

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EFEITO DO pH NA QUALIDADE DO QUEIJO DE MANTEIGA

ANA PATRÍCIA NOGUEIRA ALMEIDA

Engenheira de Alimentos

PROF^a. DR^a. WALKIRIA HANADA VIOTTO

Orientadora

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

Campinas - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

AL64e	Almeida, Ana Patrícia Nogueira Efeito do pH na qualidade do queijo de manteiga / Ana Patrícia Nogueira Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Walkiria Hanada Viotto Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1. Emulsificação. 2. Queijo. 3. Microestrutura. 4. Cálcio. 5. Qualidade. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
-------	--

(ckn/fea)

Titulo em inglês: The effect of pH on *queijo de manteiga* quality

Palavras-chave em inglês (Keywords): Emulsification, Cheese, Microstructure,
Calcium, Quality

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto
Renata Tieko Nassu
Clarissa Reschke da Cunha
Renato Grimaldi

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto

Universidade Estadual de Campinas

Orientadora

Dra. Renata Tiekko Nassu

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Membro da banca

Dra. Clarissa Reschke da Cunha

Membro da banca

Dr. Renato Grimaldi

Universidade Estadual de Campinas

Membro da banca

Dedico este trabalho

Ao amor da minha vida, Mário Almeida Neto, pelo amor incondicional dedicado a mim durante doze anos da minha existência e que seja eterno, enquanto eu respirar.

Agradeço o carinho, cumplicidade, paciência, ensinamentos, apoio, compreensão e incentivo, em todos os momentos, e principalmente nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e pela proteção dada a mim a cada dia.

À minha família, especialmente aos meus pais Cibele e José Sólon (*In memoriam*) pelo apoio e amor, que me possibilitaram chegar tão longe.

Ao meu querido esposo Mário Neto

À Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca Renata T. Nassu, Clarissa R. da Cunha e Renato Grimaldi, pelas correções, sugestões e comentários sempre pertinentes.

À Bete, técnica do Laboratório de Leite, que tornou meu trabalho melhor, através do seu apoio técnico e amizade.

À Renata, técnica do Laboratório de Instrumentação, pela a colaboração na análise de perfil de textura e cor do queijo de manteiga.

À Alessandra , técnica do Laboratório de Cereais, pelo apoio técnico e amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Óleos e Gorduras, especialmente Rosana, Priscila e Renato pelo apoio técnico nas análises da manteiga de garrafa e lipólise do queijo de manteiga.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp. Em especial a técnica Adriane pela colaboração na análise de microscopia eletrônica do queijo de manteiga.

Ao Cosme, secretário da pós-graduação e aos funcionários da Biblioteca da FEA, especialmente à Creusa Nomura, sempre muito prestativa.

À Clarissa R. da Cunha, a quem tenho admiração pela competência nos trabalhos que desempenha, pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

Às amigas do coração que foram essenciais para a realização deste trabalho: Mariana Macchione, Mariana Kikuchi, Marina Silva, Luciene Nishi, Renata Perez, Luciana Esper, Emmanuelle Pilarski, Leilane Costa e Pri Mamede, pela amizade sincera, companheirismo, agradável convivência e incentivo.

Aos queridos amigos que fiz no Departamento de Tecnologia de Alimentos durante estes anos de convivência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Queijos fundidos	3
2.2. Queijo de manteiga	3
2.2.1. Características físico-químicas e sensoriais	4
2.2.2. Aspectos tecnológicos de processamento do queijo de manteiga	5
2.2.2.1. Matéria-prima	5
2.2.2.2. Obtenção da massa	6
2.2.2.3. Dessoragem e desacidificação	7
2.2.2.4. Processo de fusão	7
2.2.2.5. Emprego de manteiga de garrafa	9
2.2.2.6. Enformagem, resfriamento, embalagem e armazenamento	10
2.2.2.7. Diagnóstico das condições de processamento	11
2.3. Mudanças físico-químicas induzidas pela acidificação do leite	13
2.4. Mecanismo de fusão e relação com o pH	14
2.5. Efeito do pH nas propriedades dos queijos	16
2.6. Mudanças que ocorrem durante o armazenamento dos queijos	18
2.6.1. Proteólise em queijos	19
2.6.2. Modificações na textura	21
2.6.3. Rancidez hidrolítica e lipólise em queijos	24
2.6.4. Rancidez oxidativa	24
2.6.5. Determinação de ácidos graxos livres e peróxidos	26

2.7. Microestrutura do queijo	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Matéria-prima	30
3.2. Fabricação da massa	30
3.3. Fabricação do queijo de manteiga	30
3.4. Preparo das amostras de queijo para análises	31
3.5. Análise de composição química	33
3.5.1. Análises do leite e manteiga de garrafa	33
3.5.2. Análises do queijo	33
3.6. Mudanças ocorridas durante o armazenamento refrigerado	34
3.6.1. Avaliação de pH e acidez titulável	34
3.6.2. Nitrogênio solúvel a pH 4,6 e em TCA 12%	34
3.6.3. Análise de perfil de textura	35
3.6.4. Avaliação da cor	35
3.6.5. Óleo livre	36
3.6.6. Capacidade de retenção de água	36
3.6.7. Ácidos graxos livres no queijo	37
3.6.8. Índice de peróxidos	37
3.7. Microestrutura e avaliação do tamanho das partículas de gordura	37
3.8. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Composição do leite	39
4.2. Caracterização da manteiga de garrafa	39
4.3. Composição média dos queijos	42
4.4. Microestrutura e avaliação do tamanho dos glóbulos de gordura	44
4.5. Mudanças ocorridas durante o armazenamento refrigerado	47
4.5.1. Evolução do pH e acidez titulável	47

4.5.2. Extensão e profundidade da proteólise	49
4.5.3. Lipólise e rancidez oxidativa	51
4.5.4. Avaliação da cor	53
4.5.5. Propriedades funcionais	56
4.5.1. Capacidade de retenção de água	56
4.5.2. Óleo livre	56
4.5.6. Perfil de Textura Instrumental	58
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de processamento de queijo de manteiga. Linha contínua: processamento em unidades de maior porte. Linha tracejada: processamento artesanal . 12
- Figura 2.** Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de cálcio e os peptídios de κ - caseína na superfície da micela 13
- Figura 3.** Fluxograma de fabricação do queijo de manteiga 32
- Figura 4.** Fotomicrografias do queijo de manteiga. O valor de pH está indicado no canto superior esquerdo de cada figura. Setas brancas: espaços ocupados pelos glóbulos de gordura; setas pretas: matriz protéica 46
- Figura 5.** Evolução do pH dos queijos (A), e da acidez titulável (B), durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C 48
- Figura 6.** Evolução da extensão da proteólise (% nitrogênio solúvel a pH 4,6/ % nitrogênio total x 100⁻¹) dos queijos com seis níveis de pH de fusão, durante 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C 50
- Figura 7.** Evolução da profundidade da proteólise (% nitrogênio solúvel em TCA 12%/ % nitrogênio total x 100⁻¹) dos queijos com seis níveis de pH de fusão, durante 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C 51
- Figura 8.** Evolução da formação de ácidos graxos livres (%) (A) e peróxidos (meq O₂/kg) (B) durante o armazenamento refrigerado a 4°C 52
- Figura 9.** Variação da luminosidade (valorL*) (A), intensidade da cor vermelho/verde (valor a*) (B) e intensidade da cor amarela (valor b*) (C) dos queijos armazenados durante 35 dias a 4°C 55

Figura 10. Evolução da formação de óleo livre dos queijos, durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C **58**

Figura 11. Gráficos obtidos para os parâmetros de dureza (A), adesividade (B), elasticidade (C), coesividade (D), gomosidade (E) e mastigabilidade (F) na avaliação do perfil de textura das amostras de queijo de manteiga, durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C **61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização físico-química do queijo de manteiga	4
Tabela 2. Composição média (e desvio padrão) do leite desnatado pasteurizado utilizado nos experimentos	39
Tabela 3. Características físico-químicas da manteiga de garrafa	39
Tabela 4. Perfil de sólidos da amostra de manteiga de garrafa	40
Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%m/m) da amostra de manteiga de garrafa ..	41
Tabela 6. Composição média (n = 3) dos queijos com seis níveis de pH	43
Tabela 7. Volume de leite adicionado à massa para desacidificação, temperatura de desacidificação, pH da massa e do soro após drenagem do soro	44
Tabela 8. Quadrados médios e probabilidades para evolução do pH e acidez titulável dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	47
Tabela 9. Quadrados médios e probabilidades para evolução da extensão de proteólise (NS pH 4,6) e profundidade de proteólise (NS TCA 12%) dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	50
Tabela 10. Quadrados médios e probabilidades para evolução formação de ácidos graxos livres (AGL) e índice de peróxidos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	52
Tabela 11. Quadrados médios e probabilidades para evolução da luminosidade (L*), densidade de cor vermelho-verde (a*) e densidade de cor amarela (b*) dos queijos	

durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	54
Tabela 12. Capacidade de retenção de água nos queijos ao longo do tempo	56
Tabela 13. Quadrados médios e probabilidades para evolução formação de óleo livre como porcentagem da gordura total dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	57
Tabela 14. Quadrados médios e probabilidades para evolução da dureza e adesividade dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	60
Tabela 15. Quadrados médios e probabilidades para evolução da elasticidade e coesividade dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	60
Tabela 16. Quadrados médios e probabilidades para evolução da gomosidade e mastigabilidade dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado	60

RESUMO

O queijo de manteiga, também conhecido como requeijão do norte, é produzido e bastante consumido na região Nordeste do Brasil. O queijo de manteiga apresenta exagerada formação de óleo livre, com liberação de gordura na superfície. Esse problema pode estar associado às variações de pH, já que este exerce papel fundamental no equilíbrio da concentração de cálcio solúvel e coloidal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH de fusão na composição, proteólise, lipólise, perfil de textura instrumental, cor, propriedades funcionais e microestrutura do queijo de manteiga. Foram avaliados seis níveis de pH de fusão (5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; e 5,6) e os ensaios foram realizados em triplicata. Os queijos foram analisados nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado (4°C) em relação a pH, acidez titulável, nitrogênio solúvel a pH 4,6 e em TCA 12%, teor de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, formação de óleo livre, textura instrumental e cor. A capacidade de retenção de água foi avaliada nos dias 1, 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado (4°C) e a microestrutura dos queijos foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura no 45º dia após a fabricação. A alteração do pH de fusão não afetou significativamente a composição, exceto os teores de cálcio e sal. O pH de fusão influenciou significativamente o pH dos queijos, a acidez titulável, a extensão de proteólise (NS em pH 4,6), a formação de óleo livre e a textura instrumental. A fusão na faixa de pH de 5,4 a 5,6 resultou em queijos com menor formação de óleo livre, dureza, elasticidade e mastigabilidade e maior extensão de proteólise. Os índices de proteólise aumentaram significativamente com o tempo de armazenamento, apesar do aumento ter sido pequeno em relação aos normalmente encontrados em outros tipos de queijos. Os queijos apresentaram uma matriz protéica contínua, permeada por glóbulos de gordura, cujo tamanho e distribuição variaram em função do pH de fusão. A matriz protéica apresentou-se mais compacta nos pHs de fusão da massa de 5,1 a 5,3, enquanto nos valores de pH de 5,4 a 5,6 a aparência foi mais esponjosa. O queijo fundido a pH 5,5 apresentou glóbulos de gordura de menor tamanho e mais uniformemente distribuídos na matriz protéica, evidenciando maior emulsificação da gordura pela caseína. O maior teor de cálcio micelar nesse pH sugere que deve haver uma quantidade ótima de cálcio ligado à caseína de modo a facilitar a sua ação como agente emulsificante.

