com outros parâmetros reológicos.

Palavras-chave: perfil de textura, teste de relaxação, compressão uniaxial, correlação de Pearson.

ABSTRACT

The present study was conducted with the objective of evaluating the influence of different sorts of pasteurization and different sorts of clotting agents upon the rheological behavior of prato-type cheeses along the maturation time as well as to correlate these rheological parameters along that time. For this purpose, the three kinds of texture analyses (texture profile, relaxation stress and uniaxial compression). The analyses were undertaken with the texturometer (Stable Micro Systems, model TA - XT2i) and the results obtained were analyzed by means of the Scott-Knott test at 5% of probability and Pearson's correlation de Pearson. The rheological behavior of the cheeses was evaluated on days 1, 15, 30, 45 and 60 days' storage refrigerated at 12°C by means of tests of uniaxial compression and of relaxation. No significant differences ($p < 0.05$) were found in hardness among the treatments T1, T2 and T3 at the beginning of maturation, T4 having presented a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the other treatments. In the other maturation times (15, 30, 45 and 60 days), significant differences ($p < 0.05$) were found among the treatments. For adhesiveness, there were no differences ($p > 0.05$) among the treatments, on the first day of maturation and at 30 days of maturation (storage refrigerated at 12°C); for the other times, differences ($p < 0.05$) were found among the treatments surveyed. No significant differences ($p < 0.05$) were observed for the parameter of elasticity of the cheeses for the first 30 days of the maturation period. The cohesiveness of the cheeses decreased significantly during the maturation time; however, it decreased faster and reached smaller values for the cheeses obtained with pasteurized milk by direct steam injection (IDV) and ovine clotting agent. In the analysis of relaxation test, the parameters of the Maxwell model provided better discrimination among samples than the parameters of the Peleg model. Positive and negative correlations were observed among the parameters of adhesiveness, hardness and modulus of ideal elasticity (E_1) were the most correlated with other rheological parameters.

Key words: texture profile, relaxation test, uniaxial compression, Pearson correlation.

1 INTRODUÇÃO

A análise do perfil de textura (TPA) é um método objetivo de avaliar a textura de um alimento. O teste consiste em comprimir uniaxialmente o alimento (amostra em estudo) duas vezes, num movimento recíproco, imitando a ação da mandíbula. Assim, durante o teste, é realizada uma primeira compressão, seguida por um relaxamento e uma segunda compressão. Desse teste obtém-se um gráfico, força *versus* tempo, do qual se calculam os parâmetros de textura (BOURNE, 1968; HERRERO et al., 2007; HONIKEL, 1998; LAU; TANG; PAULSON, 2000).

Todos os materiais exibem uma resposta a uma força externa entre as duas extremidades do comportamento ideal: líquido e sólido elástico viscoso. Um sólido elástico é descrito pela lei de Hooke e um líquido viscoso ideal obedece à lei de Newton (GUILLET, 2010; GUNASEKARAN; AK, 2000; RYCHLEWSKI, 1984). No entanto, a maioria dos alimentos se comporta como material viscoelástico. Dependendo da pressão aplicada e da escala de tempo, um corpo sólido pode ter propriedades de fase líquida e um material líquido pode mostrar as propriedades de corpo sólido. O comportamento viscoelástico de alimentos tem sido amplamente estudado em reômetros de amostras cortadas (força tangencial), enquanto os parâmetros reológicos de tensão ou de compressão (força normal) estão sendo cada vez mais utilizados para caracterizar a textura dos produtos alimentares. Além disso, é possível caracterizar o produto a deformações baixas ou altas, independentemente do tipo de força aplicada (ISHIHARA et al., 2011; KARAMAN et al., 2011; KUMAGAI et al., 2009; LU; ABBOTT, 1996).

Como a maioria dos alimentos sólidos e semissólidos, o queijo exhibe características tanto de sólido elástico como de fluido newtoniano, sendo, então, denominado viscoelástico. As propriedades reológicas incluem características

intrínsecas (elasticidade, viscosidade e viscoelasticidade) que estão relacionadas com a composição, a estrutura e a força das interações entre os elementos estruturais do queijo. A micro e a macroestrutura dos queijos são os principais determinantes das propriedades reológicas e de textura (FOX et al., 1998; KONSTANCE; HOLSINGER, 1992).

Uma das formas de medir o comportamento viscoelástico de alimentos é o teste de relaxação, o qual se baseia na aplicação de uma deformação instantânea de um corpo e na manutenção dessa deformação durante todo o período do teste. A forma como o corpo reage à tensão aplicada é monitorada em função do tempo (RAO, 1992). No caso de alimentos, é importante que o tempo e a deformação aplicada sejam suficientemente pequenos (na ordem de minutos, por exemplo, 10 minutos ou menos, e de 2% a 10% de deformação), para minimizar a ocorrência de alterações físicas no material (CUNHA, 2002; PELEG, 1980), principalmente devido à troca de umidade com o ambiente.

O corpo de Maxwell é o modelo reológico mais simples, composto por um elemento elástico e um elemento viscoso em série, explicando o comportamento viscoelástico do queijo. Uma das formas de medir o comportamento viscoelástico de alimentos é o teste de relaxação. O teste baseia-se na aplicação de uma deformação instantânea de um corpo e na manutenção dessa deformação durante todo o período do teste. A forma como o corpo reage à tensão aplicada é monitorada em função do tempo (RAO, 1992).

O teste de compressão uniaxial também permite avaliar as propriedades reológicas dos queijos. Durante este teste, uma amostra é submetida a uma deformação unidirecional e a força correspondente é medida em função do tempo. A deformação aplicada é suficientemente grande para provocar a fratura do material. Medidas como o módulo de elasticidade (E), a deformação na ruptura (ϵ_{rup}), a tensão na ruptura (σ_{rup}) e a tensão máxima podem ser obtidas e essas propriedades correlacionam-se com parâmetros sensoriais, como

elasticidade (E), dureza (s rup) e firmeza (s máx), entre outros (FOX et al., 1998).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de diferentes tipos de pasteurização e diferentes tipos de agentes coagulantes sobre o comportamento reológico de queijos tipo prato, bem como correlacionar estes parâmetros reológicos ao longo de maturação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização dos queijos tipo prato

2.1.1 Fabricação dos queijos

A fabricação dos queijos foi realizada conforme metodologia adotada para o capítulo 2.

2.2 Análises reológicas dos queijos tipo prato

2.2.1 Amostragem do queijo

O comportamento reológico dos queijos foi avaliado após D, D₊₁₅, D₊₃₀, D₊₄₅ e D₊₆₀ dias, sendo D o dia de fabricação, com armazenamento refrigerado, a 12 °C. Os testes realizados foram análise do perfil de textura, teste de relaxação e teste de resistência à compressão. As amostras foram preparadas retirando-se cilindros de 2 cm de diâmetro por 2 cm de altura dos queijos.

2.3 Análise do perfil de textura

As análises dos perfis de textura (TPA) foram realizadas nas seguintes condições: velocidade de pré-teste de 1,0 mm/s, velocidade de teste de 1,0 mm/s e velocidade de pós teste de 1,0 mm/s, com distância de compressão de 20,0 mm, por uma sonda cilíndrica de alumínio de 6,0 mm, utilizando-se o texturômetro Stable Micro Systems Modelo TA - XT2i (Goldaming, England). Os parâmetros analisados foram dureza, adesividade, coesividade e gomosidade. O teste foi realizado em triplicata.

2.4 Teste de relaxação de tensão

Existem vários modelos matemáticos para descrever os materiais viscoelásticos, mas os de Maxwell e de Peleg são os mais utilizados para descrever o comportamento de sistemas alimentícios (ANDRÉS; ZARITZKY; CALIFANO, 2008; BELLIDO; HATCHER, 2009; KAMPF; NUSSINOVITCH, 1997; KHAZAEI; MOHAMMADI, 2009; MORALES et al., 2007).

No modelo de Maxwell intervêm dois elementos simples que, combinados de formas distintas, representam diferentes comportamentos. Estes dois elementos são o elemento elástico ideal, que pode ser representado como uma mola e cujo comportamento é definido por constante elástica E , e o elemento viscoso ideal, que é representado por meio de um amortecedor e cujo comportamento é definido pela sua viscosidade η (CAMPUS et al., 2010).

No modelo de Maxwell com uma deformação constante (ε_0), a tensão ($\sigma(t)$), após um tempo t (NOBILE et al., 2007), é dada por

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left(E \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right) + E_e \right) \quad (1)$$

em que E é o módulo de elasticidade do material, E_e é o módulo de elasticidade de equilíbrio e λ é o tempo de relaxação, dado por η/E . Alguns alimentos viscoelásticos não seguem o modelo simplificado de Maxwell, necessitando de modelos mais complexos para descrever seu comportamento. Um exemplo deste caso é o modelo de Maxwell generalizado, que consiste em um número infinito de modelos de Maxwell mais uma mola em paralelo.

As curvas de relaxação (tensão versus tempo) podem ser ajustadas por meio da equação 2, que fornece parâmetros viscoelásticos do modelo generalizado de Maxwell.

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left(E_1 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + E_2 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right) + \dots + E_e \right) \quad (2)$$

, em que E_1, E_2, \dots são os
módulos de elasticidade

do corpo elástico ideal e λ_1 e $\lambda_2 \dots$ são os tempos de relaxação.

A viscosidade do elemento i pode ser calculada conforme a equação 3.

$$\eta_i = E_i \lambda_i \quad (3)$$

No modelo de Peleg, os dados da relaxação de tensão podem ser interpretados por dados da tensão normalizada *versus* tempo, conforme a equação 4 (PELEG; NORMAND, 1983):

$$\frac{\sigma_0 t}{\sigma_0 - \sigma(t)} = k_1 + k_2 t \quad (4)$$

em que $\sigma(t)$ é a tensão em qualquer tempo durante o teste, σ_0 é a tensão inicial, e k_1 e k_2 são constantes. O inverso de k_1 representa a taxa de decaimento inicial, enquanto k_2 é o valor hipotético da força assintótica normalizada que permanece sem relaxar (RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009; TANG; TUNG; ZENG, 1998).

Os testes de relaxação de tensão foram realizados em um texturômetro TAxT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems), utilizando-se uma probe cilíndrica de 7,0 cm de diâmetro, a qual foi lubrificada com o objetivo de se eliminar a influência do atrito entre a amostra e o equipamento. As amostras foram cortadas em forma cilíndrica com diâmetro de 2,0 cm e altura de 2,0 cm, depois foram comprimidas até 5,0% de deformação à velocidade de 1,0 mm/s e esta deformação foi mantida constante por 10 minutos. Durante esse tempo, foi

registrada a relaxação da tensão numa taxa de 25 medidas por segundo. O teste foi realizado em triplicata. Para determinar as constantes do modelo de Maxwell, realizou-se a regressão não linear do programa SAS for Windows, versão 5.0.

Para determinar as constantes do modelo de Peleg também foi realizada a regressão não linear do programa SAS for Windows, versão 5.0.

2.5 Teste de resistência a compressão

O teste de compressão uniaxial foi realizado em um texturômetro TAxT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems), utilizando-se uma probe cilíndrica de 5,0 cm de diâmetro. As amostras de queijo prato foram cortadas em forma cilíndrica, com diâmetro de 2,0 cm e altura de 2,0 cm, e foram comprimidas até 80,0% de deformação, à velocidade de 1,0 mm/s.

Dos dados da força *versus* tempo foram calculadas a tensão (σ) e a deformação (ε), por meio das equações 5 e 6 (BAYARRI; DURÁN; COSTELL, 2004; BAYARRI et al., 2007; HAMANN, 1983; HERNÁNDEZ; DURÁN; COSTELL, 1999):

$$\sigma = F \left(\frac{h_0 - \Delta h}{A_0 h_0} \right) \quad (5)$$

$$\varepsilon = \ln \left(\frac{h_0}{h_0 - \Delta h} \right) \quad (6)$$

em que F é a força, h_0 a altura inicial, A_0 a área inicial da amostra e Δh a variação na altura durante a compressão.

Das curvas de tensão *versus* deformação foram obtidos a tensão de ruptura (σ_{rup}), a deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}) e o

trabalho de ruptura (W_{rup}). A tensão de ruptura é o ponto no qual ocorre a fratura do gel (eixo y) (tensão máxima no gráfico tensão *versus* deformação) e a deformação de ruptura é a deformação da amostra na ruptura (eixo x). O módulo da elasticidade (módulo de Young - E) foi obtido pelo coeficiente angular da parte linear inicial da curva de tensão-deformação, empregando-se 2% de deformação. Já o trabalho de ruptura (W_{rup}) foi dado pela área sob a curva força *versus* distância, até o ponto de ruptura.

2.6 Análise estatística

Para comparar as fabricações com diferentes tipos de pasteurização do leite e diferentes tipos de agentes coagulantes ao longo do tempo de maturação, utilizou-se, como ferramenta mais adequada, o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Além disso, a correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar as propriedades reológicas ao longo do tempo entre os tratamentos. A análise dos dados foi realizada no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e na versão do software SensoMaker 1.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do perfil de textura

Na Tabela 1 apresentam-se os valores médios da análise do perfil de textura (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade) dos queijos obtidos com os tratamentos T1 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®), T2 (leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina), T3 (leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®) e T4 (leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

Tabela 1 Evolução da maturação dos queijos tipo prato dos diferentes tratamentos estudados.