ABSTRACT

Queijo de manteiga, also known as *requeijão do norte*, is usually produced and consumed in the Brazilian Northeastern region. This cheese is characterized by an excess of free oil formation, which is usually visible in its surface. Since pH has a fundamental role on the equilibrium of both soluble and colloidal calcium concentrations, this problem is probably associated to variations in pH. The objective of this work was to evaluate the influence of curd melting pH on the composition, proteolysis, lipolysis, instrumental texture, color, functional properties and microstructure of the *queijo de manteiga*. Six levels of curd melting pH were studied (5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5 e 5,6) and the experiments were carried out in triplicate. The cheeses were analyzed at 5, 20 and 35 days of refrigerated storage (4°C) in relation to pH, titratable acidity, soluble nitrogen in pH 4.6 and TCA 12%, free fatty acids, peroxide value, formation of free oil, instrumental texture and color. The water retention capacity was evaluated at 1, 5, 20 and 35 days of refrigerated storage and the cheeses microstructure was evaluated through scanning electronic microscopy 45° days after manufacture. Variation in curd melting pH did not affect the composition, except for calcium and salt content. The curd melting pH had a significant influence on cheese pH, titratable acidity, proteolysis extension, and lipolysis and texture. Curd melting in the pH range 5,4 to 5,6 resulted in cheese with lowest the free oil formation, hardness, elasticity and mastigability and proteolysis extension. The proteolysis increased significantly with time, although the increase was small in relation to those usually found for other types of cheese. The cheese presented a continuous protein matrix in which fat globules were entrapped, their size and distribution depending on pH of melting. The matrix protein was more compact when melting occurred in pH 5,1-5,3. However, the cheese appearance was spongy at pHs 5,4-5,6. The cheese which melted on pH 5,5 had small fat globules, uniformly distributed into the protein matrix, showing greater degree fat emulsification by casein. The greatest amount of micellar calcium in this pH suggests that a certain amount of calcium linked with casein was necessary to improve their action as an emulsifying agent.

1. INTRODUÇÃO

O queijo de manteiga é produzido e bastante consumido na região Nordeste do país, onde predomina a fabricação de queijos artesanais. A produção é feita de forma empírica, em fazendas, utilizando equipamentos e instalações geralmente inadequadas, fazendo valer a experiência do queijeiro, cuja técnica é passada de pai para filho.

A fabricação e a comercialização desse queijo são atividades importantes para a economia regional, sendo a principal fonte de renda de pequenos produtores estabelecidos principalmente na zona rural.

A indústria queijeira nordestina divide-se basicamente em dois segmentos: o das médias empresas, fiscalizadas por órgãos oficiais, e o das pequenas unidades artesanais, localizadas principalmente no meio rural, sem qualquer fiscalização. A produção do queijo de manteiga também ocorre em algumas indústrias regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura, porém em pequena escala quando comparado a manufatura de queijos como o minas, mussarela e prato (NASSU *et al.*, 2003).

A metodologia para a fabricação do queijo de manteiga é bastante diversificada. O processamento não se encontra bem definido, o que leva à falta de padronização do queijo comercializado. A falta de critérios de qualidade da matéria-prima e de técnicas de processamento definidas, permite que o mercado consumidor receba produtos de baixa qualidade tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos padrões de identidade do produto.

A legislação brasileira define o queijo de manteiga como o produto obtido mediante a coagulação ácida do leite, cuja massa é submetida a dessoragem, lavagem e fusão, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa. O queijo deve apresentar de 25 a 55% de gordura em base seca (GBS) e um teor máximo de umidade de 54,9% m/m, o que o classifica como um queijo de média a alta umidade. O largo espectro de variação na composição reflete a falta de identidade desse produto (BRASIL, 2001).

Existem poucos estudos sobre as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do queijo de manteiga. Falta de padronização no processamento; precariedade das condições higiênico-sanitárias na fabricação, comercialização de queijos sem embalagens e em temperatura ambiente, fraude por adição de amido e de óleo vegetal

em substituição à manteiga de garrafa são alguns dos problemas apontados por ESCUDERO (1979), VENTURA (1987) e NASSU *et al.* (2003). Isso resulta em queijos com rancificação acelerada, perda de umidade, defeitos de sabor e textura, afetando assim suas propriedades organolépticas.

Na fabricação do queijo de manteiga, a fusão é uma etapa fundamental, onde ocorre a cremificação da massa caseína e a emulsificação da manteiga de garrafa adicionada. O pH exerce papel fundamental no equilíbrio da concentração de cálcio solúvel e cálcio coloidal. Através do ajuste adequado do pH, a gordura incorporada à massa é emulsificada pela caseína, devido à remoção parcial do cálcio coloidal da matriz protéica.

Um defeito perceptível nesse queijo é a exagerada formação de óleo livre, com liberação de gordura na superfície, e a presença de gordura coalescida, que forma pequenas poças no interior do queijo, refletindo uma emulsificação incompleta da gordura durante o processo de fabricação. Esse defeito pode estar associado às variações de pH do produto. Tal problema reflete diretamente na qualidade do queijo de manteiga, podendo afetar a aceitação do consumidor em relação à sua aparência.

A estabilidade e as características da emulsão dependem do pH, que altera o equilíbrio iônico e a hidratação da caseína (BERGER *et al.*, 1989).

Não há na literatura nenhum estudo sobre o efeito do pH sobre características de qualidade do queijo de manteiga. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito do pH sobre as características de fusão do queijo e a capacidade da caseína em atuar como emulsificante natural através do acompanhamento das suas características físico-químicas e funcionais. Para tanto, foi determinado o tamanho do glóbulo de gordura e a formação de óleo livre no queijo de manteiga. Além disso, foi avaliado o efeito do pH na composição, textura e microestrutura do queijo. Por fim, os dados de pH foram correlacionados com os atributos de qualidade do queijo de manteiga.

O conhecimento da capacidade de emulsificação da caseína em função do pH irá contribuir para um maior entendimento da funcionalidade desse queijo, permitindo um maior controle das etapas de fabricação e da qualidade do queijo de manteiga.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. QUEIJOS FUNDIDOS

De acordo com a legislação brasileira, queijo processado ou fundido é o produto obtido por trituração, mistura, fusão e emulsão por meio de calor e agentes emulsionantes, de uma ou mais variedades de queijo, com ou sem adição de outros produtos lácteos e/ou sólidos de origem láctea e/ou especiarias, condimentos ou outras substâncias alimentícias na qual o queijo constitui o ingrediente lácteo utilizado como matéria-prima predominante na base láctea (BRASIL, 1996).

Queijos fundidos ou processados são caracterizados segundo a sua composição, teor de água e consistência. De acordo com estes critérios, podem ser classificados em três grandes grupos: queijo processado em bloco, queijo processado fatiável, queijo processado untável. Além destes, pode-se citar os queijos fundidos análogos, os quais são essencialmente uma mistura de caseína e gorduras animal ou vegetal (CARIC' & KALÁB, 1987).

Os queijos fundidos ou processados mais difundidos no Brasil são denominados como requeijão, com diferentes conteúdos de umidade e gordura, havendo desde produtos bem cremosos, com propriedades de espalhabilidade, como o requeijão cremoso, até bastante firmes, possíveis de serem cortados em fatias, como o requeijão mineiro e o queijo de manteiga ou requeijão do norte (OLIVEIRA, 1986).

2.2. QUEIJO DE MANTEIGA

O queijo de manteiga difundiu-se exclusivamente na região canavieira do Brasil colônia, que hoje corresponde ao nordeste brasileiro. Tudo indica que esse requeijão seja genuinamente brasileiro, em razão de ser resultante de adaptação das influências portuguesa, espanhola, africana, indígena e brasileira (VENTURA, 1987).

O queijo de manteiga ou requeijão do norte é um queijo típico do nordeste, sendo largamente fabricado nos estados de Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, e Rio Grande do Norte e em menor escala, na Bahia, no Piauí e no Ceará. A fabricação do queijo de manteiga é geralmente artesanal (VENTURA, 1987). Nesses estados, o leite cru desnatado é coagulado espontaneamente pela microflora natural do leite, cujo desenvolvimento é favorecido pela elevada temperatura ambiente da região (RIBEIRO, 1947).

2.2.1. Características físico-químicas e sensoriais

JASSEN-ESCUADERO & RODRIGUEZ-AMAYA (1981) e NASSU *et al.* (2003), estudaram a composição química do queijo de manteiga (Tabela 1), e mostraram que a variação é bastante grande, principalmente para umidade, gordura, gordura em base seca (GBS) e proteína. Isto foi atribuído à variação da quantidade de manteiga de garrafa adicionada no processamento desse queijo. Foi observado também que a adição de sal não era padronizada, variando entre 0,71 a 1,95%. Em outro estudo, GUERRA (1995) encontrou valores de pH entre 5,9 e 6,0 e acidez titulável de 0,11 a 0,22% para as amostras analisadas. As diferenças de valores encontrados nesses estudos refletem a falta de padronização no processamento do queijo de manteiga.

De acordo com o teor de gordura no extrato seco, o queijo de manteiga pode ser classificado como “semi gordo” a “gordo”, e de acordo com o teor de umidade, de “média” a “alta”, seguindo a classificação para queijos do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1996).

Tabela 1. Caracterização físico-química do queijo de manteiga.

Análises	Janssen-Escudeiro & Rodrigues-Amaya (1981)		Nassu <i>et al.</i> (2003)		
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Média
Umidade (%)	42,2	50,8	39,57	64,97	47,10
Gordura (%)	11,5	16,6	11,57	33,67	25,29
Gordura em base seca (%)	24,7	33,2	34,72	59,88	47,30
Proteína (%)	26,1	31,0	13,91	27,20	23,73
Cinzas (%)	2,6	3,4	1,77	3,37	2,61
pH	5,0	5,3	5,20	5,90	5,55
Acidez (%)	0,31	0,39	0,12	1,85	0,41
Cloretos (%)	1,47	2,00	0,71	1,95	1,38

Com relação às características sensoriais o queijo de manteiga deve possuir consistência macia, tendendo à untuosidade; textura fechada, semi-friável, com pequenos orifícios mecânicos contendo gordura líquida em seu interior; cor amarelo-palha; sabor

pouco acentuado, levemente ácido, lembrando manteiga; odor pouco pronunciado, lembrando manteiga; crosta fina e sem trinca; formato e peso variáveis (BRASIL, 2001).

2.2.2. Aspectos tecnológicos de processamento do queijo de manteiga

2.2.2.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para a fabricação do queijo de manteiga é o leite desnatado, devido ao fato de que a gordura tende a separar-se do leite durante o período de repouso necessário à coagulação, sendo perdida no soro durante a etapa de dessoragem (OLIVEIRA, 1986). O creme obtido do desnate é empregado na fabricação da manteiga de garrafa que é utilizada no queijo de manteiga.

Pequenas unidades de fabricação utilizam o desnate natural, que consiste em deixar o leite cru integral em repouso por um período superior a 8 horas. Em seguida, é retirado o máximo possível da gordura suspensa. Industrialmente, o desnate é realizado mecanicamente, utilizando-se centrífuga de pratos.

O leite empregado no processamento do queijo deve ter excelente qualidade microbiológica. O que é fundamental evitar contaminação com bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, que são microrganismos anaeróbios esporulados, cujos esporos não são destruídos pelo aquecimento (KOSIKOWSKI, 1951). No entanto, no Brasil, o leite destinado à fabricação do queijo de manteiga ou requeijão do norte nem sempre é de boa qualidade, podendo apresentar acidez elevada, resultante das condições inadequadas de obtenção e manuseio (CAVALCANTE, 1991).

Do ponto de vista higiênico-sanitário, não há exigência de pasteurização do leite, já que o queijo de manteiga sofre tratamento térmico prolongado. Porém, do ponto de vista tecnológico, a pasteurização, seguida de inoculação com cultura láctica apropriada, permite uma garantia no controle do processo fermentativo da coagulação, o que leva à obtenção de um produto com qualidade padronizada (OLIVEIRA, 1986).

2.2.2.2. Obtenção da massa

A coagulação das proteínas do leite é realizada através de acidificação, que pode ser realizada por três processos distintos: (1) acidificação natural do leite desnatado, (2) uso de soro-fermento, e (3) uso de ácido orgânico (VENTURA 1987). O processo de coagulação

do leite por acidificação natural é consequência da formação de ácido láctico e outros ácidos provenientes do desenvolvimento de bactérias lácticas presentes naturalmente no leite cru. O aumento da concentração de ácidos é dependente do tempo e da temperatura, o que fará com que o ponto isoelétrico da caseína, ocorra em tempo e condições diferentes. (VENTURA, 1987). A coagulação do leite completa-se em torno de 15 a 20 horas, e a coalhada obtida deve apresentar-se branca, uniforme, sem formação de bolhas e consistente para permitir o corte e posterior dessoragem (VENTURA, 1987).

A coagulação do leite utilizando soro-fermento é realizada em duas etapas: preparação do soro-fermento e a coagulação. A base do soro-fermento é o soro originado da coagulação do leite no dia anterior, que é rico em lactose e contém uma considerável quantidade de microrganismos. Esse material é deixado em repouso por um período superior a 18 horas à temperatura ambiente ou local aquecido, com a finalidade de acelerar a formação de ácido pelos microrganismos. Dependendo do nível de acidez alcançado e da quantidade de soro-fermento adicionado ao leite, a coagulação do mesmo ocorre em um período de vinte minutos (VENTURA, 1987).

O processo de coagulação do leite pode ser realizado pela adição de ácidos orgânicos comerciais ou de origem vegetal (ácido cítrico, acético). Pequenas unidades artesanais utilizam caldo de limão e vinagre para acelerar o processo de coagulação (VENTURA, 1987). O fenômeno que ocorre na coagulação ácida é diferente daquele que ocorre na coagulação enzimática. As proteínas possuem múltiplas cargas, as quais estão situadas ao longo da cadeia protéica, assim, quando há excesso de um único tipo de carga, a proteína possui uma estrutura aberta, devido, em parte, à repulsão existente entre os sítios que contém mesma carga (LEMAN & KINSELLA, 1989; SHIMP, 1985). Por outro lado, quando o pH do leite aproxima-se do ponto isoelétrico da caseína, ao redor de 4,6, as cargas elétricas das partículas coloidais da caseína neutralizam-se ou igualam-se. Em consequência disso, a força de repulsão deixa de existir, permitindo assim que as partículas coloidais unam-se formando o coágulo ou gel (HEERTJE *et al.*, 1985; OLIVEIRA, 1986). Devido ao aumento das interações existentes entre proteína-proteína, o grau de solubilização da caseína é mínimo (LEMAN & KINSELLA, 1989).

A coalhada resultante da coagulação ácida é bastante frágil e se dispersa facilmente em partículas finamente subdivididas. Após a quebra e dessoragem, forma-se um

precipitado firme, ressecado e quebradiço devido a desmineralização que ocorre na micela de caseína com o abaixamento do pH (OLIVEIRA, 1986). Tal desmineralização é decorrente da remoção de cálcio da rede protéica, resultando na desintegração das micelas de caseína, com conseqüente separação das submicelas (HEERTJE *et al.*, 1985; LIN *et al.*, 1972; MORR, 1967; SCHMIDT & BUCHHEIM, 1976).

2.2.2.3. *Dessoragem e desacidificação*

A massa coagulada é aquecida em 60°C e agitada, para facilitar a expulsão do soro lácteo, por aproximadamente vinte minutos, até a formação de grãos uniformes (ESCUADERO,1979). A massa é deixada em repouso para a decantação e separação do soro. Em seguida, é colocada em saco de algodão e prensada manualmente até dessoragem completa, sendo levada novamente ao tanque e esfarelada com as mãos para posterior lavagem.

O excesso de acidez é eliminado através da lavagem da massa com água e posteriormente com leite para remover a acidez e incorporar cálcio à massa de caseína. A adição do leite é realizada sob aquecimento e agitação contínua. O leite coagula e a nova coalhada produzida é incorporada à antiga massa, aumentando o volume. Após dez minutos de agitação, a massa é dessorada novamente. A operação é repetida até que o leite adicionado não coagule mais em conseqüência da acidez da massa (ESCUADERO,1979). O leite utilizado na última fase de desacidificação exerce um duplo papel: neutraliza a acidez, elevando o pH da massa para cerca de 5,3 a 5,7, que é a faixa normalmente necessária para que ocorra a fusão, e também promove a incorporação de um novo coágulo à massa, aumentando o rendimento (OLIVEIRA, 1986).

2.2.2.4. *Processo de fusão*

O processo de fusão significa o tratamento térmico ao qual é submetida a massa caseíca e os coadjuvantes tecnológicos, utilizando vapor direto ou indireto, sob vácuo parcial ou não, com agitação constante, utilizando-se uma temperatura de 85-90°C (ESCUADERO, 1979; OLIVEIRA, 1986). No momento de fusão, o pH da massa é um fator fundamental, pois determina a fluidez e a cremosidade da mesma (MEYER, 1973; OLIVEIRA, 1986; SHIMP, 1985). Dessa forma, o pH da massa deve ser corrigido para um

valor próximo a 5,2-5,7 para permitir uma fusão homogênea, característica de um queijo processado (BERGER *et al.*, 1989; MEYER, 1973; OLIVEIRA, 1986; SHIMP, 1985).

O cloreto de sódio e o bicarbonato de sódio atuam como agentes facilitadores da fusão do queijo de manteiga. O cloreto de sódio é distribuído na massa a seco ou diluído com água na proporção de 1,0 a 3,0% (ESCUDERO, 1979). O cloreto de sódio tem como função contribuir para o sabor do queijo e minimizar a germinação de bactérias esporuladas causadoras de defeito, do gênero *Clostridium* (KOSIKOWSKI, 1978). O bicarbonato de sódio é utilizado em processamento artesanal e industrial, com a finalidade de ajustar o pH e tamponar o meio. Além dessa finalidade, o bicarbonato de sódio melhora a coloração e aumenta a plasticidade do queijo de manteiga, sendo adicionado de 3 a 5% (GUERRA, 1995). De acordo com o estudo realizado por RENATA NASSU¹, a proporção geralmente adicionada é de 0,35%.

Inicialmente, o processo de fusão de queijos processados ou fundidos era efetuado sem a adição de sais emulsificantes, mas, somente depois da introdução dos citratos e fosfatos, o processo industrial de queijos fundidos passou a ser efetuado com maior facilidade. A partir de então, o processo foi expandido devido às inúmeras possibilidades de combinação de diferentes tipos de queijos, e adição de outros ingredientes como manteiga, frutas e condimentos, tornando possível produzir queijos processados com diferentes consistências, sabores, aromas e viscosidades (CARIC & KALÁB, 1987).

A característica de um sal emulsificante é a capacidade de solubilizar a caseína, com a conseqüente formação de um sol homogêneo, e essa capacidade aumenta com o seu poder de fixação de cálcio (MEYER, 1973). Outra função importante desempenhada pelos sais emulsificantes é a peptização, isto é a separação dos grandes agregados hidrofóbicos de caseína em unidades menores durante o processo de aquecimento e agitação da massa. A peptização aumenta a área superficial e a capacidade de retenção de água, provocando uma mudança na textura do produto final. Esse fenômeno é conhecido como efeito cremificante (MEYER, 1973; ZEHREN & NUSBAUM, 1992). A cremificação, isto é, a transformação da rede caseína em uma dispersão coloidal estável é provavelmente a condição mais importante para a fabricação de queijos pastosos (FERNANDES, 1981; ZEHREN & NUSBAUM, 1992).

¹(Comunicação Pessoal, 2004)

Os sais emulsificantes não atuam como agentes emulsificantes propriamente ditos, o seu papel é reagir com as proteínas, tornando suas propriedades adequadas para que estas atuem como emulsificantes da dispersão óleo-água (KALÁB, 1993; ZEHREN & NUSBAUM, 1992). A adição de sais emulsificantes (em torno de 10 a 30g/kg) durante o processamento promove a emulsificação da gordura e a re-hidratação da proteína, além de contribuir para a formação de um produto homogêneo, liso e estável. Durante o aquecimento e agitação, o sal emulsificante promove uma série de mudanças físico-químicas na mistura, que inclui o seqüestro do cálcio da matriz protéica (troca com o sódio do sal emulsificante), ajuste e estabilização do pH, hidratação e dispersão da paracaseína, emulsificação da gordura e formação da estrutura do queijo (FOX *et al.*, 2000).

Outra propriedade dos sais emulsificantes é o efeito bacteriostático, função esta importante nos queijos processados onde se utilizam temperaturas de 70 a 95°C e que podem conter esporos viáveis, especialmente de *Clostridium*. Tais esporos são provenientes das matérias primas e, caso germinem durante a estocagem, podem causar estufamento das embalagens, putrefação de proteínas e desenvolvimento de sabor / odor estranho (FOX *et al.*, 2000). No entanto, segundo FOX *et al.* (2000), dependendo do tipo de sal emulsificante utilizado, pode ocorrer o desenvolvimento de off-flavours como amargor e gosto de sabão.

No queijo de manteiga normalmente a fusão é obtida sem o uso de sais emulsificantes. A adição de sais fundentes é uma prática adotada por poucas indústrias, sendo o citrato de sódio mais utilizado pelas mesmas, conforme descrito por NASSU *et al.* (2003).

2.2.2.5. Emprego da manteiga de garrafa

A manteiga de garrafa, ou manteiga da terra, é um produto gorduroso nos estados líquido e pastoso, obtido a partir do creme de leite, pela eliminação quase total da água, mediante processo onde o creme de leite é aquecido a temperatura de 110 a 120°C, sob agitação, até completa fusão, considerando-se o ponto final de aquecimento a interrupção da produção de bolhas, com precipitação da fase sólida não gordurosa. A fase sobrenadante, oleosa e líquida, separada por decantação em temperatura ambiente, é filtrada e envasada (BRASIL, 2001). Essa manteiga é uma gordura anidra e, portanto, bastante suscetível à oxidação lipídica. O processo de fabricação da manteiga de garrafa é artesanal, sem

controle das etapas de processamento, inclusive do tempo e da temperatura utilizada para adequada fusão do produto, o que explica a falta de uniformidade do mesmo (AMBRÓSIO *et al.* 2001, 2003). De acordo com SANTOS (1995), a estabilidade química da manteiga de garrafa é afetada pela elevação da temperatura, exposição à luz e à umidade, acarretando prejuízos significativos à sua qualidade.

NASSU *et al.* (2001) observaram que para o processamento deste produto no Estado do Ceará, algumas vezes, a gordura utilizada era proveniente do soro do queijo de coalho, e, no Rio Grande do Norte, e em unidades de maior porte, o creme utilizado era proveniente do leite padronizado para pasteurização, sendo este creme armazenado em tambores plásticos, à temperatura ambiente ou sob refrigeração, havendo necessidade de alguns dias para se obter quantidade suficiente para fazer a manteiga. Isso significa que, o creme destinado à fabricação da manteiga pode se apresentar ácido e rancificado, dando origem a um produto de baixa qualidade. A fusão da gordura láctica é realizada em tacho ou panela de alumínio ou aço inox (em indústrias), em fogão a lenha, a gás ou vapor. Tais condições de processamento dificultam o controle e padronização da temperatura, bem como do tempo de cozimento variável.

A embalagem normalmente utilizada para a manteiga de garrafa é de vidro, geralmente proveniente da reutilização de garrafas de cachaça de um litro, mas também são utilizadas garrafas de vidro de 200 e 500mL. Segundo NASSU *et al.* (2003), a quantidade de manteiga de garrafa adicionada durante a fusão do queijo de manteiga é em torno de 50%. Segundo GUERRA (1995), a proporção de manteiga adicionada no queijo de manteiga, procedente da Cooperativa de Energia e Desenvolvimento Rural do Seridó Ltda, era de 15 a 20%.

2.2.2.6. Enformagem, resfriamento, embalagem e armazenamento

Geralmente os queijos são moldados em formas de policloreto de vinila (PVC). Alguns queijos produzidos artesanalmente são enformados em formas plásticas não apropriadas para queijos. Os queijos, ainda nas formas, são levados à câmara de refrigeração a temperatura de 4-5°C/5-6h para resfriarem.

O tipo de embalagem usada em queijo de manteiga é bastante variável. Alguns são embalados a vácuo, em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD). Outras

indústrias utilizam embalagens cryovac, e, muitas vezes, quando produzido artesanalmente, o queijo de manteiga é comercializado sem embalagem. O queijo geralmente é armazenado em câmaras de refrigeração, a temperatura de 10°C, ou, dependendo do comércio, em temperatura ambiente.