Parâmetros	Tratamentos	Dias				
		1	15	30	45	60
Dureza (N)	T1	4045,43 Ba	2718,02 Bc	2067,70 Ab	1732,32 Ab	2007,38 Ab
	T2	3901,56 Ca	2376,00 Bb	1743,45 Bb	1403,02 Aa	1481,86 Aa
	T3	4408,79 Da	1986,84 Ab	3059,64 Cc	2652,70 Cc	2160,63 Bb
	T4	2736,23 Bb	1054,69 Aa	1081,63 Aa	1309,43 Aa	1442,48 Aa
Adesividade (N.s)	T1	-57,70 Ca	- 91,41 Bb	- 83,94 Ba	- 99,69 Bb	- 156,15 Aa
	T2	- 38,69 Ca	- 125,68 Aa	- 96,99 Ba	- 107,73 Bb	- 136,49 Aa
	T3	- 22,65 Ca	- 50,12 Cc	- 102,63 Ba	- 116,52 Aa	- 99,92 Bb
	T4	- 19,56 Ba	- 40,53 Bc	- 79,75 Aa	- 58,71 Bc	- 78,19 Ab
Elasticidade	T1	0,87 Ca	0,78 Ca	0,73 Ba	0,62 Aa	0,55 Aa
	T2	0,86 Ca	0,79 Ba	0,81 Ba	0,80 Bb	0,71 Ab
	T3	0,88 Ca	0,82 Ca	0,79 Ba	0,61 Aa	0,83 Cc
	T4	0,87 Aa	0,85 Aa	0,79 Aa	0,85 Ab	0,78 Ac
Coesividade	T1	0,46 Ba	0,52 Ba	0,53 Ba	0,37 Aa	0,36 Aa
	T2	0,56 Aa	0,61 Ba	0,68 Cb	0,66 Cb	0,65 Cb
	T3	0,74 Bb	0,73 Bb	0,62 Bb	0,44 Aa	0,68 Bb
	T4	0,74 Ab	0,74 Ab	0,74 Ab	0, 73 Ac	0,69 Ab
Gomosidade (N)	T1	1801,96 Ca	1405,06 Bb	1082,72 Aa	633,85 Aa	724,56 Aa
	T2	2246,98 Ca	1432,53 Bb	1180,46 Bb	900,34 Aa	953,66 Aa
	T3	3246,28 Cb	1393,07 Bb	1898,44 Cc	1158,32 Ab	1472,36 Bb
	T4	2046,73 Ba	793,86 Aa	786,86 Aa	947,59 Aa	997,43 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As características de textura dos queijos ao longo da maturação são resultantes de mudanças químicas e bioquímicas, além das induzidas por enzimas, que determinam o perfil de componentes do queijo (KANAWJIA et al., 1995). Geralmente, se não ocorre perda de umidade durante a maturação, o queijo sofre um amolecimento, devido à hidrólise proteica (JONG, 1976). Como os queijos foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis, não houve perda de umidade para o meio, tendo as mudanças ao longo da maturação, provavelmente, sido resultantes de mudanças químicas e bioquímicas.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na dureza entre os tratamentos T1, T2 e T3, no início da maturação, com T4 apresentando uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Nos demais tempos de maturação (15, 30, 45 e 60 dias) foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

De modo geral, as maiores médias foram obtidas nos tratamentos com utilização de agente coagulante bovino, T1 e T3. Dentre estes dois, T3 apresentou as maiores médias, o que pode ser explicado pela utilização de pasteurização indireta (HTST), que resultou em queijos mais duros que os fabricados com pasteurização direta (IDV). O sistema de pasteurização por injeção direta de vapor pode incorporar água no leite, diminuindo a concentração de sólidos totais e, conseqüentemente, aumentando a umidade dos queijos fabricados com este leite. Esses resultados podem também ser explicados pela combinação de menor teor de umidade e efeito da lavagem da massa na quantidade de coagulante residual.

Em geral, as menores médias foram observadas quando se utilizou agente coagulante quimosina (T2 e T4), independente do tipo de pasteurização utilizada no leite. A dureza representa uma importante característica de textura dos queijos, visto que essa propriedade é modificada em razão do mecanismo de degradação proteolítica, durante o processo de maturação. Nesse processo ficam

evidenciadas a atividade proteolítica do coagulante e sua ação sobre a rede de caseína, e a maciez dos queijos fica condicionada à quantidade de ligações da α_{s1} -caseína que são hidrolisadas durante a cura (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982; FOX, 1988).

A dureza tende a diminuir com o tempo de cura, em razão da hidrólise enzimática da caseína, em particular da α_{s1} -caseína. A hidrólise da α_{s1} -caseína pela atividade residual do coagulante resulta em peptídeos, alguns dos quais podem ser solúveis e contribuem para as alterações na matriz proteica, durante a maturação. Pode ser observado, na Tabela 1, que a dureza tende a diminuir com o tempo de maturação, para todos os queijos elaborados com os diferentes coagulantes, independente do tipo de pasteurização. O maior teor de nitrogênio não proteico (NNP) desses queijos já evidencia uma menor atividade proteolítica, enquanto o menor teor de umidade resulta em menor velocidade da proteólise com o tempo de maturação. Os queijos elaborados com quimosina foram os que se apresentaram menos firmes aos 60 dias de maturação, como resultado da maior atividade proteolítica desse coagulante. As menores médias de dureza foram observadas nos queijos dos tratamentos com coagulante quimosina.

Para a adesividade, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, no primeiro dia de maturação e aos 30 dias de maturação (armazenamento refrigerado a 12 °C). Para os demais tempos foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos analisados.

Comparativamente pode-se observar que quanto maior o período de maturação, maiores os valores de adesividade para todos os queijos dos diferentes tratamentos estudados. Os resultados obtidos no presente estudo, em relação ao parâmetro adesividade, são similares aos encontrados por Baldini et al. (1998) que observaram, em queijo prato (queijo de massa semicozida), aumento no valor deste parâmetro com o tempo, mas diferiram dos encontrados

por Katsuda et al. (1999), que não observaram variação na adesividade do queijo prato com baixo teor de gordura, durante a maturação. Silva (1998), em estudo com queijo prato com adição de enzima Neutrase®, observou uma oscilação em relação à adesividade. O parâmetro de adesividade sofreu acréscimo em todos os tratamentos analisados, durante todo o período de maturação. Em queijos de massa lavada, os principais fatores que afetam a textura são o conteúdo de umidade, a extensão da proteólise, o valor de pH e o conteúdo de sal e gordura (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

A elasticidade é a velocidade com que o material deformado volta à sua condição original, após ser retirada a força deformante. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para o parâmetro de elasticidade dos queijos, durante os 30 primeiros dias do período de maturação. Embora a elasticidade não tenha sido afetada significativamente pelos tratamentos, o queijo fabricado com leite pasteurizado por injeção direta de vapor e agente coagulante bovino (T1) apresentou os menores valores ao longo da maturação. Em geral, quando se utilizou o coalho bovino (T1 e T3), os queijos resultantes foram menos elásticos que os fabricados com o coagulante quimosina (T2 e T4), independente do tipo de pasteurização utilizado no leite. A diminuição da elasticidade do queijo prato também foi observada por outros autores (BALDINI, 1998; DORNELLAS, 2003; SILVA, 1998; SPADOTTI et al., 2003). Os dados apresentados na Tabela 1 sugerem que quanto maior a o período maturação dos queijos, menor o seu perfil de elasticidade.

A coesividade dos queijos diminuiu significativamente durante o tempo de maturação, entretanto, diminuiu mais rápido e atingiu valores menores para os queijos obtidos com leite pasteurizado por injeção direta de vapor e agente coagulante bovino. A diminuição da coesividade dos queijos ao longo do período de maturação é, provavelmente, decorrência do aumento da degradação

da caseína e foi também observado por Baldini (1998), Dornellas (2003), Silva (1998) e Spadotti (2003).

Para os queijos tipo prato obtido com leite pasteurizado por injeção direta de vapor e agente coagulante bovino, a coesividade diminuiu mais rápido e atingiu os valores menores, possivelmente porque este queijo apresentou índice de extensão da proteólise ligeiramente maior que os demais. Sugere-se que quanto maior o tempo de maturação dos queijos menor o seu perfil de coesividade. Os dados deste trabalho divergem dos apresentados por Green et al. (1981), que encontraram aumento nos valores de coesividade ao longo do tempo, em queijo cheddar, porém, estes pesquisadores usaram dose menor de coagulante para queijos obtidos de retentados de leite concentrado por ultrafiltração, o que pode explicar o aumento da coesividade. Os queijos elaborados com quimosina (T2 e T4) foram os que se apresentaram menos firmes em todo o período de maturação, como resultado da menor atividade proteolítica dessa enzima coagulante.

3.2 Teste de relaxação

Quando um teste de relaxação de tensão é executado, diferentes comportamentos podem ser observados. Materiais ideais elásticos não relaxam e materiais ideais viscosos instantaneamente mostram um relaxamento ao longo do tempo. Sólidos viscoelásticos gradualmente relaxam e chegam a um equilíbrio de relaxação maior que zero. Para líquidos viscosos, no entanto, a tensão residual desaparece a zero. Para avaliar a curva de relaxação, a tensão aplicada é separada em dois componentes, sendo um componente de tensão de relaxamento e um componente de tensão não relaxante. O componente de repouso representa a propriedade viscosa e o componente não relaxante representa a propriedade elástica (WU; WANG; JENNINGS, 2012).

Nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 estão representadas as curvas de tensão em função do tempo de diferentes fabricações de queijo tipo prato, durante o período de maturação.

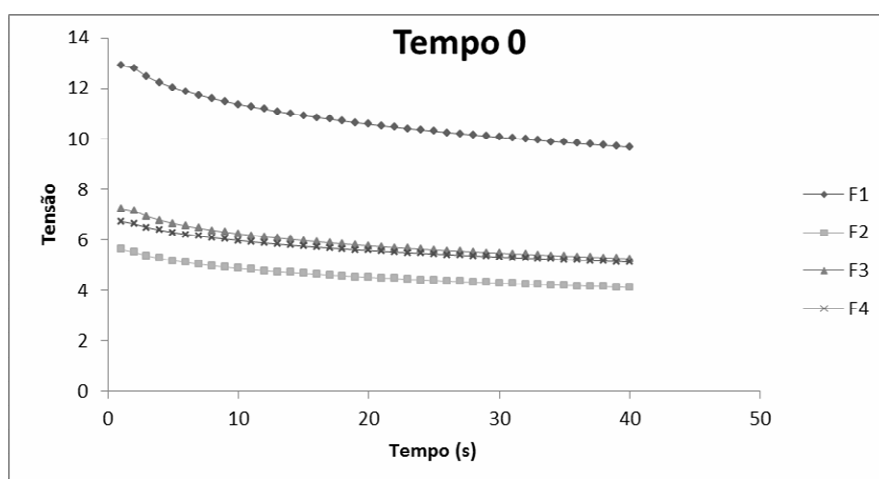


Figura 1 Curvas de relaxação *versus* tempo de diferentes fabricações de queijos tipo prato, com idade de maturação D_1 .

As Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 são apenas para fins ilustrativos e nelas se pode observar que houve um diferente comportamento dos quatro tratamentos analisados durante os cinco tempos de maturação. O tratamento T1 (pasteurização do leite pelo sistema de injeção direta de vapor e coalho bovino) foi o que apresentou as maiores médias de tensão de relaxação, durante todo o tempo de maturação. Pode-se observar que, para os quatro tratamentos estudados, as curvas de relaxação foram reduzidas com o tempo.

Observa-se, ainda, que os tratamentos que utilizaram o sistema de pasteurização por injeção direta de vapor (T1 e T3) apresentaram os valores de tensão mais altos. No entanto, os tratamentos que utilizaram o sistema de pasteurização por HTST e enzima coagulante quimosina (T2 e T4) apresentaram valores menores de tensão.

Pode-se observar que neste estudo, verificou-se uma correlação dos valores de dureza (Tabela 1), e os gráficos de tensão (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Quanto maiores os valores de dureza, maiores os tempos de relaxamento e maior a viscosidade. Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero e Cuvelier (2009) constataram que os materiais que apresentavam maiores valores de dureza têm tempos de maior relaxamento e viscosidades, assim, mais elevados.

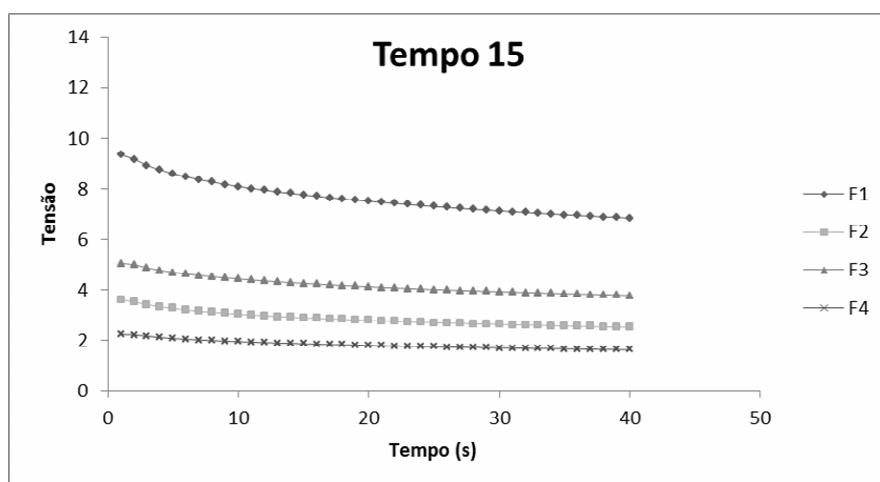


Figura 2 Curvas de relaxação *versus* tempo de diferentes fabricações de queijos tipo prato, com idade de maturação D_{15} .

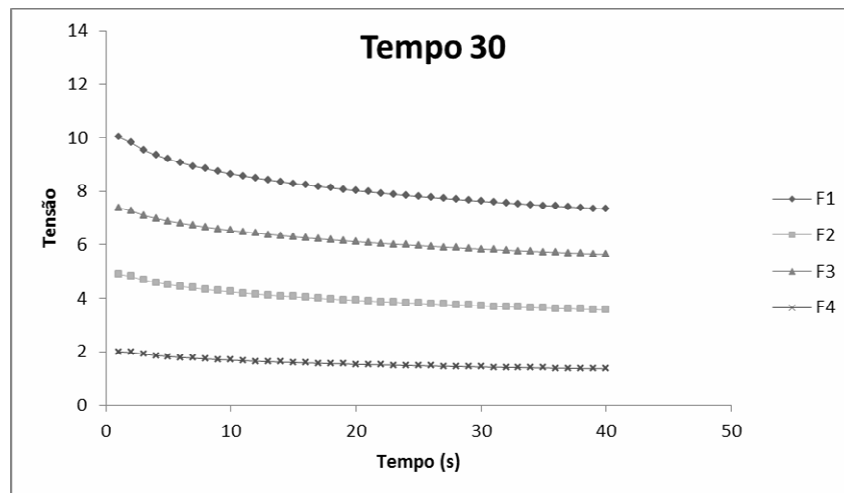


Figura 3 Curvas de relaxação *versus* tempo de diferentes fabricações de queijos tipo prato, com idade de maturação D₃₀.

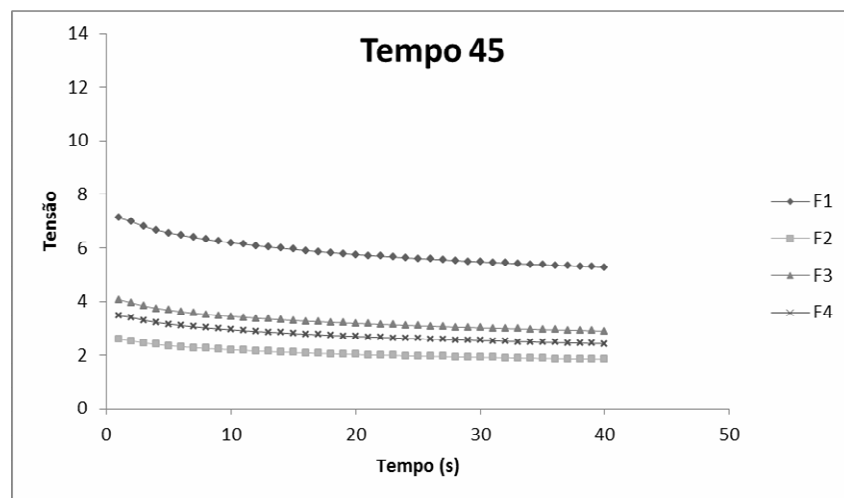


Figura 4 Curvas de relaxação *versus* tempo de diferentes fabricações de queijos tipo prato, com idade de maturação D₄₅.

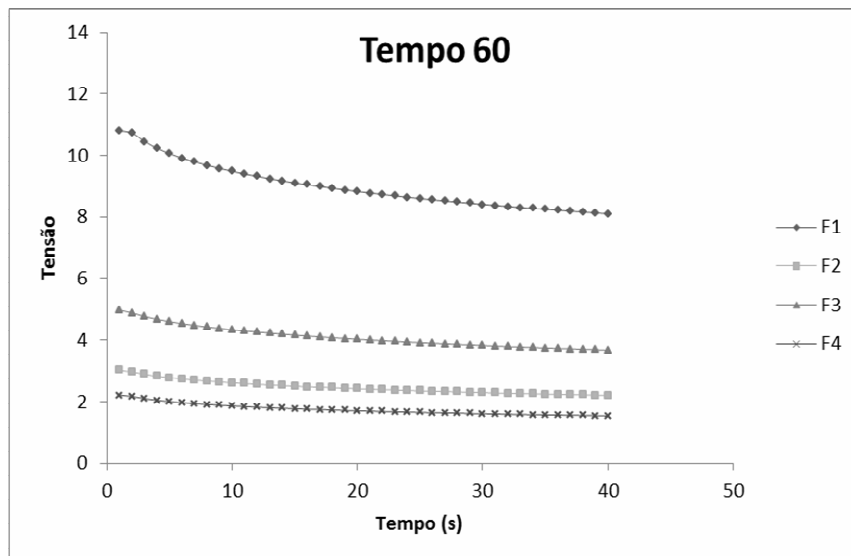


Figura 5 Curvas de relaxação *versus* tempo de diferentes fabricações de queijos tipo prato, com idade de maturação D₆₀.

Modelo de Maxwell

Na Tabela 2 mostram-se as diferenças entre os tratamentos ao longo do tempo no teste de relaxação de tensão, usando o modelo de Maxwell, das amostras de queijo dos diferentes tratamentos analisados. Durante o tempo de armazenamento dos queijos (1; 15; 30; 45; 60 dias), a variação das propriedades também foi significativa ($p < 0,05$).

Foram utilizados os valores obtidos para o modelo de Maxwell (equação 1) que foi escolhido porque não houve uma melhora considerável (aumento do R^2) quando se testou o modelo de Maxwell generalizado de dois elementos mais uma mola.

Tabela 2. Propriedades viscoelásticas do modelo de Maxwell.

Parâmetros	Tratamentos	Dias				
		1	15	30	45	60
E_e (Pa)	T1	48,25 Bb	45,11 Bc	49,05 Bd	34,86 Ac	57,97 Bc
	T2	21,79 Ba	14,23 Aa	21,79 Bb	11,29 Aa	13,13 Aa
	T3	27,13 Aa	23,74 Ab	35,37 Bc	17,33 Ac	19,64 Ab
	T4	24,48 Ba	7,50 Aa	4,48 Aa	11,51 Aa	6,93 Aa
E₁ (Pa)	T1	90,29 Bc	60,01 Ac	64,18 Ad	46,43 Ab	68,78 Ac
	T2	41,36 Ba	23,68 Aa	32,50 Bb	16,88 Aa	20,43 Aa
	T3	52,46 Cb	34,44 Bb	51,53 Cc	26,77 Aa	35,68 Bb
	T4	54,12 Bb	16,88 Aa	15,18 Aa	24,32 Aa	15,81 Aa
λ (s)	T1	84,39 Aa	98,28 Bc	98,06 Bb	101,15 Bb	94,17 Bb
	T2	90,99 Bb	94,80 Bb	85,70 Aa	95,25 Bb	92,02 Bb
	T3	98,24 Ab	97,22 Ab	105,90 Ac	100,93 Ab	92,02 Aa
	T4	91,94 Bb	83,92 Aa	84,06 Aa	85,83 Aa	88,37 Ba
η (Pa.s)	T1	7618,15 Bc	5929,51 Bc	6303,19 Bd	4807,93 Ac	6438,90 Bc
	T2	3756,41 Ba	2234,06 Aa	2783,71 Bb	1587,16 Aa	1864,58 Aa
	T3	5138,50 Cb	3363,78 Bb	5446,43 Cc	2699,17 Ab	3636,15 Bb
	T4	4983,04 Bb	1416,71 Aa	1287,86 Aa	2094,06 Aa	1401,55 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas, e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O modelo de Maxwell foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico dos queijos, já que as curvas experimentais obtidas apresentaram boa correlação ($R^2 > 0,99$).

As propriedades de elasticidade (E_e e E_1) têm o objetivo de quantificar a rigidez do material (PELEG, 1980; RODRIGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009). O tratamento T1 (pasteurização por injeção direta de vapor e coalho bovino) obteve a maior média E_e e E_1 (Tabela 3), entre os tratamentos em cada período de maturação e também apresentou a maior média ao longo da maturação, quando comparado aos demais. Pode-se observar que os queijos onde foram utilizados coalho bovino (T1 e T3) apresentaram os maiores valores do módulo de elasticidade no equilíbrio (E_e) e módulo de elasticidade (E_1), entre os tratamentos e durante todo período de maturação, podendo-se afirmar que estes queijos foram mais rígidos. Além disso, os queijos tipo prato correspondentes ao tratamento T4 apresentaram os menores valores, o que indica que estes queijos foram menos rígidos.

As propriedades viscoelásticas dos queijos variam com o tempo, basicamente em função da proteólise primária, em que o coagulante residual promove a hidrólise da caseína e o consequente enfraquecimento da rede proteica. Como resultado, o queijo tende a ficar mais macio. Durante a proteólise secundária, enzimas provenientes da cultura lática ou de bactérias contaminantes são responsáveis pela continuação do processo (FOX et al., 1998; PRENTICE; LANGLEY; MARSHALL, 1993).

Como o queijo de (tipo prato) massa semicozida, normalmente, é maturado, a proteólise costuma ser mais intensa, podendo causar grandes alterações na estrutura da matriz proteica. Assim, é esperado que, durante o período de vida útil, a textura do queijo sofra grandes alterações. Observando-se os resultados obtidos para os índices de extensão de proteólise (já que a

proteólise primária é a principal responsável pela mudança na textura do queijo), percebe-se que os valores aumentaram com o tempo, o que confirma os resultados obtidos nos testes de relaxação.

Segundo Fox et al. (1998), um valor alto para o módulo de elasticidade sugere que a matriz de caseína é elástica e contínua, com fortes atrações intermoleculares. Assim, o aumento do fator de concentração resulta em um queijo mais firme e mais elástico, devido ao tipo de rede proteica formada na coagulação. A massa do queijo aumenta a quantidade de caseínas disponíveis para interagir e, ao mesmo tempo, diminui a quantidade de soro, aumentando a possibilidade de contato entre as micelas de caseína. Como consequência, o gel formado apresenta estrutura mais fechada e com menor capacidade de reter água, quando manipulado.

Os módulos de elasticidade e a viscosidade de todos os elementos do modelo diminuíram durante o armazenamento refrigerado, para os tratamentos analisados. A redução do módulo de elasticidade indica uma diminuição na tendência do material em recuperar sua forma original, quando uma tensão aplicada é removida. Isso significa que quanto maior a tendência à recuperação, maior será a elasticidade. Essa diminuição pode ser relacionada com a proteólise primária que provocou redução na firmeza e na elasticidade dos queijos, tornando-os mais macios, menos firmes e menos elásticos. Durante a proteólise secundária, enzimas provenientes da cultura láctica, cultura adjunta ou de bactérias contaminantes, podem ser responsáveis pela continuação do processo (FOX, 1989).

De modo geral, os valores de tempo de relaxação (λ) diminuíram ao longo do tempo, em todos os tratamentos analisados. As maiores médias foram obtidas com os queijos fabricados com o tratamento T3 e as menores (Tabela 4), pelo tratamento T4. De acordo Bhattacharya (2010), Campus et al. (2010) e Nobile et al. (2007), os valores mais baixos de tempo de relaxação indicam que

o material é menos elástico e menos firme, portanto, no T4, os queijos foram menos elásticos e menos firmes e, em contrapartida, os queijos do T3 foram os mais elásticos e mais firmes.

A viscosidade (η) é uma medida da resistência do corpo à deformação, quando este é submetido a uma tensão e reflete na maciez do queijo. Quanto maior a resistência à deformação, menor será a maciez do queijo (FOX et al., 1998). Assim, quanto maior a viscosidade, maior a tensão necessária para deformar o material. Segundo Fox et al. (1998), a maciez é definida como baixa resistência à deformação. Nesse sentido, a viscosidade pode ser vista como uma medida da maciez ou da firmeza do queijo.

A viscosidade (η) comportou-se de forma semelhante para as propriedades de elasticidade. Maiores valores foram observados para o tratamento T1, o que indica que este comportamento é mais forte para este tratamento, quando comparado aos outros.

Derensis, Petenate e Viotto (2005) avaliaram a caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo prato, com teor reduzido de gordura e observaram, nas propriedades reológicas dos queijos, utilizando o teste de relaxação, que os módulos de elasticidade e a viscosidade de todos os elementos do modelo diminuíram, durante o armazenamento refrigerado, para duas marcas dentre as demais estudadas. Estes resultados foram semelhantes ao deste estudo.

Os dados da Tabela 4 demonstram que, durante o tempo de armazenamento, a variação dos parâmetros também foi significativa ($p < 0,05$). Os módulos de elasticidade e a viscosidade de todos os elementos do modelo diminuíram, durante o armazenamento refrigerado, para todos os quatro tratamentos estudados. A redução do módulo de elasticidade indica uma diminuição na tendência do material a recuperar sua forma original, quando uma tensão aplicada é removida. Essa diminuição está relacionada com a proteólise

primária, que provoca redução na firmeza e na elasticidade dos queijos, tornando-os mais macios, menos firmes e menos elásticos. Durante a proteólise secundária, enzimas provenientes da cultura láctica, cultura adjunta ou de bactérias contaminantes são responsáveis pela continuação do processo.

Finalmente, a interação entre os tratamentos e o tempo também foi significativa para todos os parâmetros do modelo, indicando que os tratamentos se comportaram de maneira diferente ao longo do tempo. Com a diminuição do módulo de elasticidade e das viscosidades, pode-se dizer que os queijos apresentaram-se mais macios, menos firmes e menos elásticos, ao final do armazenamento.

Pode-se observar que, neste estudo, quanto maior a dureza (Tabela 1), aumenta o módulo de elasticidade do ideal do corpo elástico (E_1) (Tabela 2). De acordo com Peleg (1980), os módulos de elasticidade são uma propriedade que podem ser utilizadas para medir a dureza de um material, de tal modo que as amostras com maiores valores de módulos de elasticidade são os materiais mais duros.

O aumento da dureza dos materiais viscoelásticos faz com que a viscosidade aumente. Tal resultado foi relatado por Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero e Cuvelier (2009), que constataram que os materiais com maior dureza têm tempos de maior relaxamento e viscosidades, assim, mais elevadas.

Modelo de Peleg

As médias estimadas no teste de relaxação de tensão utilizando o modelo de Peleg encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 Médias do teste de relaxação, utilizando o modelo de Peleg.

Parâmetros	Tratamentos	Dias				
		1	15	30	45	60
k_1 (s)	T1	26,66 Aa	28,33 Ab	28,26 Ac	29,55 Ab	28,84 Ab
	T2	26,43 Ba	24,95 Aa	24,88 Ab	26,40 Bb	26,02 Bb
	T3	27,49 Aa	24,10 Ab	32,79 Cd	27,45 Ab	28,97 Ab
	T4	28,56 Ca	24,17 Ba	20,87 Aa	22,32 Aa	23,53 Ba
k_2	T1	1,19 Ab	1,24 Bc	1,25 Ba	1,25 Bc	1,29 Cc
	T2	1,16 Aa	1,19 Bb	1,22 Ca	1,21 Cb	1,20 Bb
	T3	1,16 Aa	1,24 Cc	1,24 Ca	1,20 Bb	1,18 Ab
	T4	1,15 Ba	1,14 Aa	1,05 Aa	1,13 Ba	1,13 Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De acordo com Bhattacharya (2010), Sozer e Dalgic (2007), Sozer, Kaya e Dalgic (2008), Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero e Cuvelier (2009) e Tang, Tung e Zeng (1998), a aplicação do modelo de Peleg para descrever os dados de relaxamento é uma maneira simples de descrever e comparar o teste de relaxação, usando dados de reologia relatados na literatura, porque neste modelo utilizam-se apenas duas propriedades, da seguinte forma: taxa de decaimento inicial ($1/k_1$) e tensão normalizada ($1/k_2$), que teriam permanecido sem relaxar até que o equilíbrio. A propriedade $1/k_1$ é uma medida da facilidade com que o material se deforma, isto é, altos valores de k_1 sugerem um material mais duro, que dissipa menos energia, o que exige mais força para ser comprimido (GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009).

A propriedade $1/k_2$ representa o grau de relaxamento do material (BELLIDO; HATCHER, 2009; GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009). De acordo com Peleg (1980), $1/k_2$ representa as condições de equilíbrio do material, isto é, a porção do material que permanece sem relaxar no equilíbrio. A propriedade k_2 foi influenciada por qualquer uma das variáveis estudadas, o que indicou que os efeitos da adição de variáveis independentes, para o estudo dos diferentes tratamentos para os queijos tipo prato, influenciam o grau de relaxamento do material, a 5% de significância.

3.3 Medidas de compressão uniaxial

Na Tabela 4 apresentam-se as médias dos parâmetros da resistência à compressão (deformação de ruptura, módulo de elasticidade (módulo de Young) e o trabalho de ruptura) para as amostras de queijo dos diferentes tratamentos analisados. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros avaliados e a estatística utilizada foi capaz de discriminar as diferenças entre as amostras de queijo tipo prato ao longo do tempo.

Assim como ocorreu nos demais testes, para a avaliação de parâmetros viscoelásticos do queijo (relaxação), todas as propriedades reológicas avaliadas nas análises de compressão uniaxial apresentaram modificações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com o tempo de maturação em estocagem refrigerada.

Tabela 4 Resistencia a compressão aos parametros analisados.