2.2.2.7. Diagnóstico das condições de processamento

NASSU *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre as condições de processamento do queijo de manteiga no estado do Rio Grande do Norte e constataram que o leite utilizado na fabricação desse queijo não é pasteurizado em 90% dos casos, nem sempre é desnatado, e que, em alguns casos, a manteiga de garrafa que é substituída por óleo de soja. Também foram encontrados queijos adulterados com adição de amido de milho. Foram observadas condições inadequadas de processamento tais como: uso de tambores plásticos para a coagulação do leite, e fusão da massa em tachos à lenha. Em 90% dos casos, os queijos eram enformados em vasilhames plásticos não apropriados para queijo e comercializados pelos produtores sem embalagem, a temperatura ambiente. As exceções são alguns estabelecimentos inspecionados que utilizam formas específicas para queijos e comercializam o produto embalado a vácuo e sob refrigeração.

A figura 1 representa o fluxograma de processamento de queijo de manteiga.

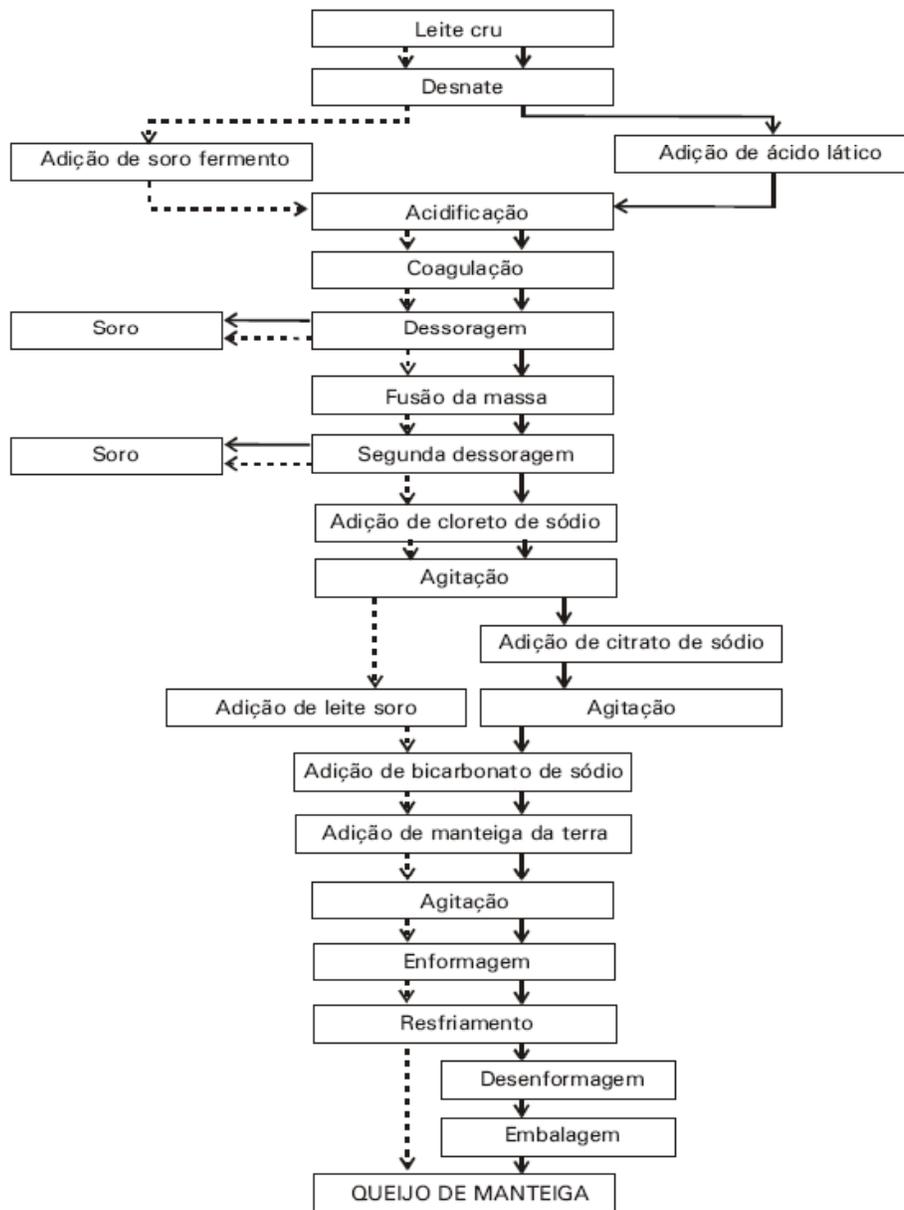


Figura 1. Fluxograma de processamento de queijo de manteiga. Linha contínua: processamento em unidades de maior porte. Linha tracejada: processamento artesanal.

Fonte: NASSU *et al.* (2003).

2.3. MUDANÇAS FÍSICO-QUÍMICAS INDUZIDAS PELA ACIDIFICAÇÃO DO LEITE

De acordo com o modelo de caseína proposto por WALSTRA (1999), a micela de caseína (Figura 2), essencialmente esférica, é formada de unidades menores denominadas submicelas, contendo principalmente caseína. As submicelas variam em composição, existindo particularmente dois tipos principais, isto é, um tipo formado pelas caseínas α_{S1} , β e κ , e outro formado pelas caseínas α_{S1} e κ . As submicelas permanecem ligadas por aglomerados de fosfato de cálcio. A κ -caseína se posiciona na superfície da micela e a porção C-terminal da κ - caseína (macropeptídio) projeta-se para fora da superfície da micela e, por repulsão estérica e eletrostática impede a agregação das submicelas.

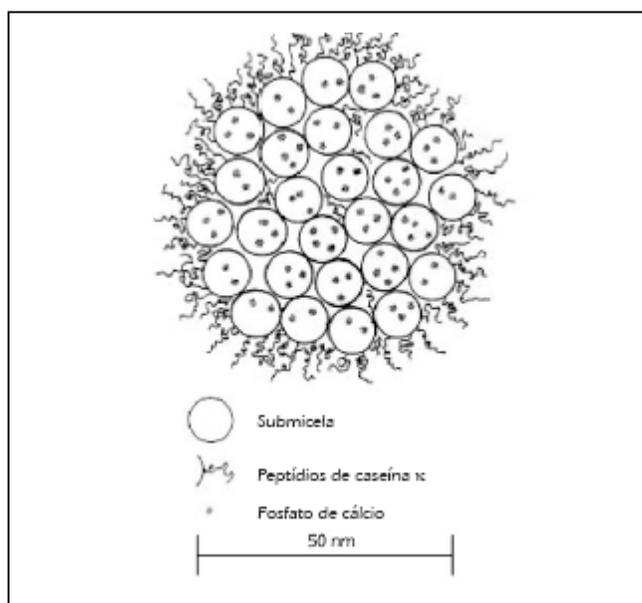


Figura. 2. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de cálcio e os peptídeos de κ - caseína na superfície da micela.

As micelas de caseína do leite bovino são constituídas de aproximadamente 92% de caseína, 7% de cálcio e fósforo inorgânicos e pequenas quantidades de magnésio, citratos e outros elementos-traço (GUINEE *et al.*, 1999). Durante o abaixamento do pH ocorrem alterações importantes na composição, estrutura e reatividade da micela (GASTALDI *et al.*, 1996). O fosfato de cálcio coloidal (FCC) é um complexo amorfo de cálcio e fosfato orgânico associado aos resíduos de fosfoserina das caseínas, que estabiliza as micelas. Com

a acidificação do leite ocorre a solubilização do FCC, a qual é completada em pH ao redor de 5,1 - 5,3 (DE KRUIF, 2002; MCMAHON & BROWN, 1984; VAN HOOYDONK *et al.*, 1986; WALSTRA, 1990).

Além da solubilização do FCC, a acidificação promove a dissociação da micela de caseína, a redução da carga micelar (potencial zeta) e a diminuição da camada hidrodinâmica da micela (BANON & HARDY, 1992; ROEFS *et al.*, 1985; VAN HOOYDONK *et al.*, 1986; WALSTRA, 1990). Na faixa de pH de 5,3 a 4,6, a neutralização de cargas e o aumento da hidrofobicidade levam à agregação das partículas de caseína e o aumento de seu diâmetro aparente devido às interações atrativas (KRUIF, 1999). As caseínas dissociadas se associam novamente para formar uma nova partícula de caseína (GASTALDI *et al.*, 1996; GUINEE *et al.*, 1999), ocorrendo a diminuição de proteína na fase soro, que será aproximadamente zero no ponto isoelétrico da caseína. Além disso, também ocorre o encurtamento da fração c-terminal da k-caseína (“colapso dos cabelos”) que se direciona da micela para o meio aquoso, diminuindo a repulsão estérica entre as micelas (BANON & HARDY, 1992; WALSTRA, 1990). Ocorre uma ligeira diminuição da viscosidade do leite até pH 5,3, a partir do qual há um grande aumento da viscosidade, culminando com a formação do gel (GASTALDI *et al.*, 1996).

Vários fatores influenciam a estrutura do gel ácido, sendo os quais mais importantes: quantidade e tipo de proteína; tratamento térmico do leite; pH; homogeneização; temperatura de incubação; adição de renina e taxa de gelificação. O gel obtido pela coagulação ácida encontra-se desmineralizado já que o FCC foi removido da micela de caseína. Como a fusão da massa e a capacidade emulsificante da caseína é dependente do equilíbrio entre o cálcio coloidal e cálcio solúvel, é necessária a reposição de cálcio à massa, através da adição de leite durante a fusão, para a obtenção de um queijo de manteiga com características de qualidade desejáveis.

2.4. MECANISMO DE FUSÃO E RELAÇÃO COM O PH

Na fabricação de queijos fundidos, a fusão da massa é, sem dúvida, uma etapa que influencia diretamente na qualidade do produto final. A fusão adequada depende das características da massa com relação à acidez e ao equilíbrio salino entre o cálcio e o caseinato (MEYER, 1973; OLIVEIRA, 1986; BERGER *et al.*, 1989).

O pH da massa no momento da fusão é um fator fundamental, pois determina a fluidez e a cremosidade da mesma (MEYER, 1973; SHIMP, 1985; OLIVEIRA, 1986). Dessa forma, o pH da massa deve ser corrigido para um valor próximo a 5,2-5,7 para permitir uma fusão homogênea, característica de um queijo processado (MEYER, 1973; SHIMP, 1985; OLIVEIRA, 1986; BERGER *et al.*, 1989).

Em queijos frescos, os glóbulos de gordura apresentam a membrana lipoprotéica intacta. Com a elevação da temperatura durante a fusão, qualquer mudança que ocorra estará limitada ao sistema proteína-água e às substâncias nele dissolvidas. Assim, há o aumento da solubilidade dos sais, lactose e ácido láctico, resultando em menor necessidade de água de hidratação. Como parte da água é perdida por evaporação, e os grupos funcionais das proteínas também vão precisar de menos água de hidratação, a proporção de água livre aumenta, e as interações hidrofóbicas são mais intensas, as cadeias protéicas coalescem, formando cordões com propriedades elásticas.

Durante o aquecimento do queijo ocorre a separação parcial da massa protéica e da fase aquosa e os glóbulos de gordura coalescem, havendo a necessidade de um agente emulsificante para estabilizar a emulsão. Em seu estado não modificado a caseína possui a capacidade de atuar como um emulsificante natural. No queijo, a caseína perde sua capacidade emulsificante pelo fato de íons divalentes de cálcio e magnésio estarem ligados às micelas de caseína. Conseqüentemente, esses íons precisam ser removidos ou substituídos por íons monovalentes para que a caseína possa atuar como emulsificante. A remoção e/ou substituição do cálcio ocorre através da diminuição do pH ou da sua complexação com sais fundentes. Isso irá tornar a caseína mais ionizada e hidratada nas porções hidrofílicas de suas moléculas, ou seja, apresentando uma natureza detergente na forma de íons caseinato (BERGER *et al.*, 1989). Para uma fusão homogênea é necessário remover o fosfato de cálcio coloidal das micelas de caseína. O pH exerce papel fundamental no equilíbrio da concentração de cálcio solúvel e cálcio coloidal.