Parâmetros	Tratamentos	Dias				
		1	15	30	45	60
σ_{rup} (kPa)	T1	54,62 Bb	37,02 Ab	36,05 Ab	32,32 Ab	43,88 Ab
	T2	49,59 Bb	25,59 Aa	27,59 Aa	24,57 Aa	24,31 Aa
	T3	79,66 Bc	33,57 Ab	35,72 Ab	38,01 Ab	34,75 Ab
	T4	35,04 Ba	20,07 Aa	25,37 Aa	26,73 Aa	19,96 Aa
ϵ_{rup}	T1	0,56 Ca	0,68 Ca	0,49 Ba	0,41 Ba	0,29 Aa
	T2	0,65 Ab	0,70 Bc	0,59 Ab	0,55 Aa	0,64 Bb
	T3	0,79 Bb	0,73 Ba	0,78 Bc	0,64 Ab	0,69 Ab
	T4	1,01 Bc	0,92 Ab	1,21 Cd	0,89 Ac	0,90 Ac
E (kPa)	T1	39,35 Ba	42,05 Bb	25,60 Aa	39,18 Bb	34,24 Bb
	T2	47,82 Ba	19,51 Aa	20,66 Aa	33,42 Bb	11,76 Aa
	T3	40,59 Ba	41,82 Bb	33,08 Bb	29,64 Aa	29,29 Aa
	T4	38,78 Ba	15,64 a	10,34 Aa	18,97 Aa	13,77 Ac
W_{rup} (kJ/m ²)	T1	17,27 Ba	14,15 Bb	10,08 Aa	6,87 Aa	7,15 Aa
	T2	17,88 Ba	12,13 Aa	9,42 Ba	7,86 Aa	11,19 Aa
	T3	33,41 Bc	14,65 Ab	17,12 Ab	13,75 Ab	14,13 Ab
	T4	21,43 Cb	10,23 Aa	15,95 Bb	13,91 Bb	10,11 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tensão de ruptura (σ_{rup}) é definida como a tensão requerida para quebrar a matriz do alimento (CUNHA, 2002). De acordo com Marudova e Jilov (2003), maior tensão de ruptura pressupõe um comportamento mais elástico. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, em todos os tempos. Os maiores valores foram observados para os tratamentos T1 e T3. Em ambos foi utilizado o coalho bovino como enzima coagulante, mas eles diferiram no tipo de pasteurização do leite. Os menores valores foram observados no tratamento T4, em que a tensão de ruptura foi menor, o que fez com que os queijos se tornassem mais frágeis.

Os valores de tensão na ruptura (σ_{rup}) diminuíram significativamente durante o período de maturação ($p < 0,05$). A tensão de ruptura é definida como a tensão necessária para romper a matriz proteica. Segundo Fox et al. (1998), essa

propriedade está relacionada à dureza do queijo. Quanto maior a concentração de caseínas, mais numerosas se tornam as ligações entre as mesmas. Como consequência, a estrutura da rede proteica formada na coagulação é mais fechada, com fortes atrações intermoleculares, o que resulta num queijo mais resistente à ruptura, mais firme e mais elástico ao longo do tempo.

A deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}) indica a fragilidade da textura do alimento, ou seja, a medida que o produto pode ser deformado sem rasgar (CUNHA, 2002). Materiais com alta tensão de ruptura e tensão de ruptura verdadeira são rígidos e fortes, enquanto materiais com alta tensão de ruptura verdadeira, mas com baixos valores de tensão de ruptura verdadeira são duros e quebradiços.

De acordo com Cunha (2002), a deformação de ruptura representa o quão quebradiça é a textura do produto, isto é, até que ponto o produto pode ser deformado sem se romper. Dessa forma, pode-se observar (Tabela 4) que o tratamento que apresentou maior média, quando comparado com os demais, foi o T4 (pasteurização indireta pelo sistema de placas e enzima coagulante quimosina).

Queijos com os maiores valores de elasticidade (E) foram mais rígidos. Os tratamentos T1 e T3 obtiveram as maiores médias para o módulo de elasticidade e, em determinados tempos de maturação, apresentaram diferenças significativas.

O trabalho de ruptura (W_{rup}) é definido como a energia necessária para causar a ruptura do material. Os maiores valores de trabalho de ruptura foram observados para o tratamento T3 (pasteurização por HTST e coalho bovino), cujos queijos foram mais rígidos e mais resistentes à ruptura.

Os parâmetros relacionados à tensão na ruptura (σ_{rup}), deformação de ruptura (ϵ_{rup}) e trabalho de ruptura (W_{rup}) podem ser observados na Tabela 4. De modo geral, os queijos dos diferentes tratamentos apresentaram tendência à

diminuição dos valores dessas propriedades no decorrer do tempo de armazenamento. Essas propriedades estão diretamente relacionadas à firmeza e à dureza do queijo. Logo, há uma indicação de que os queijos apresentaram-se menos firmes e mais macios ao final do tempo de armazenamento refrigerado. Essa diminuição da firmeza e da maciez é decorrente do aumento da proteólise durante o tempo armazenamento refrigerado.

Barros et al. (2011) observaram os mesmos comportamentos reológicos para as propriedades do teste de compressão uniaxial em seus estudos com uso de culturas adjuntas e ultrafiltração, para melhoria de sabor e textura de queijo prato com reduzido teor de gordura. Os valores de tensão de ruptura, deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}), valores de elasticidade (E), trabalho de ruptura (W_{rup}), foram reduzidos ao longo do tempo de maturação.

3.4 Correlação entre as propriedades reológicas

Os coeficientes de correlação de Pearson entre as diferentes propriedades reológicas dos queijos tipo prato, avaliados durante os 60 dias de maturação, podem ser observados nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9.

Tabela 5 Coeficiente de correlação de Pearson entre as propriedades reológicas dos queijos tipo prato, no primeiro dia de maturação.

	Dur	Ade	Elas	Coe	Gom	E _e	E ₁	λ	η	1/k ₁	1/k ₂	σ _{rup}	ε _{rup}	E	W _{rup}
Dur	1														
Ade	-0,32	1													
Elas	0,20	0,37	1												
Coe	-0,28	0,98*	0,54	1											
Gom	0,57	-0,58	0,64	0,62	1										
E_e	0,15	-0,79	0,18	-0,66	-0,43	1									
E₁	0,002	-0,71	0,21	-0,58	-0,48	0,98	1								
λ	0,22	0,85	0,52	0,85	0,91	-0,71	-0,72	1							
η	0,03	-0,63	0,34	-0,48	-0,37	0,97*	0,99*	-0,61	1						
1/k₁	-0,71	0,78	0,45	0,83	0,12	-0,34	-0,19	0,41	-0,12	1					
1/k₂	0,38	-0,92	0,00	-0,83	-0,39	0,94	0,88	-0,73	0,84	-0,63	1				
σ_{rup}	0,86	0,02	0,66	0,12	0,81	0,11	0,02	0,51	0,10	-0,28	0,20	1			
ε_{rup}	-0,69	0,89	0,29	0,88	0,19	-0,59	-0,45	0,53	-0,39	0,95*	-0,81	-0,32	1		
E	0,40	-0,12	-0,70	-0,29	0,06	-0,48	-0,59	0,06	-0,67	-0,63	-0,18	-0,005	-0,39	1	
W_{rup}	0,37	0,64	0,84	0,73	0,94	-0,30	-0,31	0,88	-0,17	0,37	-0,37	0,75	0,36	-0,26	1

* p<0.05; ** p<0.01

Har: dureza; Ade: adesividade; Coe: coesividade; Gom: gomosidade; E_e: módulo de elasticidade no equilíbrio; E₁: módulo de elasticidade do corpo ideal; λ: tempo de relaxação; η: viscosidade; 1/k₁: taxa de decaimento inicial; 1/k₂: valor hipotético da força normalizada; σ_{rup}: tensão de ruptura; ε_{rup}: deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}); E: módulos de elasticidade; W_{rup}: força de trabalho.

A adesividade (Ade) foi correlacionada positivamente com a coesividade (Coe) (em valor absoluto) ($0,98$, $p < 0,05$) e os módulos de elasticidade no equilíbrio e o módulo de elasticidade do corpo ideal (E_e e E_1 , respectivamente) foram correlacionados positivamente ($0,97 < 0,05$) e negativamente ($-0,99 < 0,01$) com a viscosidade (η). A taxa de decaimento inicial ($1/k_1$) ($0,95 < 0,05$) com tensão máxima (ϵ_{rup}) também foi correlacionada positivamente. A adesividade, uma característica da superfície da utilização de grandes deformações, não é adequada para o cálculo do parâmetro porque pequenas deformações (aproximadamente 2,0%) e tempos de contato longos com a sonda de amostra (cerca de 300s) não devem ser utilizados para o cálculo do presente parâmetro (BORDE et al., 2010). As propriedades E_e e E_1 estão estreitamente relacionadas, pois são as propriedades do elemento elástico no modelo de Maxwell (BELLIDO; HATCHER, 2009; KAUR et al., 2002). Quanto maior o comportamento do material sólido, mais altos os valores dessas propriedades, estando o módulo de elasticidade (E) relacionado com a rigidez do material (FRAEYE et al., 2010).

De acordo com as observações feitas neste estudo, o aumento do $1/k_1$ está relacionado com a maturação, durante a qual ocorrem reações de proteólise, causando o amolecimento. Isso ocorre porque os materiais com maiores $1/k_1$ dissipam mais energia e, portanto, são mais suaves. Roopa e Bhattacharya (2009) descobriram que quanto maior W_{rup} , maior será a energia necessária para romper o material, o que indica que o material tem um comportamento sólido.

Tabela 6 Coeficiente de correlação de Pearson entre as propriedades reológicas dos queijos tipo prato, nos primeiros 15 dias de maturação.

	Dur	Ade	Elas	Coe	Gom	E _e	E ₁	λ	η	1/k ₁	1/k ₂	σ _{rup}	ε _{rup}	E	W _{rup}
Dur	1														
Ade	-0,75	1													
Elas	-0,98*	0,84	1												
Coe	-0,86	0,74	0,91	1											
Gom	0,91	-0,65	-0,85	-0,58	1										
E_e	0,79	-0,20	-0,70	-0,68	0,67	1									
E₁	0,76	-0,21	-0,69	-0,75	0,57	0,98	1								
λ	0,91	-0,49	-0,82	-0,59	0,96*	0,83	0,73	1							
η	0,77	-0,22	-0,70	-0,74	0,59	0,98*	0,99**	0,75	1						
1/k₁	0,72	-0,42	-0,74	-0,91	0,40	0,80	0,89	0,51	-0,88	1					
1/k₂	-0,80	0,80	0,79	0,49	-0,92	-0,36	-0,25	-0,79	-0,28	-0,18	1				
σ_{rup}	0,77	-0,16	-0,66	-0,55	0,75	0,97	0,91	0,90	0,92	0,65	-0,44	1			
ε_{rup}	-0,87	0,34	0,78	0,63	-0,86	-0,95	-0,88	-0,96	-0,89	-0,65	0,60	-0,98	1		
E	0,59	0,07	-0,45	-0,33	0,62	0,91	0,83	0,80	0,84	0,49	-0,29	0,96*	-0,90	1	
W_{rup}	0,80	-0,21	-0,68	-0,52	0,81	0,94	0,86	0,94	0,87	0,58	-0,53	0,99	-0,98	0,95	1

* p<0.05; ** p<0.01

Har: dureza; Ade: adesividade; Coe: coesividade; Gom: gomosidade; E_e: módulo de elasticidade no equilíbrio; E₁: módulo de elasticidade do corpo ideal; λ: tempo de relaxação; η: viscosidade; 1/k₁: taxa de decaimento inicial; 1/k₂: valor hipotético da força normalizada; σ_{rup}: tensão de ruptura; ε_{rup}: deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}); E: módulos de elasticidade; W_{rup}: força de trabalho.

A dureza (Dur) correlacionou-se negativamente com a coesividade (Coe) (em valor absoluto) (-0,98, $p < 0,05$); a gomosidade (Gom), com o tempo de relaxação (λ) (-0,96, $p < 0,05$); os módulos de elasticidade no equilíbrio e o módulo de elasticidade do corpo ideal (E_e e E_l , respectivamente) foram correlacionados (-0,98, $p < 0,05$) (-0,99, $p < 0,01$) com viscosidade (η) e a tensão de ruptura (σ_{rup}), correlacionou-se com o módulo de elasticidade (E) (0,96, $p < 0,05$).

De acordo com Peleg (1980), os módulos de elasticidade são uma propriedade que pode ser utilizada para medir a dureza de um material, de tal modo que as amostras com maiores valores de módulos elásticos são os materiais mais duros. O aumento da dureza dos materiais viscoelásticos faz com que a viscosidade aumente. Tal resultado foi relatado por Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero e Cuvelier (2009), que constatou que os materiais com maior dureza têm tempos de maior relaxamento e viscosidades, assim, mais elevados.

Tabela 7 Coeficiente de correlação de Pearson entre as propriedades reológicas dos queijos tipo prato, nos primeiros 30 dias de maturação.

	Dur	Ade	Elas	Coe	Gom	E _e	E ₁	λ	η	1/k ₁	1/k ₂	σ _{rup}	ε _{rup}	E	W _{rup}
Dur	1														
Ade	-0,77	1													
Elas	-0,21	-0,36	1												
Coe	-0,58	0,12	0,87	1											
Gom	0,95*	-0,88	0,07	-0,34	1										
E_e	0,68	-0,27	-0,79	-0,98*	0,46	1									
E₁	0,72	-0,28	-0,78	-0,98*	0,50	0,99*	1								
λ	0,93	-0,51	-0,46	-0,71	0,82	0,77	0,81	1							
η	0,78	-0,31	-0,76	-0,96	0,57	0,98	0,99	0,87	1						
1/k₁	0,98*	-0,70	-0,34	-0,69	0,91	0,78	0,81	0,96*	0,86	1					
1/k₂	0,77	0,99	-0,36	0,11	-0,88	-0,26	-0,28	-0,51	-0,31	-0,70	1				
σ_{rup}	0,83	-0,35	-0,71	-0,91	0,65	0,93	0,96	0,93	0,98	0,90	-0,35	1			
ε_{rup}	-0,46	0,38	0,51	0,78	-0,30	-0,82	-0,78	-0,39	-0,72	-0,54	0,38	-0,61	1		
E	0,59	0,07	-0,45	-0,33	0,62	0,91	0,83	0,80	0,84	0,49	-0,29	0,96	-0,90	1	
W_{rup}	0,80	-0,21	-0,68	-0,52	0,81	0,94	0,86	0,94	0,87	0,58	-0,53	0,99	-0,98	0,95	1

* p<0.05; ** p<0.01

Har: dureza; Ade: adesividade; Coe: coesividade; Gom: gomosidade; E_e: módulo de elasticidade no equilíbrio; E₁: módulo de elasticidade do corpo ideal; λ: tempo de relaxação; η: viscosidade; 1/k₁: taxa de decaimento inicial; 1/k₂: valor hipotético da força normalizada; σ_{rup}: tensão de ruptura; ε_{rup}: deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}); E: módulos de elasticidade; W_{rup}: força de trabalho.

Tabela 8 Coeficiente de correlação de Pearson entre as propriedades reológicas dos queijos tipo prato, nos primeiros 45 dias de maturação.

	Dur	Ade	Elas	Coe	Gom	E _e	E ₁	λ	η	1/k ₁	1/k ₂	σ _{rup}	ε _{rup}	E	W _{rup}
Dur	1														
Ade	-0,65	1													
Elas	-0,80	0,69	1												
Coe	-0,67	0,63	0,98*	1											
Gom	0,54	-0,15	0,05	0,25	1										
E_e	0,20	-0,24	-0,73	-0,84	0,69	1									
E₁	0,19	-0,04	-0,67	-0,78	-0,63	0,96	1								
λ	0,69	-0,89	-0,92	-0,91	-0,12	0,64	0,49	1							
η	0,23	-0,16	-0,72	-0,83	-0,64	0,98	0,99	0,58	1						
1/k₁	0,98	-0,70	-0,34	-0,69	0,91	0,78	0,81	0,96*	0,86	1					
1/k₂	0,29	-0,75	-0,72	-0,79	-0,51	0,74	0,54	0,89	0,64	0,97*	1				
σ_{rup}	0,94	-0,50	-0,88	-0,79	0,32	0,44	0,48	0,68	0,49	0,52	0,32	1			
ε_{rup}	-0,19	0,72	0,64	0,73	0,56	-0,72	-0,51	-0,39	-0,84	-0,61	-0,94	-0,99	1		
E	0,20	-0,73	-0,64	-0,73	-0,55	0,71	0,50	0,84	0,61	0,94	0,99	0,23	-0,99	1	
W_{rup}	0,34	0,36	0,17	0,31	0,80	-0,54	-0,34	-0,43	-0,42	-0,64	-0,79	0,30	0,84	-0,84	1

* p<0.05; ** p<0.01

Har: dureza; Ade: adesividade; Coe: coesividade; Gom: gomosidade; E_e: módulo de elasticidade no equilíbrio; E₁: módulo de elasticidade do corpo ideal; λ: tempo de relaxação; η: viscosidade; 1/k₁: taxa de decaimento inicial; 1/k₂: valor hipotético da força normalizada; σ_{rup}: tensão de ruptura; ε_{rup}: deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}); E: módulos de elasticidade; W_{rup}: força de trabalho.

Durante os 45 dias de maturação, a elasticidade (Elas) correlacionou-se positivamente com a coesividade (Coe) (em valor absoluto) (0,98, $p < 0,05$), o tempo de relaxação (λ) com taxa de decaimento inicial ($1/k_1$) (0,96, $p < 0,05$), taxa de decaimento inicial ($1/k_1$) com ($1/k_2$).

Tabela 9 Coeficiente de correlação de Pearson entre as propriedades reológicas dos queijos tipo prato, nos primeiros 60 dias de maturação.

	Dur	Ade	Elas	Coe	Gom	E _e	E ₁	λ	η	1/k ₁	1/k ₂	σ _{rup}	ε _{rup}	E	W _{rup}
Dur	1														
Ade	-0,25	1													
Elas	-0,12	0,87	1												
Coe	-0,40	0,79	0,94	1											
Gom	0,38	0,59	0,84	0,68	1										
E_e	0,60	-0,76	-0,86	0,97*	-0,50	1									
E₁	0,71	-0,70	-0,77	-0,92	-0,36	0,98*	1								
λ	-0,15	-0,70	-0,36	-0,14	-0,25	0,09	0,02	1							
η	0,76	-0,67	-0,72	-0,89	-0,29	0,97*	0,99	0,01	1						
1/k₁	0,92	-0,56	-0,34	-0,52	0,20	0,69	0,77	0,22	0,81	1					
1/k₂	0,55	-0,91	0,86	-0,91	-0,47	0,94	0,92	0,41	0,91	0,76	1				
σ_{rup}	0,85	-0,65	-0,62	-0,81	-0,13	0,92	0,96*	0,06	0,98	0,90	0,89	1			
ε_{rup}	-0,68	0,72	0,79	0,94	0,40	-0,99**	-0,99	-0,04	-0,99*	-0,75	-0,93	-0,95*	1		
E	0,69	-0,63	-0,75	-0,92	-0,38	0,98*	0,99**	-0,07	0,98*	0,71	0,87	0,94	0,99**	1	
W_{rup}	0,17	0,54	0,87	0,80	0,95*	-0,65	-0,54	-0,01	-0,48	0,07	-0,54	-0,31	0,57	-0,58	1

* p<0.05; ** p<0.01

Har: dureza; Ade: adesividade; Coe: coesividade; Gom: gomosidade; E_e: módulo de elasticidade no equilíbrio; E₁: módulo de elasticidade do corpo ideal; λ: tempo de relaxação; η: viscosidade; 1/k₁: taxa de decaimento inicial; 1/k₂: valor hipotético da força normalizada; σ_{rup}: tensão de ruptura; ε_{rup}: deformação de ruptura (deformação de Hencky – ε_{rup}); E: módulos de elasticidade; W_{rup}: força de trabalho.

Durante os sessenta dias de maturação, a coesividade (Coe) foi correlacionada com o módulo de elasticidade no corpo ideal (E_1) (em valor absoluto) (0,98, $p < 0,05$), negativamente com a deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}) (-0,99 $p < 0,01$). O módulo de elasticidade no corpo ideal (E_1) foi correlacionado com tensão de ruptura (σ_{rup}) (0,96 $p < 0,05$), módulo de elasticidade (E) (0,99 $p < 0,01$). Viscosidade (η), com deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}), e módulo de elasticidade (E) (-0,99 $p < 0,05$). Deformação de ruptura (deformação de Hencky – ϵ_{rup}) com módulo de elasticidade (E) (0,99 $p < 0,01$).

4 CONCLUSÃO

O modelo de Maxwell foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico dos queijos, já que as curvas experimentais obtidas apresentaram boa correlação ($R^2 > 0,99$). Para os testes dos parâmetros de relaxamento, o modelo de Maxwell discriminou melhor os tratamentos, do que os parâmetros do modelo de Peleg. Correlações positivas e negativas foram observadas e os parâmetros de adesividade, dureza e módulos elásticos do ideal do corpo elástico (e_1) foram os mais correlacionados com os outros parâmetros reológicos.

Assim como ocorreu nos demais testes para a avaliação de parâmetros viscoelásticos do queijo (relaxação), todas as propriedades reológicas avaliadas nas análises de compressão uniaxial apresentaram modificações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com o tempo de maturação em estocagem refrigerada.

REFERÊNCIAS

- ADDA, J.; GRIPON, J. C.; VASSAL, L. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. **Food Chemistry**, London, v. 9, p. 115-129, 1982.
- ANDRÉS, S. C.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Stress relaxation characteristics of low-fat chicken sausages made in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 589-594, July 2008.
- BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- BALDINI, V. L. S. et al. Alterações das características químicas e de textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 53-59, 1998.
- BAYARRI, S.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Influence of sweeteners on the viscoelasticity of hydrocolloids gelled systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 616-619, July 2004.
- BAYARRI, S. et al. Influence of texture on the temporal perception of sweetness of gelled systems. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 7, p. 900-908, Aug. 2007.
- BELLIDO, G. G.; HATCHER, D. W. Stress relaxation behaviour of yellow alkaline noodles: effect of deformation history. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 93, n. 4, p. 460-467, Aug. 2009.
- BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 97, n. 4, p. 539-546, Apr. 2010.
- BORDE, A. et al. Osmotic-driven mass transport of water: impact on the adhesiveness of hydrophilic polymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 341, n. 2, p. 255-260, Jan. 2010.
- BOURNE, M. C. Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, n. 2, p. 223-226, 1968.
- CAMPUS, M. et al. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure

treatment. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, n. 2, p. 192-198, Jan. 2010.

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

DERENSIS, 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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 488-494, jul./set. 2009.

DORNELLAS, J. R. F. **Contribuição ao estudo da fabricação do queijo Prato a partir de retentados obtidos por ultrafiltração de leite com ou sem pré-fermentação**. 2003. 213 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

_____. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Colchester, v. 10, p. 522-535, 1988.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 1998. 587 p.

FRAEYE, I. et al. Influence of pectin structure on texture of pectin-calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 401-409, 2010.

GREEN, M. L. et al. Effect of use of milk concentrated by ultrafiltration on the manufacture and ripening of cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 48, p. 333-341, 1981.

GUILLET, A. On the non hookean elastic behavior of iron whiskers at high strain. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 64, n. 20, p. 2148-2150, Oct. 2010.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. Dynamic oscillatory shear testing of foods: selected applications. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 115-127, Mar. 2000.

GUO, Z.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. Characterization of masa and low-moisture corn tortilla using stress relaxation methods. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 30, n. 2, p. 197-215, July 1999.

HAMANN, D. D. Structural failure in solid foods. In: PELEG, M.; BAGLEY, E. B. (Ed.). **Physical properties of foods**. Westport: AVI, 1983. p. 351-383.

HERNÁNDEZ, M. J.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Influence of composition on mechanical properties of strawberry gels: compression test and texture profile analysis. **Food Science and Technology International**, London, v. 5, n. 1, p. 79-87, 1999.

HERRERO, A. M. et al. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. **Meat Science**, Barking, v. 77, n. 3, p. 331-338, Nov. 2007.

HONIKEL, K. O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 4, p. 447-457, Aug. 1998.

ISHIHARA, S. et al. Viscoelastic and fragmentation characters of model bolus from polysaccharide gels after instrumental mastication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1210-1218, July 2011.

JONG, L. de. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency: I, proteolysis and consistency of "Noordhollanse Meshanger" cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 30, p. 242-253, 1976.

KAMPF, N.; NUSSINOVITCH, A. Rheological characterization of κ -carrageenan soy milk gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 261-269, 1997.

KANAWJIA, S. K. et al. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n. 6, p. 577-583, Dec. 1995.

KARAMAN, S. et al. Dynamic oscillatory shear properties of O/W model system meat emulsions: linear viscoelastic analysis for effect of temperature and oil concentration on protein network formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 107, n. 2, p. 241-252, Dec. 2011.

KATSUDA, M. S. et al. Caracterização química, sensorial e de textura de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 128-131, 1999.

KAUR, L. et al. Some properties of potatoes and their starches: I., cooking, textural and rheological properties of potatoes. **Food Chemistry**, London, v. 79, n. 2, p. 177-181, Nov. 2002.

KHAZAEI, J.; MOHAMMADI, N. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 4, p. 542-552, Apr. 2009.

KONSTANCE, R. P.; HOLSINGER, V. H. Developments of rheological test methods for cheese. **Food Technology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 105-109, 1992.

KUMAGAI, H. et al. Relationship between flow properties of thickener solutions and their velocity through the pharynx measured by the ultrasonic pulse Doppler method. **Food Science and Technology Research**, Yamagata, v. 15, n. 3, p. 203-210, 2009.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 8, p. 665-671, Oct. 2000.

LU, R.; ABBOTT, J. A. A Transient method for determining dynamic viscoelastic properties of solid food. **Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 39, n. 4, p. 1461-1467, 1996.

MARUDOVA, M.; JILOV, N. Influence of sodium citrate and potassium-sodium tartrate on gelation of low-methoxyl amidated pectin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 59, n. 2/3, p. 177-180, Sept. 2003.

MORALES, R. et al. Instrumental evaluation of defective texture in dry-cured hams. **Meat Science**, Barking, v. 76, n. 3, p. 536-542, July 2007.

NOBILE, M. A. et al. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, n. 3, p. 978-983, Feb. 2007.

PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. **Journal of Rheology**, New York, v. 24, p. 451-463, 1980.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid foods. **Rheological Acta**, Cambridge, v. 22, p. 108-113, 1983.

PRENTICE, J. H.; LANGLEY, K. R.; MARSHALL, R. J. Cheese rheology. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry physics and microbiology**. 2nd ed. New York: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 303-340.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RAO, V. N. M. Classification description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: ROA, M. A.; STEFFE, J. F. (Ed.). **Viscoelastic properties of solid foods**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 3-47.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 1, p. 202-206, 2009.

ROOPA, B. S.; BHATTACHARYA, S. Alginate gels: rupture characteristics as a function of the conditions of gel formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 3, p. 448-454, Apr. 2009.

RYCHLEWSKI, J. On Hooke's law. **Journal of Applied Mathematics and Mechanics**, Elmsford, v. 48, n. 3, p. 303-314, 1984.

SILVA, A. T. **Maturação de queijo tipo Prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo**. 1998. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SOZER, N.; DALGIC, A. C. Modelling of rheological characteristics of various spaghetti types. **European Food Research Technology**, Dresden, v. 225, n. 2, p. 183-190, June 2007.

SOZER, N.; KAYA, A.; DALGIC, A. C. The effect of resistant starch additions on viscoelastic properties of cooked spaghetti. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2008.

SPADOTI, L. M. et al. Evaluation of the melting capacity of Prato cheese obtained by modification of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, Les Ulis, v. 83, n. 5, p. 397-408, Sept./Oct. 2003.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Characterization of gellan gels using stress relaxation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 38, n. 3, p. 279-295, Nov. 1998.

WALSTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T. J. Dutch: types varieties. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd ed. Maryland: Aspen, 1999. p. 39-82.

WU, Y. et al. A molecular modeling approach to understand conformation-functionality relationships of galactomannans with different mannose/galactose ratios. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 359-364, Mar. 2012.

CAPÍTULO 5

TIPOS DE PASTEURIZAÇÃO E AGENTES COAGULANTES NA MICROESTRUTURA DE QUEIJO TIPO PRATO

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas alternativas na fabricação do queijo tipo prato. Avaliaram-se a influência do tipo de pasteurização pelos sistemas de aquecimento indireto *high temperature short time* (HTST) e injeção direta de vapor (IDV) e da utilização de duas diferentes enzimas coagulantes na fabricação destes queijos. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial 2 x 2 x 5 inteiramente casualizado, sendo dois sistemas de pasteurização (HTST e IDV), duas enzimas coagulantes e três períodos de maturação (1, 30 e 60 dias), com três repetições (fabricações). As enzimas coagulantes estudadas foram coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina, obtida por fermentação (coalho genético). Os queijos foram avaliados quanto à microestrutura com 1, 30 e 60 dias de armazenamento refrigerado, a 12 °C, por meio de microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de energia dispersiva por raios X. O estudo indicou que as diferentes alternativas avaliadas (diferentes tipos de pasteurização e diferentes enzimas coagulantes) tiveram efeitos importantes sobre as características de microestrutura e espectroscopia de energia dispersiva por raios X. Foi possível observar os diferentes comportamentos da matriz proteica, entre os tratamentos analisados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV); identificar a presença de cristais (inclusão cristalina), mesmo no primeiro tempo de maturação, e de matriz proteica, glóbulos de gordura e cultura lática, pela microscopia eletrônica de transmissão, além de observar as diferentes composições dos principais minerais do queijo.