Durante o aquecimento e agitação da massa ocorre o fenômeno de peptização e cremificação, isto é, a separação dos grandes agregados hidrofóbicos da caseína em unidades menores. A cremificação aumenta a área superficial e a capacidade de retenção de água da proteína, provocando uma mudança de textura, com um aumento da viscosidade do queijo fundido (MEYER, 1973; ZEHREN & NUSBAUM, 1992).

De acordo com LEE *et al.* (2003), a reação de cremificação possui caráter essencialmente protéico, ocorrendo independentemente da presença de gordura. No início do cozimento, as caseínas sofrem dissociação por ação dos sais fundentes, ou ajuste do pH, liberando unidades protéicas menores (possivelmente ao nível de submicelas). Essa reação aumenta a hidratação das proteínas, ao mesmo tempo em que aumenta a exposição de seus grupos polares e apolares. Com isso, as interações proteína-proteína aumentam, formando-se uma nova rede protéica, provavelmente similar à que se forma durante a desnaturação de proteínas globulares e a gelificação. Quando a cremificação é muito intensa (por exemplo, no caso de cozimento por tempo muito longo), a re-associação protéica atinge níveis muito elevados, resultando numa estrutura compacta, que já não é capaz de reter água e gordura adequadamente.

2.5. EFEITO DO pH NAS PROPRIEDADES DOS QUEIJOS

O pH é um parâmetro importante para a identidade e qualidade de todos os queijos, pois afeta diretamente sua estrutura e propriedades reológicas, já que o pH altera fortemente as interações químicas entre os componentes estruturais (proteínas, água e minerais) dos queijos (LAWRENCE *et al.*, 1987).

A fermentação da lactose e a conseqüente produção de ácido láctico são essenciais para o processamento de todas as variedades de queijos. O pH da massa do queijo, o qual pode variar de 4,5 a 5,2, dependendo da variedade, afeta as características da massa e, conseqüentemente, o produto final. O pH afeta a sinérese da massa e, desta forma, influencia a umidade do queijo. Em geral, quanto menor o pH, maior a sinérese. O pH é também responsável pelo teor de minerais no queijo. Quanto mais baixo o pH, mais desmineralizado é o produto. O pH no tanque de fabricação também afeta a retenção de coalho e plasmina na massa, afetando, conseqüentemente, a proteólise. Além das conseqüências para a estrutura do queijo, a redução do pH também contribui para a segurança do produto, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis. As bactérias lácticas constituintes do fermento são mais ácido tolerantes do que os microrganismos contaminantes (FOX *et al.*, 1990).

MARCHESSEAU *et al.* (1997) estudaram o efeito do pH durante a fabricação de queijos processados e concluíram que a redução do pH aumentou as interações entre as

proteínas, pois houve aumento da quantidade de proteína sedimentável por centrifugação, e pela diminuição da capacidade de retenção de água dessas proteínas. A maior firmeza foi obtida para o queijo com pH 5,7, enquanto pHs maiores (6,7) ou menores (5,2) resultaram em queijos com menor firmeza. As micrografias revelaram mudanças significativas na organização protéica que foram causadas por pequenas variações de pH.

FEENEY *et al.* (2002) fabricaram quatro diferentes queijos Mussarela a partir do mesmo leite: acidificado com cultura lática; com adição de ácido lático (5 g/100 mL leite) com adição de uma mistura de ácido lático e gluco-delta-lactona nos níveis de 1,6 ou 3,6 g/100 g de massa coagulada. Foi avaliado o efeito do pH e da concentração de cálcio sobre a proteólise do queijo Mussarela. Os pesquisadores verificaram que o teor de umidade e a extensão da proteólise foram significativamente afetadas tanto pelo pH quanto pelo conteúdo de cálcio. Quando o pH aumentou de 5,5 para 5,9 (mantendo-se a razão cálcio/caseína relativamente constante em 29mg/g), houve um aumento da proteólise primária, porém sem efeito sobre a secundária. O queijo controle feito com cultura lática apresentou os maiores níveis de nitrogênio solúvel a pH 4,6 e degradação da α 1-caseína. Os autores concluíram que a cultura foi o principal agente responsável pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos.

As propriedades funcionais do queijo são influenciadas pelo pH. Acima de pH 5,0, essa influência parece ter um efeito indireto mediado pelo efeito da solubilidade do cálcio. Em baixo pH a porcentagem de cálcio solúvel aumenta no queijo, entre pH 5,0 e 5,35 o queijo se torna mais macio. Essa mudança indica um aumento da hidratação da rede protéica, devido ao fato de haver menos cálcio ligado às caseínas (PASTORINO *et al.*, 2003).

GUINEE *et al.* (2002) estudaram o efeito do pH sobre as propriedades funcionais da mussarela, através da fabricação de queijos acidificados por flora termofílica (controle) e acidificação direta com ácido lático, combinado ou não com a adição de glucona- δ -lactona (GDL). O queijo obtido por acidificação direta, sem adição de GDL, apresentou o maior pH após um dia de fabricação e as mais baixas concentrações de cálcio e caseína intacta, além de menor firmeza, e maior capacidade de retenção de água. Esse queijo apresentou, com um dia de fabricação, derretimento e microestrutura iguais ao do queijo controle com 20

dias. Os autores concluíram que pode-se modificar as propriedades funcionais da mussarela alterando-se o pH e a concentração de cálcio.

SHEEHAN & GUINEE (2004) estudaram o efeito do pH e do teor de cálcio na bioquímica, textura e propriedades funcionais do queijo Mussarela com teor reduzido de gordura. Os autores encontraram menor teor de cálcio e proteína nos queijos que sofreram acidificação direta, os quais apresentaram menor pH na drenagem do soro do que aquele a que foi adicionado apenas fermento láctico (controle). Houve aumento da capacidade de ligar água durante o armazenamento para todos os queijos, porém os queijos que apresentaram menor teor de cálcio apresentaram maior capacidade de ligar água e maior teor de umidade. Os queijos que foram fabricados por acidificação direta tiveram maior hidrólise da α_s1 -caseína do que o queijo controle. Segundo os autores, esse resultado pode ser explicado pela menor atividade residual da quimosina no queijo controle, a qual diminuiu com o aumento do pH no momento da adição da renina e na drenagem. A maior firmeza e o menor derretimento foram obtidos no queijo controle, segundo os autores, devido a uma menor proteólise primária, a um maior teor de cálcio e um menor conteúdo de proteína hidratada.

PATEL *et al.* (1972) estudaram o efeito do pH do leite na sinérese. Para alteração do pH do leite os autores utilizaram HCl e os pHs alcançados foram 5,2, 5,4, 5,6 e 5,8. Os resultados indicaram que a umidade da massa aumentou linearmente de 69,27 para 74,95% com o aumento do pH de coagulação de 5,2 para 5,8. Diminuindo o pH de dessoragem houve um aumento da perda de minerais da massa. Por exemplo, o queijo Cheddar, que é normalmente dessorado com pH 6,1, tem menor teor de minerais que o queijo Emmental, que é dessorado com pH de 6,5 (LUCEY & FOX, 1993).

2.6. MUDANÇAS QUE OCORREM DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS QUEIJOS

A maturação envolve uma série de eventos bioquímicos complexos que podem ser divididos em proteólise, lipólise e glicólise (metabolismo da lactose/lactato), sendo que a extensão e o tipo de maturação dependem da temperatura e tempo de armazenamento, e também da composição do queijo, especialmente teores de umidade e sal; este último exerce efeito sobre a atividade de água, que influencia o crescimento das bactérias e a atividade enzimática. As mudanças físicas e químicas que ocorrem durante a maturação

determinam as propriedades sensoriais do queijo, como aroma, sabor e textura (FARKIE & FOX, 1990).

2.6.1. Proteólise em queijos

A proteólise é o principal e mais complexo evento bioquímico que ocorre durante a maturação do queijo, sendo que vários agentes contribuem para o desenvolvimento de textura e sabor durante a maturação, incluindo atividade residual do coagulante, enzimas naturalmente presentes no leite (principalmente a plasmina), proteinases e peptidases liberadas pelas bactérias ácido lácticas provenientes da cultura adicionada e, das bactérias ácido lácticas não provenientes do fermento láctico (contaminantes ou sobreviventes ao tratamento térmico aplicado) e para algumas variedades de queijo, provenientes do fermento secundário (LANE *et al.*, 1997). Durante os estágios primários da maturação, o coagulante residual retido na massa do queijo hidrolisa a ligação Phe23-Phe24 da α_5 1-caseína formando α_5 1-1-caseína, levando ao amolecimento inicial da textura e resultando na formação de peptídeos grandes. Esses peptídeos grandes servirão de substratos para a atividade proteolítica de proteinases provenientes dos microorganismos, levando à formação de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres, que contribuem diretamente na formação de sabor e como precursores de outros compostos de sabor (LANE *et al.*, 1997; VICENTE *et al.*, 2001).

A plasmina é uma protease natural do leite, secretada na forma de plasminogênio, e resistente ao tratamento térmico. Sua atividade está diretamente relacionada a elevação de temperatura por inativar os inibidores dos ativadores de plasminogênio (BENFELDT *et al.*, 1997). Seu pH ótimo de atuação é de $\sim 7,5$ e, portanto, tem maior importância em variedades de queijos mais maturados devido a elevação do pH que ocorre durante a maturação (FOX, 1989). A plasmina hidrolisa a β - e a α_{S2} -caseína, sendo que a β -caseína sofre hidrólise mais significativa por possuir 3 ligações sensíveis (Lys28-Lys29, Lys105-His106, Lys107-Glu108), com liberação de peptídeos γ_1 caseína, γ_2 caseína, γ_3 caseína (BASTIAN & BROWN, 1996). Plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio estão associados com a micela da caseína (pH 6,6-4,8) e permanecem no coágulo, enquanto inibidores de plasmina e plasminogênio são perdidos para o soro. Por apresentar alta

estabilidade térmica, a ação da plasmina é mais significativa em variedades de queijos com alta temperatura de cozimento da massa. Além disso, altas temperaturas de cozimento provocam a desnaturação do coagulante com perda de sua atividade e possivelmente inativam termicamente os inibidores dos ativadores de plasminogênio e plasmina, aumentando a taxa de ativação de plasminogênio para plasmina (BASTIAN & BROWN, 1996; FOX & LAW, 1991).

Os peptídeos produzidos pela ação do coagulante e da plasmina têm maior importância na fase primária, e serão hidrolisados futuramente durante a maturação em peptídeos menores e aminoácidos livres por ação das bactérias ácido lácticas e bactérias ácido lácticas não provenientes do fermento láctico (fase secundária) (SINGH *et al.*, 1995).

A concentração dos diferentes aminoácidos contidos no queijo está relacionada com a tecnologia de manufatura (tipo de cultura láctica, de coagulante, teores de umidade e sal), tempo e temperatura de maturação, tipo e extensão da proteólise (POVEDA, 2004). A proteólise é comumente utilizada como índice de maturidade do queijo e envolve a separação, quantificação e caracterização dos compostos nitrogenados (N) formados durante a maturação. Os compostos nitrogenados (N) podem ser separados em compostos solúveis e insolúveis em solventes e quantificados analiticamente através de métodos espectrofotométricos ou de kjeldahl, enquanto os métodos eletroforéticos ou cromatográficos são freqüentemente utilizados para a caracterização individual dos peptídeos formados e promovem uma caracterização completa da proteólise em queijos (FARKIE & FOX, 1990).

Os índices conhecidos como “extensão” e “profundidade” de proteólise medem a intensidade da proteólise em queijos, sendo que a extensão se refere à fração que contém compostos nitrogenados solúveis (NS) acumulados durante o processo de degradação da proteína e que possuem alto peso molecular (peptídeos grandes). A extensão de proteólise é expressa como porcentagem do nitrogênio total (NT), como mostra a equação (1). Sua determinação é baseada na precipitação isoeletrica da caseína em pH 4,6 de uma amostra diluída de queijo, seguida pela quantificação do nitrogênio solúvel através do método de Kjeldahl (DESMAZEAUD & GRIPON, 1977).