Palavras-chave: queijo de massa semicozida, injeção direta de vapor, HTST, enzimas coagulantes, microscopia eletrônica, microanálise de raios X

ABSTRACT

In this work, alternatives to the making of prato-type cheese were evaluated. The influence of the sort of pasteurization by the systems of indirect heating *high temperature short time* (HTST) and direct steam injection (IDV) and of the use of two different clotting enzymes in the making of these cheeses were determined. The utilized experimental design in the experiment was a completely randomized 2 x 2 x 3 factorial, that is, two pasteurization systems (HTST and IDV), two clotting enzymes and three maturation periods (1, 30 and 60 days), with three replications (makings). The studied clotting enzymes were rennet (20% chymosin and 80% pepsin) and chymosin, obtained by fermentation (genetic rennet). The cheeses were evaluated as to the microstructure at 1, 30 and 60 days' storage refrigerated at 12 °C, by means of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and X-ray energy dispersive spectroscopy. The study pointed out that the different alternatives evaluated (different sorts of pasteurization and different clotting enzymes) had important effects upon the characteristics of microstructure and X-ray energy dispersive spectroscopy. It was possible to observe the different behaviors of the protein network, among the treatments surveyed by the scanning electron microscopy (MEV); identify the presence of crystals (crystalline inclusion), even in the same maturation time and of protein network, fat globules and lactic culture, by the transmission scanning microscopy, in addition to observing the different compositions of the main minerals of the cheese.

Key words: prato-type cheese, direct steam injection, HTST, clotting enzymes, electron microscopy, X-ray microanalysis

1 INTRODUÇÃO

A microscopia é, hoje, uma técnica bem estabelecida com propriedades estruturais e microestruturais para estudos de produtos lácteos. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) têm sido adotadas como ferramentas adicionais para avaliar a qualidade e/ou os defeitos em queijos maturados. Esta técnica permite a visualização direta da estrutura do queijo e também é empregada como uma ferramenta poderosa para entender os relacionamentos entre as propriedades estruturais com outras propriedades físico-químicas.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) baseia-se na varredura da superfície da amostra, tornando possível obter imagens diretas dos átomos presentes nessa superfície. Tendo acoplado ao MEV um detector de dispersão de raios X (EDS), pode-se, além da geração das imagens, determinar a composição química do espécime em estudo (FABRIS et al., 2009). No Brasil, as aplicações de técnicas de MEV e EDS, em estudos químicos e mineralógicos em produtos lácteos/queijos, ainda são pouco exploradas.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite observar e caracterizar microestruturas internas de materiais com alta resolução, enquanto que a MEV é aplicada para observar a superfície de amostras (HINKS, 2009), podendo-se destacar também a possibilidade para realizar conjuntamente a microanálise de raios X.

Barros et al. (2011) observaram, em queijo parmesão, que a evolução da maturação também pode ser observada por alterações na microestrutura. Presença de inclusões cristalinas de morfotipo oval, interação entre as culturas starter e os glóbulos de gordura, debris e uma matriz densa foram observadas no final da maturação, em um período de 180 dias.

Muitas das propriedades do queijo, tais como a textura e o sabor, são

determinadas pelo arranjo espacial de seus componentes, incluindo partículas de caseína, que formam uma matriz proteica, glóbulos de gordura, dispersa água e minerais (EVERETT, 2007). O arranjo destes componentes na escala micrométrica é conhecido como a microestrutura do queijo.

Em queijos, esta microestrutura desenvolve-se quando o leite coagula para formar um gel, geralmente por meio da ação enzimática da quimosina. As alterações nas condições de processo ou a escolha de ingredientes podem alterar a microestrutura do gel, da coalhada e do queijo e, assim, consideravelmente as propriedades funcionais do produto final.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem evoluído na direção de dar informações não apenas ultraestruturais, mas também analíticas, das amostras estudadas. Contando, ainda, com um detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) com raios X e microanálise de raios X, pode-se, além de gerar imagens, determinar a composição química do espécime em estudo, proporcionando a detecção de elementos de interesse. A microanálise de raios X é uma técnica que tem permitido a análise qualitativa e quantitativa de amostras, permitindo mensurar quase todos os elementos de interesse, ou seja, pode-se detectar o elemento e determinar a localização deste na amostra estudada.

Minerais, ou elementos essenciais maiores, são elementos inorgânicos amplamente distribuídos na natureza e que realizam uma variedade expressiva de funções metabólicas no organismo humano. Eles são necessários em quantidades variáveis, por causa da quantidade relativamente grande dos principais minerais (Ca, Mg, Na, K, P) e da quantidade excessivamente pequena dos elementos traço nos alimentos. Dessa maneira, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologias que permitam verificar a qualidade da composição mineral desse alimento (queijo), do ponto de vista nutricional e toxicológico.

Os níveis de minerais essenciais e oligoelementos que ocorrem no leite

de vaca dependem de certo número de fatores, tais como as características genéticas, o estágio de lactação, as condições ambientais e os tipos de pastagem. Os níveis em que eles estão presentes em produtos lácteos dependem também do tratamento tecnológico destes produtos. Particularmente durante a maturação do queijo, alguns dos sais minerais podem migrar, a partir da parte central, em direção à camada externa do bloco de queijo, ou vice-versa, dependendo do pH, causando mudanças nas concentrações dos mesmos elementos no produto final (MORENO-ROJAS et al., 1994). Portanto, o valor nutricional de alguns produtos lácteos pode ser diferente em várias fases de maturação.

Atualmente, existe um número limitado de estudos na microestrutura de amostras intermediárias de queijo que contam, ainda, com um detector de espectroscopia de energia dispersiva com raios X. Assim, no presente trabalho, objetivou-se identificar e caracterizar a microestrutura das amostras de queijo tipo prato, por meio da MEV/EDS e também por microscopia eletrônica de transmissão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.5 Caracterização dos queijos tipo prato

2.5.1 Fabricação dos queijos

A fabricação dos queijos foi realizada conforme metodologia adotada para o capítulo 2.

2.2 Microestrutura dos queijos

2.2.1 Amostragem do queijo - Estudos com microscopia

As amostras de queijos preparadas foram fixadas em Karnovsky (modificado) e mantidas em câmara fria (4 °C), por um período mínimo de 24 horas. A preparação e a observação das amostras de queijo preparadas foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), Departamento de Fitopatologia (DFP), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Seguiu-se o protocolo do LME, para posterior análise em Microscópio eletrônico de varredura/espectroscopia de energia dispersiva por raios X (MEV/EDS) e microscópio eletrônico de transmissão (MET).

O acompanhamento da maturação para as análises de caracterização da microestrutura das amostras de queijo foi conduzido após D, D₊₃₀ e D₊₆₀ dias, sendo D o dia de fabricação, com armazenamento refrigerado, a 12 °C.

2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva por raios-X

As amostras pré-fixadas foram transferidas para glicerol, por um período de 30 minutos e, posteriormente, foram efetuados os cortes em nitrogênio líquido (criofratura). As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (25%, 50%, 75%, 90%, 95% e 100%, por 10 minutos, esta última por duas vezes) sendo, em seguida, levadas para o aparelho de ponto crítico modelo Baltec CPD 030, no qual se completou a secagem. As amostras foram montadas em stubs, metalizadas no aparelho evaporador de carbono modelo Baltec CED 020, observadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO EVO 40 XVP Zeiss e qualificadas/quantificadas, quanto à composição química, por espectroscopia de energia dispersiva por raios X, no aparelho Quantax XFlash 5010 Bruker.

2.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras pré-fixadas foram cortadas em pedaços de 1 mm², os quais foram lavados em tampão fosfato, por três vezes, durante 10 minutos; pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, por 2 horas; lavados, por três vezes, em água destilada e transferidos para solução a 0,5% de acetato de uranila, durante 12 horas, a 4 °C. Após este período, foram novamente lavadas em água destilada, por três vezes e desidratadas em gradiente de acetona 25%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90% e 95%, por 30 minutos cada e 100%, por três vezes de 30 minutos cada. Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente da resina Spurr:Acetona, nas seguintes concentrações: 1:3, por 12 horas; 1:2, por 24 horas; 1:1, por 24 horas; 2:1, por 24 horas e duas vezes com resina pura (100%), por 24 horas cada, sendo os espécimes posteriormente montados em moldes de silicone e colocados para polimerizar em estufa, a 70 °C, por 8 horas.

Após o período de polimerização, os blocos de resina contendo a amostra passaram por um processo de desbaste, para retirar o excesso de resina

e, em seguida, foram cortados em aparelho ultramicrotomo modelo Leica MT-Ultracut. Os cortes obtidos foram coletados em telas de cobre, contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2%, por 3 minutos cada. Após a secagem, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET), modelo Zeiss EM 109.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da estrutura dos queijos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O efeito dos diferentes sistemas de pasteurização e utilização de diferentes enzimas coagulantes na microestrutura dos queijos fabricados com os diferentes tratamentos está representado nas Figuras 1, 2 e 3. Nos diversos tratamentos, pode observar-se uma estrutura semelhante a uma esponja, com uma rede tridimensional contínua e densa, denominada matriz proteica, que apresenta volumes esvaziados de diferentes diâmetros. A perda da aparência fibrosa e o desenvolvimento de uma matriz proteica densa, homogênea e compacta são as principais mudanças estruturais ocorridas durante a maturação. Estas mudanças podem ocorrer devido à evaporação da água.

Algumas diferenças entre os queijos podem ser visualmente observadas em imagens obtidas por MEV (Figuras 1, 2 e 3). Cada variedade de queijo tem a sua característica estrutural e as características que refletem as mudanças químicas e biológicas sofridas pelos queijos.

Os queijos do tipo prato referentes aos tratamentos T1 (leite pasteurizado por IDV e agente coagulante bovino) e T3 (leite pasteurizado por pasteurização rápida, HTST, e agente coagulante bovino) apresentaram uma rede proteica um pouco menos compacta e mais aberta, indicando que estariam com uma proteólise mais avançada que os queijos dos tratamentos T2 (leite pasteurizado por IDV e agente coagulante quimosina) e T4 (leite pasteurizado por pasteurização rápida, HTST, e agente coagulante quimosina), como mostrado na Figura 1. As diferenças na microestrutura observada nos queijos fabricados com o uso de coalho bovino como agente coagulante devem-se, provavelmente, à ação adicional do sistema proteolítico dessas enzimas sobre a matriz de caseína.

Observa-se, por meio da MEV (Figuras 1, 2 e 3), a microestrutura dos queijos tipo prato dos diferentes tratamentos analisados e que, em geral, os materiais proteicos na matriz estavam agregados e fundidos em estruturas de diversos tamanhos, formando uma compacta fase contínua. Como a formação desta estrutura particular não é muito conhecida, é plausível que seja resultado da ação da atividade da quimosina. As aberturas na rede proteica foram esféricas, rugosas e irregulares, nas formas e nos tamanhos. Essas aberturas estavam situadas na matriz proteica, próximas umas das outras, como discretas cavidades, indicando que a gordura ficou aprisionada na rede e não fazia parte dela.

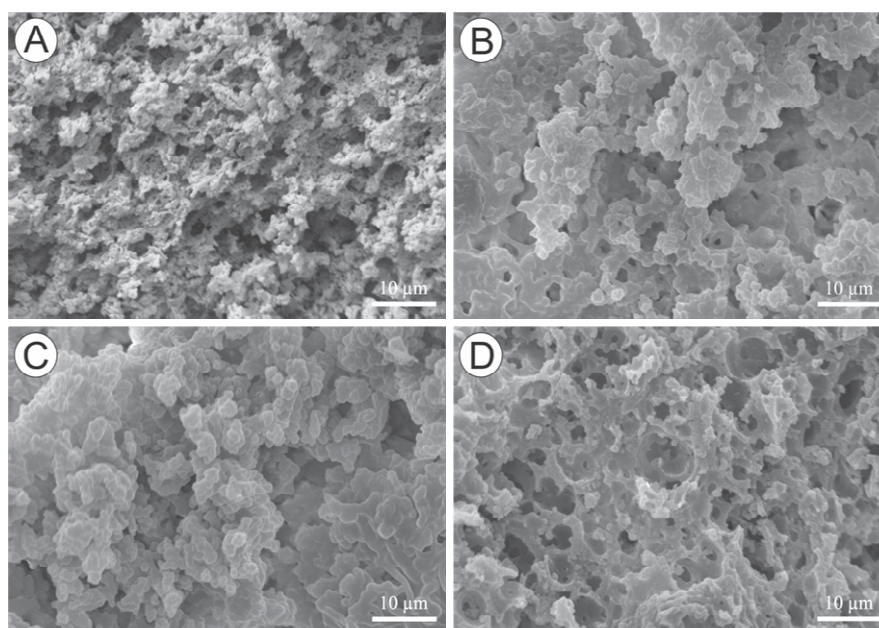


Figura 1 Eletromicrografias de varredura da microestrutura de queijo prato, no 1º dia de maturação (tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com a adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

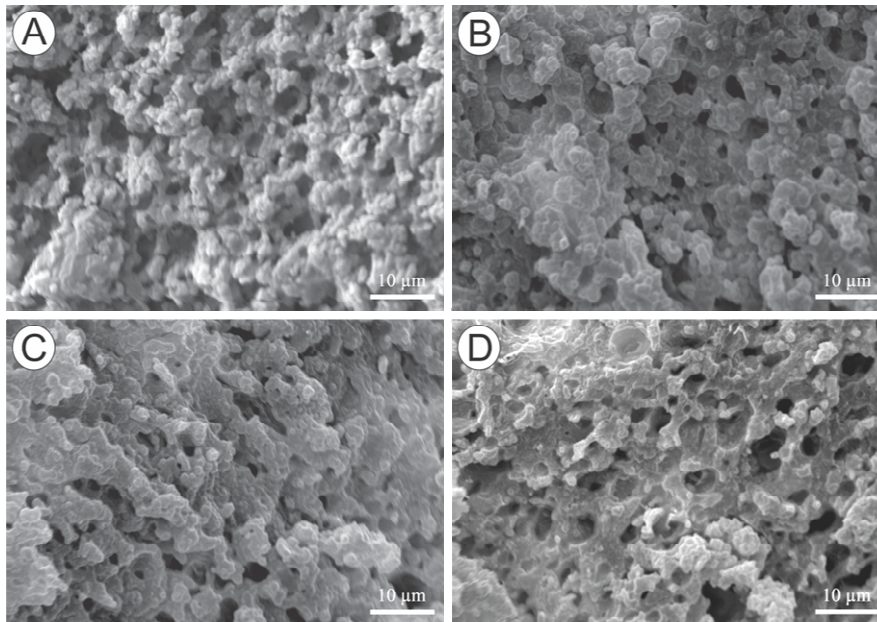


Figura 2 Eletromicrografias de varredura da microestrutura de queijo prato no 30º dia de maturação (tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com a adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