A extensão da proteólise é dada pela fração dos compostos nitrogenados solúveis a pH 4,6 (precipitação isoeletrica da caseína) e que contém grandes peptídeos, sendo

caracterizado principalmente pela ação do coalho como o responsável por grande parte desta fração, e expressa como porcentagem do nitrogênio total (NT).

$$\text{Índice de extensão} = \frac{\text{NS (pH 4,6)} \times 100}{\text{NT}} \quad (1)$$

A profundidade da proteólise se refere às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular. Esta fração contém todos os aminoácidos livres, formados principalmente pela ação das proteinases e peptidases do fermento lácteo que atuam sob os peptídeos maiores formados pela ação do coalho. A profundidade de proteólise é quantificada através do teor de nitrogênio não protéico (NNP) solúvel em ácido tricloroacético (TCA 12%) e expressa como porcentagem do nitrogênio total (NT), como mostra a equação abaixo:

$$\text{Índice de profundidade} = \frac{\text{NNP} \times 100}{\text{NT}} \quad (2)$$

A extensão e profundidade da proteólise são alteradas pelo tratamento térmico do leite, já que as proteínas do soro, desnaturadas pelo calor interagem com as micelas de caseína, dificultando o acesso das enzimas proteolíticas. Além disso, o tratamento térmico inativa as proteinases naturais do leite e as bactérias não lácticas, o que resulta em um decréscimo da quantidade de nitrogênio solúvel e aminoácidos livres formados (LAU *et al.*, 1991; SOUSA & MALCATA, 1996).

2.6.2. Modificações na textura

Durante a maturação, ocorrem mudanças na textura do queijo, pois, com a proteólise ocorre a quebra da rede de proteína, redução da atividade de água por ligações com novos aminoácidos e grupos carboxílicos formados, e aumento do pH via formação de grupos NH₃ (FOX, 1989; SOUSA *et al.*, 2001).

Os principais fatores que afetam a textura do queijo são a composição do leite utilizado como matéria-prima (teor de caseína, gordura, cálcio e água), o processo de manufatura empregado (tipo de fermento láctico e coagulante utilizado, tempo, temperatura e pH durante a coagulação, prensagem e salga) e as condições de maturação (umidade, tempo e temperatura). As diferenças na composição e na microestrutura do queijo são determinantes na percepção de textura do queijo (JACK & PATERSON, 1992).

É durante o estágio inicial da maturação que a textura é modificada significativamente, sendo correlacionada principalmente com a hidrólise da α_{S1} -caseína pelo coagulante residual, que resulta no amolecimento da estrutura. As características de textura são influenciadas, durante o período de cura pela atividade e crescimento microbiológico, perda de umidade, atividade enzimática e concentração do sal. Esta última tem um efeito significativo na textura, por inibir o crescimento microbiano, controlar a atividade das enzimas proteolíticas e influencia a capacidade de retenção de água das proteínas (CERVANTES *et al.*, 1983).

WATKINSON *et al.* (2001) fabricaram queijo com processo semelhante ao Cheddar, para estudar o efeito da variação do pH sobre a textura e a proteólise. Os autores observaram aumento da firmeza, do nitrogênio solúvel em água e do nitrogênio não protéico quando o pH aumentou de 5,20 para 6,22. Os autores concluíram que o aumento do nitrogênio não protéico deveu-se, provavelmente, à maior hidrólise de β -caseína, devido a maior atividade da plasmina no pH mais elevado (6,2). Por outro lado, a menor hidrólise da α -caseína pode estar relacionada à diminuição da atividade do coalho no pH mais elevado (6,2).

A textura pode ser definida como a composição dos elementos estruturais do alimento e a maneira como são fisiologicamente percebidos pelos sentidos no momento da mastigação (SZCZESNIAK *et al.*, 1963). A textura pode ser medida, quantificada e descrita pela análise sensorial através de julgadores treinados (percepção dos sentidos humanos). No entanto, esse método envolve tempo substancial, dispêndio de dinheiro e freqüentemente baixa reprodutibilidade (SZCZESNIAK, 1987). Como alternativa a avaliação sensorial (subjetiva), existem métodos instrumentais (objetivos) para a avaliação das características de textura. Entretanto, GREEN *et al.* (1985) advertem, que as medidas instrumentais de textura de queijos só podem ser realizadas quando estas envolverem a fraturabilidade do produto e simularem um processo semelhante ao que ocorre durante a mastigação do produto ou a sua trituração.

No estudo de textura instrumental, utiliza-se o texturômetro para determinar o perfil de textura (TPA – Texture Profile Analysis). O teste mede as características mecânicas manifestadas pela reação do alimento a uma força. Nesta avaliação a amostra deve ser

submetida a dois ciclos de compressão. A resposta a este teste é uma curva a partir da qual são determinados os seguintes parâmetros (VAN VLIET, 1991):

- **Dureza TPA** (TPA hardness): é a força necessária para atingir uma dada deformação.
- **Coesividade TPA** (TPA cohesiveness): é a força necessária para que o dispositivo usado na compressão se descole da amostra.
- **Elasticidade TPA** (TPA springiness): é a velocidade com que um material deformado volta à sua condição original após ser retirada a força deformante.
- **Adesividade TPA** (TPA adhesiveness): é a 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.
- **Mastigabilidade TPA** (TPA chewiness): é a energia requerida para mastigar um sólido até o ponto de ser deglutido.
- **Gomosidade TPA** (TPA gumminess): é a energia requerida para se desintegrar um alimento semi-sólido a ponto de ser deglutido.

O pH influencia as características de textura dos queijos processados, uma vez que afeta a configuração da proteína. Valores de pH abaixo de 5,4 prejudicam a textura do queijo, tornando-a muito firme e granulosa (TEMPLETON & SOMMER, 1932; TUNICK & NOLAN, 1992; VISSER, 1991). Queijos que apresentam valores de pH na faixa de 5,5 a 5,7 tendem a possuir consistência mais firme, ao passo que valores de pH acima de 6,3 resultam em queijos de consistência pastosa (BERGER *et al.*, 1989; MEYER, 1973). De acordo com TEMPLETON & SOMMER (1932), valores de pH entre 5,7 a 6,3 apresentam pequena influência na firmeza em queijos processados untáveis.

2.6.3. Rancidez hidrolítica e lipólise em queijos

A rancidez hidrolítica resulta da hidrólise da ligação éster por lipase ou umidade. A rancidez hidrolítica enzimática refere-se à hidrólise dos óleos e gorduras com produção de ácidos graxos livres (AGL), devido à ação das enzimas lipases, presentes nas sementes oleaginosas ou de origem microbiana. De forma não enzimática, a rancidez hidrolítica se dá em altas temperaturas, produzindo ácidos graxos livres (HUI, 1996).

A rancidez hidrolítica é o processo que se traduz no aumento progressivo de ácidos graxos livres e, ocorre com maior facilidade em alimentos com certa quantidade de água, condição que permite a hidrólise enzimática e contaminação bacteriana. As enzimas envolvidas são as lipases (fosfolipases e glicolipídioidrolases), próprias do alimento ou de origem bacteriana. O processo hidrolítico pode provocar uma profunda modificação da fração lipídica, propiciando alterações sensoriais às vezes muito evidentes. No caso dos ácidos graxos serem voláteis, como ocorre com o ácido butírico, o produto da rancidez manteiga, eles também contribuem para o sabor característico de certos queijos (PIÑOL & BORONAT, 1989).

A lipólise em queijos ocorre devido à presença de enzimas lipolíticas, conhecidas como hidrolases (lipases e esterases). Essas enzimas são provenientes do leite, renina em pasta, cultura láctica, culturas adjuntas, e bactérias não oriundas do fermento láctico (FOX *et al.*, 2000). Em muitos queijos maturação é acompanhada pela lipólise, que é a hidrólise dos triacilglicerídios com consequente produção de ácidos graxos livres de cadeia maiores que quatro carbonos. Os ácidos graxos livres também podem ser produzidos pelo metabolismo de carboidratos e aminoácidos pela flora bacteriana. (FOX & WALLACE, 1997; URBACH, 1993). Os ácidos graxos livres contribuem para o *flavour* dos queijos, e servem de precursores para outros compostos, tais como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, e lactonas (FOX & WALLACE, 1997; LANGSRUD & REINBOLD, 1973; URBACH, 1993).

2.6.4. Rancidez oxidativa

A oxidação de lipídios é a maior causa da deterioração dos alimentos. É de grande valor econômico na indústria de alimentos porque conduz ao desenvolvimento de diversos sabores e odores inaceitáveis em óleos comestíveis e produtos à base de gordura, comumente denominados ranços (FRANKEL, 1980; NAWAR, 1996; SILVA *et al.*, 1999). A aceitação do produto alimentício depende da extensão em que a deterioração lipolítica ocorre (GRAY, 1978).

A oxidação pode ainda, diminuir a qualidade nutricional dos alimentos, e além disso certos produtos de oxidação são potencialmente tóxicos (NAWAR, 1996; FRANKEL, 1980). Exemplos de compostos que devem ser considerados incluem peróxidos e radicais

livres, malonaldeído e diversos produtos da oxidação do colesterol, sendo que as doenças coronárias podem ser causadas pelo consumo de produtos da oxidação de lipídios (ADDIS, 1986). Apesar disso, sob certas condições, em queijos e alguns alimentos fritos, um certo grau de oxidação de lipídios é desejável (NAWAR, 1996).

A rancidez oxidativa (autooxidação) de lipídios é bastante complexa e envolve um grande número de reações de intermediários interligadas. A taxa de autooxidação varia consideravelmente e é afetada pela composição em ácidos graxos, grau de insaturação, presença e atividade de pró e antioxidantes, pressão parcial de oxigênio, natureza da superfície exposta ao oxigênio e condições de estocagem (temperatura, exposição à luz, teor de umidade, etc) dos alimentos com óleo ou gordura em sua composição (BELITZ & GROSCH, 1999). Pode ocorrer na ausência de luz, embora esta seja um dos possíveis catalisadores da reação. A reação se dá em três etapas que se distinguem pelos produtos formados e pelas alterações sensoriais causadas ao alimento em cada fase. Na primeira etapa, a fase de indução ou iniciação, não há consumo de oxigênio e não há alteração sensorial do produto, mas são formados os primeiros radicais livres a partir do ácido graxo insaturado na presença de catalisadores como luz, calor e metais; na segunda etapa, de propagação, inicia-se a rápida alteração sensorial do produto, ocorrendo alto consumo de oxigênio e formação de peróxidos; finalmente, na última etapa, denominada de terminação, o produto já se encontra sensorialmente muito alterado, devido às interações entre os radicais livres, levando à formação de compostos estáveis, não radicais, mas voláteis e responsáveis pela rancidez. Nesta última etapa não há mais consumo de oxigênio (NAWAR, 1996).

Segundo NAWAR (1996), a oxidação de lipídios está associada à reação do oxigênio com lipídios insaturados por meio de dois mecanismos diferentes: auto-oxidação e fotoxidação. O primeiro é o mecanismo autocatalítico de radicais livres em cadeia, principalmente entre os ácidos graxos insaturados dos acilgliceróis com o oxigênio atmosférico (oxigênio triplete). Desta reação resultam aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, etc, responsáveis pelo desenvolvimento de sabor e odor de ranço no produto.

A fotoxidação é o mecanismo alternativo que ocorre pela exposição à luz de alimentos que possuem fotosensibilizadores, como a riboflavina em produtos lácteos. Este

mecanismo difere da reação de auto-oxidação por não apresentar período de indução, ou seja, não ocorre a formação de radicais livres, uma vez que o ácido graxo reage diretamente com o oxigênio singlete (formado a partir do oxigênio triplete por meio de reações fotoquímicas) formando o peróxido (etapa de propagação da reação). Quando ocorre o mecanismo de fotoxidação, a oxidação do produto é muito rápida (NAWAR, 1996).

2.6.5. Determinação de ácidos graxos livres e peróxidos

A análise de ácidos graxos livres (AGL) determina o percentual de ácidos graxos livres na amostra (SOUZA, 2003). A acidez é definida como a massa, em mg, de KOH necessária para neutralizar os ácidos livres presentes em 1 g de óleo ou gordura (NIELSEN, 1998).

A rancidez é acelerada por luz e calor e os ácidos graxos livres formados são responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis, especialmente em gorduras como a manteiga, que possui grande quantidade de ácidos graxos de baixo peso molecular. Porém, em gorduras com ácidos graxos não-voláteis, o sabor e odor característicos não surgem juntamente com a deterioração. Nesse caso, é muito importante a medida quantitativa dos ácidos graxos livres para se determinar o grau de deterioração (CECCHI, 2003).