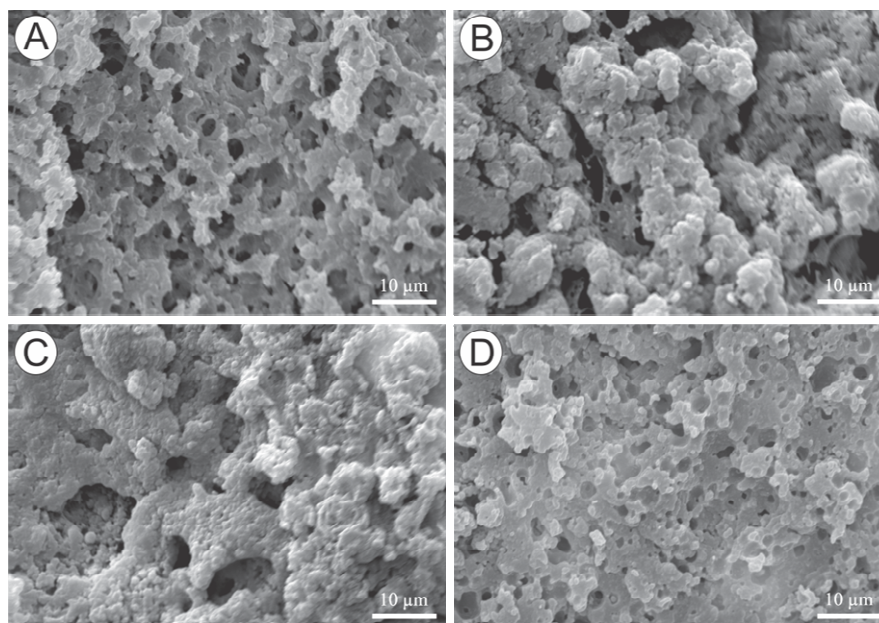


Figura 3 Eletromicrografias de varredura da microestrutura de queijo prato no 60º dia de maturação (tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com a adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um dos procedimentos analíticos físico-químicos utilizados para evidenciar a distribuição dos espaços dos componentes corpusculares e a estrutura global dos ingredientes e produtos acabados. Dados obtidos em estudos estruturais facilitam a compreensão das propriedades sensoriais e ajudam a desenvolver novos produtos com propriedades desejadas.

Mudanças estruturais nos componentes básicos durante os processos industriais têm sido estudadas por meio da MEV. Os defeitos e as diferenças nas estruturas dos produtos lácteos tradicionais podem ser explicados por causas,

tais como presença de espuma no leite, presença de ingredientes incomuns (polissacarídeos bacterianos, concentrado proteico de soro) e alterações nos procedimentos industriais, como alteração de temperatura, ultrafiltração ou microfiltração (KALAB, 1993).

Todo processo de fabricação de queijos contribui para desenvolver uma matriz distinta e mais complexa do que a matéria-prima de partida (leite). Durante a coagulação, as enzimas do coalho quebram a k-caseína, que está presente na superfície das micelas de caseínas. Depois de tal passo químico, a aglomeração física toma lugar e dá origem a uma proteína mais uniforme em massa, que, espontaneamente, libera o soro de leite. O processo de compactação (chamado sinérese) pode ser levado um passo além, por aplicação de pressão externa para a coalhada. Por outro lado, os glóbulos de gordura, normalmente, conservam as suas membranas e, assim, são observadas como entidades individuais, as quais podem formar aglomerados que são aprisionados no interior da assim formada, matriz tridimensional.

Eino et al. (1976) compararam a massa de queijos cheddar obtidos de diferentes agentes coagulantes (vitelo, pepsina bovina e pepsina suína), concluindo que massa obtida de pepsina bovina e pepsina suína formaram uma rede fibrosa e mais aberta. Concluíram que os diferentes coagulantes não somente causam degradação proteica, mas também conferem características estruturais à rede proteica específica de cada enzima.

3.2 Determinação de minerais por espectroscopia de energia dispersiva por raios X

Na Tabela 1 observa-se o teor, em massa, dos elementos quantificados, especialmente o cálcio e o fósforo, que têm grande significância para a estrutura da massa de queijos e a composição das micelas de caseínas.

Tabela 1 Qualificação e quantificação dos elementos encontrados nas amostras de queijo de quatro tratamentos e três tempos de maturação, por meio da análise por EDS.

Tempo	Elemento	NA ⁽¹⁾	Tratamentos			
			T1	T2	T3	T4
			m ⁽²⁾ (%)			
T ₀	Oxigênio	8	44,10	43,62	45,14	48,34
	Fósforo	15	14,47	14,13	13,65	16,31
	Enxofre	16	11,26	9,93	12,37	11,99
	Cloro	17	3,91	6,01	6,34	-
	Cálcio	20	21,44	26,30	22,49	23,35
T ₃₀	Oxigênio	8	50,17	50,06	48,48	45,22
	Fósforo	15	16,03	15,75	16,88	13,53
	Enxofre	16	14,55	14,64	11,71	11,08
	Cloro	17	-	-	-	-
	Cálcio	20	19,25	19,54	22,90	24,97
T ₆₀	Oxigênio	8	52,37	48,06	49,92	50,33
	Fósforo	15	18,42	15,11	16,15	17,78
	Enxofre	16	15,42	14,04	15,52	13,34
	Cloro	17	-	3,94	3,82	-
	Cálcio	20	19,78	19,84	14,57	18,53

⁽¹⁾Número Atômico. ⁽²⁾Massa.

São encontrados, no leite, cerca de trinta a quarenta elementos minerais, a maioria deles em pequenas quantidades e de pequena importância na produção de queijos. Entretanto, o cálcio e o fósforo se concentram no queijo e desempenham papel fundamental na sua qualidade (SILVEIRA; ABREU, 2003). O leite e seus derivados são alimentos que se destacam pelo seu valor nutricional e, dentre eles, os queijos têm grande importância no cenário nacional de lácteos, chegando a ser fonte concentrada de nutrientes presentes no leite (matéria-prima).

Além de ser uma boa fonte de cálcio, o queijo também contém outros minerais, tais como magnésio e fósforo, em quantidades apreciáveis, contribuindo significativamente para a ingestão diária recomendada para esses elementos.

Os níveis de cálcio e fósforo no queijo podem ser definidos pela acidez da massa. Assim, o desenvolvimento da acidez, antes da drenagem do soro, é o principal fator da composição mineral do queijo. Alguns pesquisadores afirmam que, no queijo, o cálcio é perdido mais rapidamente do que o fósforo, com o abaixamento do pH do soro.

A fim de atingir mais informações sobre a composição química das amostras de queijo tipo prato, utilizamos a técnica de revestimento de carbono. O carbono, quando aplicado como uma camada fina, é um material transparente que permite observações ópticas de características internas. As vantagens deste método incluem alta estabilidade do feixe de elétrons, de alta resolução das imagens da amostra, e ampla profundidade de campo. Com este método, podem-se distinguir diferentes composições químicas entre os tratamentos que não podem ser observáveis utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) padrão com base em revestimento de ouro. Por se tratar de um queijo maturado, mudanças nas frações proteicas durante a proteólise podem influenciar o teor de minerais dos produtos finais.

Os valores obtidos para os elementos minerais principais mostram uma variabilidade importante durante o período de maturação, o que é característico dos queijos que sofrem o processo de maturação. Essa variabilidade está relacionada com a variação sazonal da produção de leite, o tipo de alimentação dos animais, a tecnologia de fabricação a qual se baseia, em muitos casos, na experiência do fabricante de queijo, que exerce uma empírica avaliação de fatores, tais como a acidez do leite, a temperatura, o tempo de coagulação, o pH, a drenagem e assim por diante.

É extremamente difícil apresentar valores médios de nutrientes para queijos como um todo devido às diferenças nos processos de fabricação e nos padrões de identidade. Mesmo dentro de uma variedade de queijo, variações no

tipo e na composição de leite, no processo, na estação do ano e na localidade podem levar a intensas flutuações na composição nutricional do produto final.

Os valores de cálcio e fósforo encontrados foram maiores do que os descritos por Fresno et al. (1995) e Sieber et al. (1994), para outros tipos de queijo fabricados com leite de vaca. No entanto, os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos obtidos no cacciocavallo (GATTUSO et al., 1996) ou tetilla (WALSER et al., 1999) e aos relatados por Cichoski et al. (2002), que observaram redução dos principais minerais, cálcio e fósforo, durante o período de maturação do queijo prato, os quais são responsáveis pela firmeza do coágulo e a estrutura das micelas de caseína.

As alterações na concentração de cálcio dos quatro tratamentos estudados apresentaram comportamento de decréscimo nos primeiros 30 dias, seguido de redução nos 30 dias subsequentes, até o final do período de maturação, em todos os tratamentos analisados. O teor de P parece estar refletido na mesma tendência de decaimento ao longo do tempo. Os maiores teores de cálcio foram observados nos tratamentos referentes à enzima coagulante quimosina (T2 e T4), em todos os períodos de maturação analisados.

Há um fator que pode causar dificuldades na determinação de cálcio em amostras de leite e derivados. A explicação para este fato pode ser a forte associação do cálcio com a caseína, pelo maior conteúdo de gordura presente nas amostras de queijos.

Nas Figuras 4, 5 e 6 estão representados os gráficos, obtidos por meio da leitura em EDS, que confirmam a presença de Ca e P, e de outros elementos, nas amostras de queijos, localizados por meio do MEV.

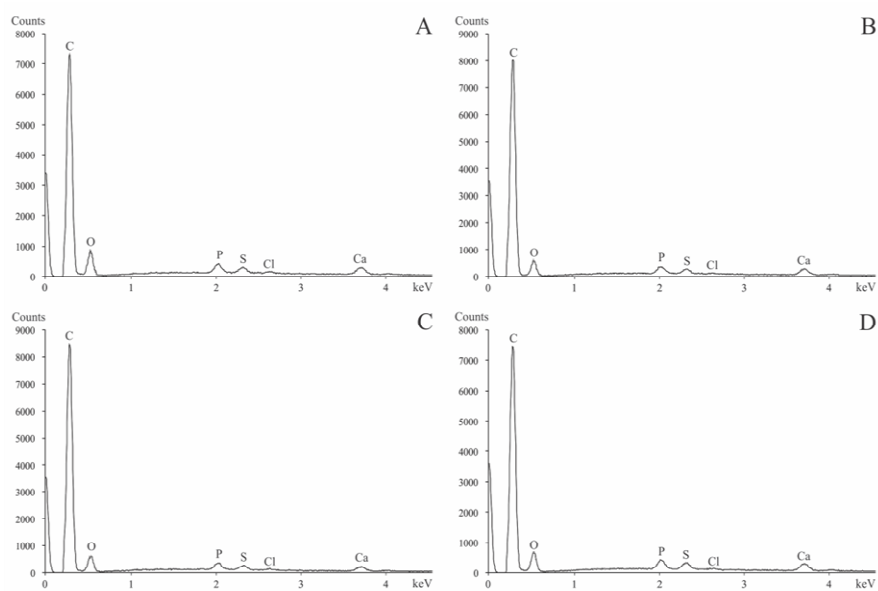


Figura 4 Gráfico com a identificação, por meio do EDS, dos elementos encontrados nas amostras de queijo tipo prato, no primeiro dia de maturação. (Tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor; com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

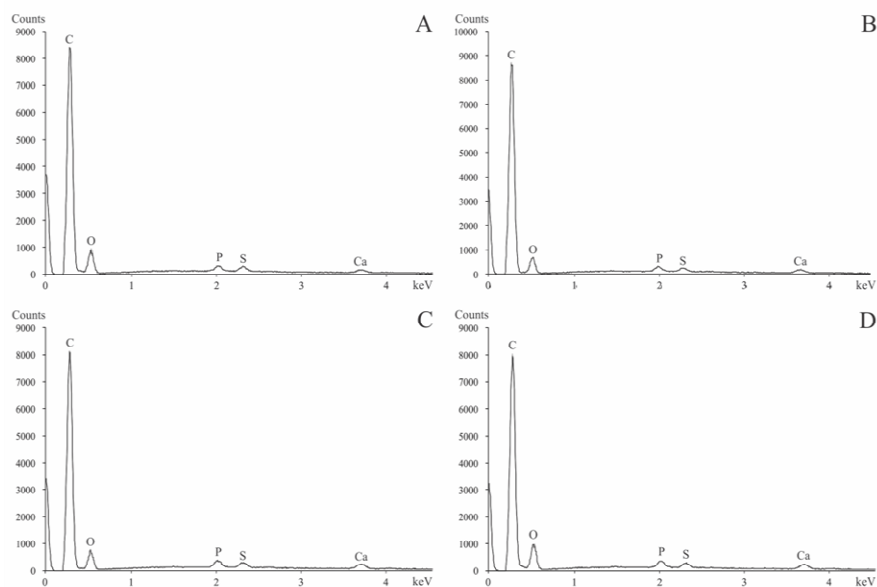


Figura 5 Gráfico com a identificação, por meio do EDS, dos elementos encontrados nas amostras de queijo tipo prato no 30º dia de maturação (Tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

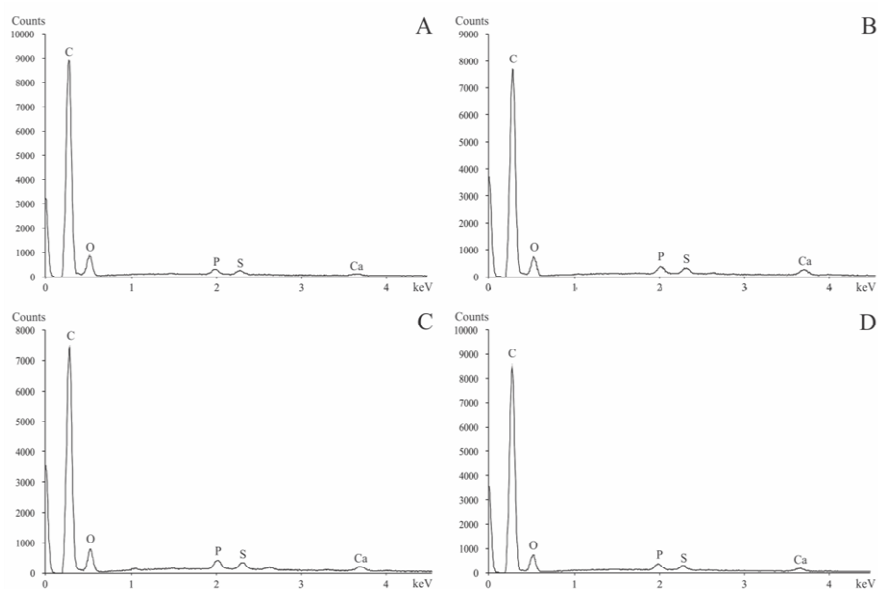


Figura 6 Gráfico com a identificação, por meio do EDS, dos elementos encontrados nas amostras de queijo tipo prato no 60º dia de maturação (Tratamento A = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); C = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); D = leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

Na Figura 7 estão representados, apenas para fins ilustrativos, os elementos quantificados (minerais) e qualificados (elementos-traço).

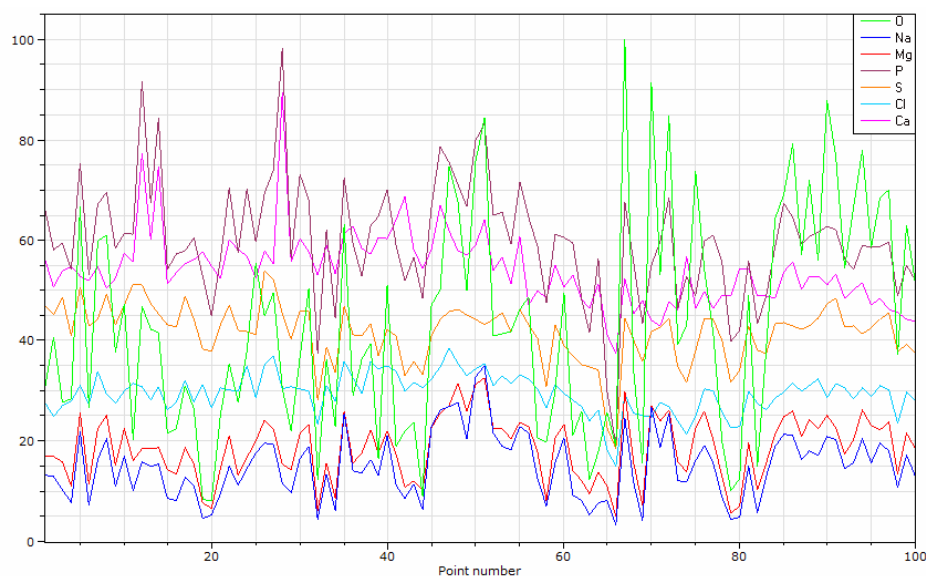


Figura 7 Principais elementos qualificados nas amostras de queijo tipo prato.

3.3 Análise da estrutura dos queijos por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A caracterização da microestrutura dos queijos por microscopia eletrônica de transmissão pode ser observada na Figura 7. O estudo qualitativo das eletromicrografias revela maior distribuição de proteínas e gorduras, seguida da incidência de bactérias da cultura láctica presente na massa do queijo. Foram observados, na microestrutura das amostras de queijos dos diversos tratamentos, matriz proteica (MP), glóbulos de gordura (GG) individualizados e de diferentes tamanhos e formas, cultura láctica (CL) e formação de bolsões ou inclusões cristalinas (IC), que são formadas de cristais de sais de cálcio, particularmente fosfato e lactatos.

Com a diminuição do teor de gordura, os queijos tendem a apresentar uma matriz proteica mais densa que os queijos integrais. Os glóbulos de gordura,

representados por volumes com diâmetro menor, encontram-se uniformemente distribuídos na matriz. Como não houve diferença significativa entre o teor de gordura dos tratamentos, esse aumento, provavelmente, foi resultado de alguma alteração sofrida durante o processamento, que pode ter causado injúrias na membrana lipoproteica dos glóbulos, rompendo a mesma, provocando a coalescência dos glóbulos de gordura.

Os resultados do percentual de gordura apresentados no presente estudo foram menores, quando comparados com um queijo de grande consumo nacional, como, por exemplo, o queijo tipo prato, caracterizado por ser um queijo de massa semicozida.

Observa-se que, em todos os processamentos, a matriz proteica tornou-se mais densa durante o período de maturação. Foram observados, nos diferentes tratamentos, a perda da aparência fibrosa e o desenvolvimento de uma matriz proteica densa, homogênea e compacta, que são as principais mudanças estruturais ocorridas durante a maturação. Estas mudanças podem ocorrer devido à evaporação da água.

O comportamento denso e compacto da matriz proteica foi observado por diversos autores (KHEADR et al., 2002; MERRIL et al., 1996). Kheadr et al. (2002) observaram que queijos cheddar fabricados com leite pressurizado com teor integral e baixo teor de gordura exibiram uma matriz proteica compacta, constituída de pequenas micelas de caseína. Merrill et al. (1996) observaram partículas de caseína densas e bem desenvolvidas em queijo mussarela com teor reduzido de gordura. Silva (2006), em queijo prato com teor reduzido de gordura, adicionado de *Lactobacillus casei*, também observou uma matriz proteica densa e compacta.

Foi possível observar a presença de inclusões cristalinas no queijo tipo prato, no primeiro e no segundo tratamentos, no primeiro período de maturação, sendo identificadas como uma variedade de sais de cálcio, particularmente

fosfato e lactatos. A localização dos sais nos espaços entre a gordura e fases de caseína no queijo sugere que eles se desenvolvam a partir de bolsões de soro residual na massa. Bottazzi, Battistotti e Bianchi (1982) encontraram cristais semelhantes em queijo tipo grana e confirmaram a presença de cálcio e fósforo, utilizando a microanálise de raios X.

Em queijos maturados por longos períodos, é comum serem detectadas culturas lácticas lisadas, sendo visível a formação de debris, que se caracterizam pela formação de dobras na célula morta, não absorvidas pela matriz do queijo (PAGALA et al., 2002). Ainda, nesses queijos, também é constante a incidência de cristais de fosfato de cálcio, lactato de cálcio e tirosinato de cálcio. As diferentes interações da lactose e outros componentes distribuídos nos queijos apresentam elevada complexidade e podem afetar a qualidade do produto final (PERKO, 2002). Em contrapartida, Furtado (2005) menciona que a presença de cristais de tirosina reflete o aspecto positivo das reações proteolíticas durante o período de estocagem. A ultraestrutura do queijo grana, maturado por 14 meses, foi estudada por Bottazzi, Battistotti e Bianchi (1982), a partir da análise em microscópio eletrônico de varredura e raios X. Inclusões cristalinas de fosfato de cálcio, apresentando de 10 a 20 nm, foram encontradas em queijos maturados por 8 e 10 meses. Nas amostras maturadas por 10 meses, foram encontrados de 30 a 35 cristais^{m⁻²}. O surgimento de cristais é uma característica do queijo grana, e eles podem ser encontrados desde dois dias até dois meses de maturação.

Segundo Mazerolles et al. (2001), a análise detalhada da microestrutura do queijo, especialmente das proteínas e gorduras, bem como as interações entre esses constituintes durante e após a produção do queijo, pode fornecer informações determinantes sobre a qualidade do produto final.

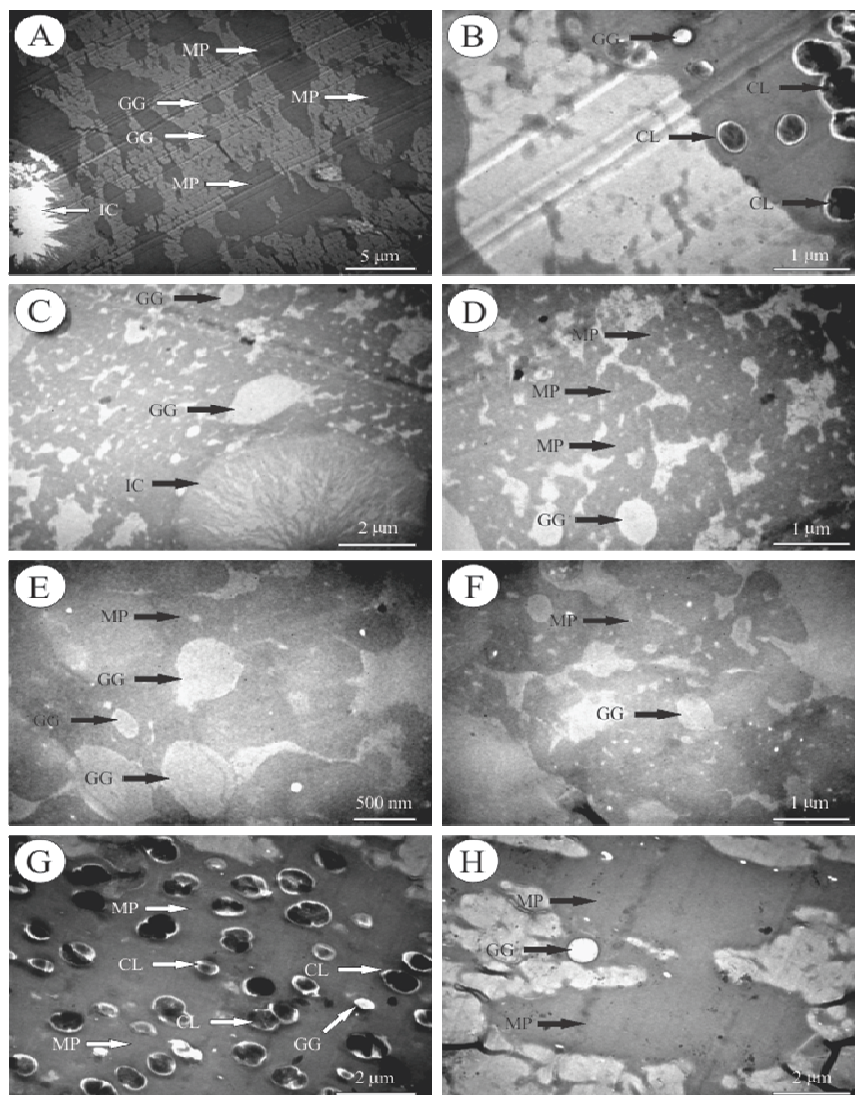


Figura 7 Eletromicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de amostras de queijo tipo prato no primeiro dia de maturação. MP (matriz proteica), GG (glóbulos de gordura), CL (cultura láctica), IC (inclusão cristalina). A e B = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); C e D = leite pasteurizado por injeção direta de vapor, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina); E e F = leite pasteurizado pelo sistema *high temperature short time* (HTST), ou sistema de placas, com adição de coagulante coalho bovino (Abomasum®); G e H = leite pasteurizado pelo sistema HTST, ou sistema de placas, com adição de coagulante quimosina, obtido por fermentação (Albamax®, da Sacco 100% quimosina).

3 CONCLUSÃO

O estudo indicou que as diferentes alternativas avaliadas (diferentes tipos de pasteurização e diferentes enzimas coagulantes) tiveram efeitos importantes sobre as características de microestrutura e espectroscopia de energia dispersiva por raios X.

A análise da microestrutura demonstra a presença de cristais, debris e a interação entre as culturas starter e os glóbulos de gordura. No final da maturação, a matriz de caseína apresentava-se densa e compacta.

A evolução da maturação também pode ser observada por alterações na microestrutura. A presença de inclusões cristalinas de morfotipo oval, de culturas láticas do fermento mesofílico e os glóbulos de gordura e uma matriz densa foram observadas nas amostras de queijo.

Foi possível observar os diferentes comportamentos da matriz proteica pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), identificar a presença de cristais (inclusão cristalina), mesmo no primeiro tempo de maturação, e observar as diferentes composições dos principais minerais do queijo.

REFERÊNCIAS

- BARROS, J. C. A. et al. Queijo parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 285-294, abr./jun. 2011.
- BOTTAZZI, V.; BATTISTOTTI, B.; BIANCHI, F. The microscopic crystalline inclusions in Grana cheese and their X-ray microanalysis. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 37, n. 10, p. 577-580, 1982.
- CICHOSCKI, A. J. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4, p. 329-336, 2002.
- EINO, M. F. et al. A comparison of microstructures of Cheddar cheese curd manufactured with calf rennet, bovine pepsin and porcine pepsin. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 43, p. 113-115, 1976.
- EVERETT, D. W. Microstructure of natural cheese. In: TAMIME, A. Y. (Ed.). **Structure of dairy products**. London: Blackwell, 2007. p. 170-201.
- FABRIS, J. D. et al. Métodos físicos de análises em mineralogia do solo. In: ALLEONI, L. R. F.; MELO, V. de F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo**: livro-texto. Viçosa, MG: SBCS, 2009. cap. 10.
- FRESNO, J. M. et al. Mineral content of some Spanish cheese varieties: differentiation by source of milk and by variety from their content of main and trace elements. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 69, n. 3, p. 339-345, Nov. 1995.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Metha, 2005. 200 p.
- GATTUSO, A. M. et al. Contenuto in elementi minerali di formaggi siciliani a pasta dura freschi e stagionati: aspetti compositivi e nutrizionali. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 47, n. 1, p. 35-48, 1996.
- HINKS, J. A. A review of transmission electron microscopes with in situ ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 267, n. 23/24, p. 3652-3662, Dec. 2009.

KALAB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. **Food Structure**, Chicago, v. 12, p. 95-114, 1993.

KHEADR, E. E. et al. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 5, p. 435-446, 2002.

MAZEROLLES, G. et al. Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 509-527, 2001.

MERRIL, R. K. et al. Microstructure and physical properties of a reduced fat Mozzarella cheese made using *Lactobacillus caseis* sp. caseiadjunct culture. **Lebensmittel Winssenschaft and Technologie**, London, v. 29, n. 8, p. 721-728, Dec. 1996.

MORENO-ROJAS, R. et al. Calcium, magnesium, manganese, sodium and potassium variations in manchego-type cheese during ripening. **Food Chemistry**, London, v. 50, n. 327, p. 373-378, 1994.

PAGALA, V. R. et al. Cellular localization of D-lactate dehydrogenase and NADH oxidase from *Archaeoglobus fulgidus*. **Archaea**, New York, v. 1, n. 2, p. 95-104, 2002.

PERKO, B. Lactose fermentation at Camembert, made by classic and stabilized technology. **Mljekarstvo**, Zagreb, v. 52, n. 1, p. 5-18, 2002.

SIEBER, R. et al. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung schweizerischer konsumreifer weich- und halbharter Käse. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Bern, v. 85, p. 366-381, 1994.

WALSER, N. et al. Evolution of the mineral content in Tetilla D.O. cheese during ripening. In: ENCONTRO DE QUIMICA DE ALIMENTOS, 4., 1999, Coimbra. **Proceedings...** Coimbra: SQA, 1999. p. 212-214.