As análises do índice de peróxido determinam a qualidade dos óleos e gorduras. Os peróxidos são produtos iniciais do processo deteriorativo e o índice de peróxido indica o estágio da oxidação (SOUZA, 2003). Podem ser medidos através de técnicas fundamentadas na habilidade de liberar iodo a partir de iodeto de potássio (iodometria) (AOCS, 1998), na oxidação de ferro a íons férrico (SAFETY ASSOCIATES, 1998), ou, ainda, através de reações enzimáticas, métodos físicos ou técnicas cromatográficas (DOBARGANES & VELASCO, 2002).

É muito importante que os resultados sejam examinados em conjunto para possibilitar uma avaliação adequada da qualidade de óleos e gorduras.

2.7. MICROESTRUTURA DO QUEIJO

Na técnica conhecida como microscopia eletrônica de varredura, “Scanning Electron Microscopy” (SEM), um feixe de elétrons muito fino é focalizado na superfície da amostra. Alguns destes elétrons são refletidos e outros produzem elétrons secundários da camada de ouro que reveste a amostra. Estes elétrons secundários de baixa energia produzem uma imagem que é observada em um monitor e fotografada usando uma câmera acoplada. O SEM mostra a superfície da amostra, sendo utilizado para visualizar em detalhes objetos tridimensionais, como por exemplo a rede de proteínas em queijos (KALAB, 2000).

Em geral, produtos lácteos podem ser divididos em dois grupos com relação à sua composição: um consiste principalmente de proteínas do leite, que são caseínas e soro-proteínas e o outro consiste principalmente de gordura. Em sua maioria, os queijos são compostos de ambos, proteínas e gordura, e por isso requerem procedimentos especiais dependendo do objeto de interesse. Microscopia eletrônica tem sido usada para estudar a microestrutura dos componentes individuais de produtos lácteos como micelas de caseína e glóbulos de gordura, e mudanças nestes componentes isoladamente ou por interação com ingredientes durante o processo de fabricação. No estudo de microscopia por SEM é necessário remover a gordura. O queijo é fixado em solução de glutaraldeído, pós-fixado com OsO₄, desidratado em uma série alcoólica, desengordurado com clorofórmio e seco em ponto crítico (COHEN *et al.*, 1981).

O processamento do queijo para obtenção de queijo processado muda a microestrutura do queijo natural e resulta no desenvolvimento de uma nova microestrutura, com um aspecto característico. As junções do coágulo desaparecem e as partículas de gordura tornam-se reemulsificadas. Durante este processo, a membrana original do glóbulo de gordura se desintegra e novas membranas são formadas com proteínas do queijo na superfície das partículas de gordura. Cristais dos sais emulsificantes usados para restaurar a capacidade de emulsificação das proteínas do queijo dissolvem-se durante o processamento, mas cristais de sais emulsificantes não dissolvidos podem ainda estar presentes no produto final (KALAB, 1993).

Durante a fusão da massa, a rede tridimensional de paracaseinato de cálcio do queijo natural é parcialmente desintegrada, formando uma dispersão de paracaseinato de sódio (sol). A conformação da molécula é aberta, carregada e reativa, com boas propriedades

emulsificantes e de ligação de água. Portanto, as moléculas de paracaseinato contribuem para a emulsificação revestindo a superfície das gotículas de gordura livre dispersas e simultaneamente ligando e imobilizando uma grande quantidade de água livre. As soro-proteínas possuem propriedades conformacional e funcional similar as caseínas após serem desnaturadas térmicamente. Assim, durante o processamento, uma emulsão óleo-em-água é formada e interações proteína-proteína são desenvolvidas na fase aquosa. Estas interações são responsáveis pela formação de uma nova matriz (gelificação) durante o resfriamento. Todas as mudanças mencionadas são caracterizadas pelo termo cremificação (“creaming”), resultando em um aumento da viscosidade com o tempo, durante o processamento (DIMITRELI & THOMAREIS, 2004)

A secagem em ponto crítico (CPD) é uma técnica apropriada para secagem da maioria dos produtos lácteos que tenham sido previamente fixados e desidratados em série gradual com etanol ou acetona. Esta técnica é baseada na conversão do CO₂ líquido, no qual a amostra desidratada é imersa em um sistema fechado e com o qual é gradualmente impregnada, passando para forma gasosa pelo aumento da temperatura acima do ponto crítico. Acima desta temperatura, o CO₂ existe somente como um gás. A gordura também pode ser afetada durante a CPD devido ao fato do solvente orgânico e do CO₂ líquido terem propriedades lipofílicas, portanto em produtos com alto teor de gordura é necessário desengordurar a amostra antes da secagem em ponto crítico (COHEN *et al.*, 1981).

As amostras secas são fraturadas antes de serem montadas em artefatos de alumínio (“stubs”) para SEM. Os fragmentos da amostra são montados em stubs para SEM utilizando um cimento condutivo de prata coloidal; também foi relatado o uso de outros agentes para colagem, como brilho para unhas (esmalte). Para examinar a amostra em SEM, a mesma deve ser eletricamente condutiva. Substâncias biológicas em geral apresentam dois problemas em SEM: a água deve ser removida sem destruir a estrutura e a amostra deve ser condutiva. Porém, como material biológico não é condutivo, isto pode ser conseguido ou por procedimentos químicos no qual a amostra é impregnada com ósmio, ou, mais frequentemente por revestimento físico com ouro, ouro-paládio, platina, ou irídio; ocasionalmente, ambos os procedimentos são combinados (COHEN *et al.*, 1981).

Os fragmentos da amostra podem ser revestidos com ouro em altas pressões (13 a 133 mPa, ou, 10⁻⁴ a 10⁻³ torr), o que permite que os átomos de ouro colidam com moléculas de

nitrogênio e se depositem na amostra em várias direções. O revestimento da amostra com ouro (metalização) é feito à temperatura ambiente em evaporador a vácuo, com argônio. Devido à fina microestrutura dos produtos lácteos, para obter a resolução necessária no SEM deve-se usar uma voltagem de 5 a 20 kv (COHEN *et al.*, 1981).

A microscopia eletrônica pode registrar diferenças na ultraestrutura da matriz protéica em vários queijos processados. Alguns queijos processados contêm minúsculos cordões de proteínas, enquanto outros consistem de proteínas na forma de minúsculas partículas individuais. Cristais de sais emulsificantes aparecem como marcas ou fendas ou agulhas e cristais de fosfato de cálcio aparecem como agregados (KALAB, 1993).

Espaços vazios na matriz protéica indicam a presença inicial de partículas de gordura e seus agregados na amostra, que foram extraídos da amostra durante a preparação da mesma para SEM (TAMIME *et al.*, 1990).

A dimensão dos glóbulos de gordura é indicativa da extensão da emulsificação. Quanto menores os glóbulos de gordura, maior é a emulsificação. Também a microestrutura da matriz protéica é indicativa da extensão da emulsificação, durante a qual a caseína primeiramente se desagrega e subseqüentemente forma estruturas como cordões (CARIC *et al.*, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas utilizadas na fabricação do queijo de manteiga foram: (1) leite pasteurizado desnatado, (2) cultura lática, (3) manteiga de garrafa, e (4) cloreto de sódio. O leite pasteurizado desnatado foi obtido na Cooperativa dos Produtores de Leite de Campinas (CLC), em Jaguariúna/SP. Para a desacidificação da massa, foi utilizado leite pasteurizado desnatado tipo A comercial, adquirido em um supermercado de Campinas. Foi empregada cultura lática acidificante do tipo “O”, composta de *Lactococcus lactis lactis* e *Lactococcus lactis cremoris*. A manteiga de garrafa foi proveniente de um lote processado na região Nordeste, de um laticínio da Bahia da marca Borges. O cloreto de sódio utilizado foi adquirido em comércio local.

3.2. FABRICAÇÃO DA MASSA

O leite desnatado pasteurizado foi aquecido até 30°C e inoculado com 1,5% de fermento láctico permanecendo em tanque de inox por 18h. Após a obtenção da coalhada, a mesma foi submetida ao corte e agitação lenta e aquecimento até 50°C. Em seguida foi feita a dessoragem. Para remover o excesso de acidez, a massa foi submetida a duas lavagens com água e centrifugação em centrífuga portátil Muller (aproximadamente 3000 rpm). A massa foi então homogeneizada, porcionada, embalada, etiquetada e congelada.

3.3. FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE MANTEIGA

Foram realizados três experimentos (blocos aleatorizados), cada um englobando um tratamento (alteração de pH) com seis níveis (5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5 e 5,6), resultando em 18 ensaios.

A metodologia de fabricação utilizada nos experimentos, foi definida com base em experimentos exploratórios realizados na planta piloto de laticínios do departamento de tecnologia de alimentos da Unicamp. Após o descongelamento da massa a 4°C por 48h, a mesma foi homogeneizada, pesada, e levada ao aquecimento com leite desnatado pasteurizado.

O volume de leite desnatado foi determinado em função do pH desejado e do pH da massa após o descongelamento. A adição de leite à massa teve por objetivo remover a

acidez e incorporar cálcio à massa caseira desmineralizada, o que conseqüentemente propiciou a alteração de pH. A adição do leite foi realizada sob aquecimento e agitação contínua. Esta operação foi repetida até que o pH desejado fosse alcançado. Em seguida, iniciou-se novamente o aquecimento até 60°C, seguido de dessoragem. A massa obtida foi aquecida gradualmente até o início da fusão, sendo então adicionado o NaCl. A mistura foi submetida à agitação constante sob temperatura de 85-90°C por cerca de 5 minutos, até a fusão completa. Em seguida, foi adicionada a manteiga de garrafa, e dado continuidade ao cozimento da massa sob agitação constante e temperatura de 85-90°C durante 25 minutos, para que o queijo fundido adquirisse consistência pastosa firme. Os queijos foram enformados e mantidos a temperatura ambiente por duas horas, desenformados e resfriados a 4°C por 3 horas. Em seguida, foram colocados em embalagens plásticas cryovac[®], embalados a vácuo e armazenados a 4°C até o momento das análises. O fluxograma de fabricação do queijo é mostrado na figura 3.

3.4. PREPARO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO PARA AS ANÁLISES

As amostras de queijo foram tomadas aleatoriamente. Para todas as análises, foram retiradas e desprezadas fatias de aproximadamente 0,5cm das laterais e das partes superior e inferior, sendo a parte restante (central) preparada em função de cada tipo de análise. Para as análises de composição química, pH, acidez titulável, óleo-livre e capacidade de retenção de água, a parte central da peça de queijo foi cortada em cubos pequenos e triturada em multiprocessador, até obtenção de partículas de 2-3 mm. O material assim obtido foi homogeneizado manualmente e acondicionado em frascos de vidro, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração (7°C) até o momento das análises. Para as análises de perfil de textura instrumental, cor instrumental, e microestrutura, foram adotados procedimentos de preparação de amostras diferenciados, detalhados nos itens 3.6.3, 3.6.4 e 3.7.

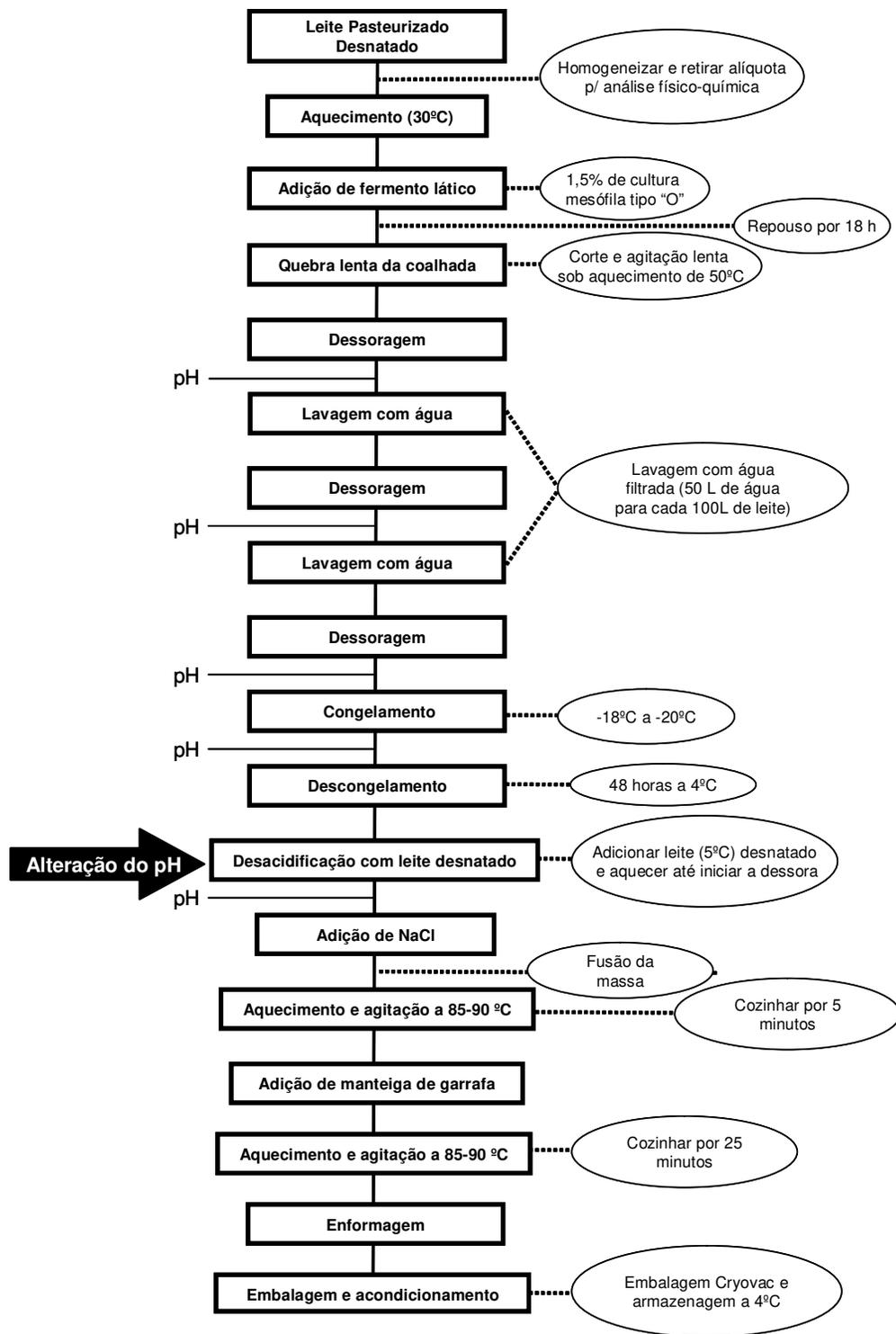


Figura 3. Fluxograma de fabricação do queijo de manteiga.

3.5. ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.5.1. Análises do leite e manteiga de garrafa

No leite, foram determinados: pH, pelo método potenciométrico, utilizando pH-metro (Marca Digimed, modelo DM20); acidez titulável, segundo procedimento oficial da AOAC (1997); gordura, pelo método de Gerber, conforme normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), extrato seco total, pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C por 16 horas (AOAC), e nitrogênio total (NT), pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento oficial da AOAC (1997). Os valores de nitrogênio foram multiplicados por 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína.

A manteiga de garrafa foi avaliada quanto aos seguintes parâmetros: umidade, segundo procedimento oficial da AOAC (1997); gordura, pelo método de Mojonnier, segundo procedimento oficial da AOAC (1995); índice de peróxido (AOCS, 1998); ácidos graxos livres (AOCS, 1998); ponto de fusão (AOCS, 1998); perfil de sólidos (AOCS, 1998); composição de ácidos graxos (AOCS, 1998) usando um Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, Coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm e as condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo coluna = 1,00 mL/min.; Velocidade linear = 24 cm/seg; Temperatura do detector: 280°C; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura Forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1,0 µL.

3.5.2. Análises do queijo

No 5º dia de armazenamento refrigerado, os queijos foram avaliados em triplicata em relação aos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, pelo método potenciométrico, utilizando pH-metro (Marca Digimed, modelo DM20); acidez titulável, segundo procedimento oficial da AOAC 971.19 (1995); umidade, segundo procedimento oficial da AOAC 926.08 (1997); nitrogênio total (NT), pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento oficial da AOAC 991.20 (1997); nitrogênio não-protéico (NNP) pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento oficial da AOAC (1997); nitrogênio não caseíco (NNC), conforme descrito por BYNUM & BARBANO (1985) seguido do método de Kjeldahl segundo procedimento oficial da AOAC (1997); proteína total, multiplicando-se o

teor de NT pelo fator de conversão 6,38; proteína real, calculada como (NT-NNP) x 6,38; gordura, pelo método de Gerber, conforme normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985); cálcio total (CT), pelo método de digestão úmida com ácido nítrico, seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida (TARAS, 1971); cálcio solúvel em água (CSA), conforme metodologia descrita por METZGER *et al.* (2001), seguida de digestão úmida com ácido nítrico e titulação com EDTA na presença de murexida (Taras, 1971); cálcio não-solúvel em água (CNSA), por diferença entre os teores de CT e CSA, conforme descrito por METZGER *et al.* (2001) seguida de digestão úmida com ácido nítrico e titulação com EDTA na presença de murexida (TARAS, 1971); sal, pelo método de Volhard (RICHARDSON, 1985); índice de peróxido (AOCS, 1998); ácidos graxos livres (AOCS, 1998).

3.6. MUDANÇAS OCORRIDAS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

3.6.1. Avaliação de pH e acidez titulável

Nos dias 5, 20 e 35 do armazenamento refrigerado a 4°C, o pH e a acidez titulável foram avaliados. O pH do queijo foi determinado em triplicata, pelo método potenciométrico, utilizando pH-metro, Marca Digimed, modelo DM20, previamente calibrado conforme AOAC 935.17 (1995). A determinação de acidez titulável do queijo foi realizada em triplicata, conforme AOAC 971.19 (1995)

3.6.2. Nitrogênio solúvel a pH 4,6 e em TCA 12%

Os teores de nitrogênio solúvel em tampão acetato a pH 4,6 (NNC) de acordo com BYNUM & BARBANO (1985), e em ácido tricloroacético 12% (NNP) segundo procedimento oficial da AOAC (1997), foram determinados nos 5°, 20° e 35° dias de armazenamento a 4°C

O teste foi realizado em triplicata, seguido por macro Kjeldahl (AOAC 991.21). Para o cálculo dos índices extensão e profundidade da proteólise do queijo empregou-se as fórmulas citadas por FURTADO & PARTRIDGE (1988) e WOLFSCHOON-POMBO (1983).

$$\text{Extensão de proteólise} = \frac{\% \text{ nitrogênio solúvel a pH 4.6} \times 100}{\% \text{ nitrogênio total}}$$

$$\text{Profundidade de proteólise} = \frac{\% \text{ nitrogênio solúvel em TCA 12\%} \times 100}{\% \text{ nitrogênio total}}$$

3.6.3. Análise de perfil de textura

A análise de Perfil de Textura Instrumental foi realizada nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado. Para a realização da análise, foram retiradas amostras cilíndricas conforme descrito por CHAVES (1997). De cada peça de queijo, 2 fatias de 30mm de espessura foram destinadas a este teste. Destas fatias foram retirados 12 cilindros, sendo 6 deles da região externa do queijo e o restante da região central. O teste foi realizado com 10 cilindros, sendo 5 de cada uma das regiões. Os cilindros foram retirados com auxílio de uma sonda (com diâmetro de 20mm e altura de 24mm). As amostras foram embaladas individualmente em filme de PVC e acondicionadas dentro de saco plástico devidamente fechado para evitar a desidratação das amostras. Com o objetivo de equilibrar a temperatura das amostras e mantê-la constante durante todo o teste, as amostras foram mantidas a 30°C em estufa durante 3 horas, e, no momento do teste, foram mantidas em caixa térmica de isopor.

O Perfil de textura (TPA) foi determinado utilizando-se o texturômetro TAXT_{2i} Stable Micro Systems (SMS). O equipamento foi operado pelo programa Texture Expert®. As condições utilizadas no programa do texturômetro foram: (1) Velocidade pré-teste = 1,0 mm/seg; (2) Velocidade do teste = 1,0 mm/seg; (3) Velocidade pós-teste = 1,0 mm/seg; (4) Distância de compressão = 10 mm, equivalente a 40% de compressão; (5) Força de contato = 10,0g; e (6) Dispositivo de compressão = cilindro metálico com 35 mm de diâmetro (SMS P/35).

3.6.4. Avaliação da cor

A cor instrumental foi avaliada nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado. Para a amostragem foi retirada de cada peça de queijo, 1 fatia de 10mm de espessura. Cada fatia foi embalada individualmente em filme de PVC e mantida a 30°C em estufa durante 3

horas; no momento do teste, as fatias foram mantidas em caixa térmica de isopor. Foram realizadas 4 medições de cor de cada amostra e calculadas as médias.

Para a avaliação instrumental da cor foi utilizado um colorímetro da marca Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA, USA), modelo Color Quest II. A escala de cor utilizada foi CIE Lab ($L^*a^*b^*$), com iluminante D65 (6900oK), e abertura de 10° . O valor de L^* representa a luminosidade da amostra, variando de preto (0) a branco (100); o valor de a^* representa a cor, variando de vermelho (+) a verde (-); e o valor de b^* representa a cor, variando de amarelo (+) a azul (-). O aparelho foi calibrado no modo de reflectância especular excluída usando placas de referência branca (C6299 Hunterlab Color Standard) e cinza (C6299G Hunterlab Color Standard).

3.6.5. Óleo livre

A formação de óleo livre foi avaliada em triplicata nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado, pelo método de Gerber modificado, conforme KINDSTEDT & FOX (1991). Os resultados foram expressos em função da porcentagem de gordura total do queijo, de acordo com a equação:

$$\% \text{ óleo livre} = \frac{\% \text{ óleo livre do queijo} \times 100}{\% \text{ gordura do queijo}}$$

3.6.6. Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água foi avaliada em duplicata nos dias 1, 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado, pelo método descrito por GUO & KINDSTEDT (1995). A amostra homogeneizada (160g) foi centrifugada a $12500 \times g$ por 75min a 25°C em centrifuga refrigerada de alta velocidade. A fração líquida foi transferida quantitativamente para uma proveta graduada e, após total remoção da camada de óleo, a fase aquosa foi pesada.

3.6.7. Ácidos graxos livres no queijo

A análise de ácidos graxos livre foi realizada em triplicata nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado. Inicialmente foi feita a extração dos lipídeos do queijo com éter de petróleo em aparelho de extração Soxhlet por seis horas, segundo a AOAC (1984). Em seguida, determinou-se o teor de ácidos graxos livres na fase gordurosa, utilizando a metodologia da AOCS Ca 5a-40 (1998), com modificações: utilizou-se 50mL de álcool etílico neutralizado, 1g de amostra e solução titulante NaOH 0,1 N, padronizada com padrão primário.

3.6.8. Índice de peróxidos

A análise de índice de peróxidos foi realizada em triplicata nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado. Inicialmente foi feita a extração dos lipídeos do queijo com éter de petróleo em aparelho de extração Soxhlet por seis horas, segundo AOAC (1984). Em seguida, determinou-se o índice de peróxidos utilizando a metodologia da AOCS Cd 8b-90 (1998)

3.7. MICROESTRUTURA E AVALIAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE GORDURA

A microestrutura das amostras do queijo de manteiga foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no 45º dia após a fabricação, conforme metodologia descrita por FERREIRA (2004). Inicialmente, as amostras de queijo foram equilibradas a temperatura de 20°C e cortadas com lâminas de aço inox no tamanho 2,5 x 2,5 x 5mm. A fixação foi feita com uma solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M/ pH 7,10 e por 1 noite (15 horas) a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1M (2 x 15 min) e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 8 horas. Após nova lavagem com tampão fosfato 0,1M (2 x 15 min), as amostras foram desidratadas gradualmente usando etanol 70% (2 x 15 min), 90% (2 x 15 min), 95% (2 x 10 min) e 100% (3 x 10 min), e acetona 100% (2 x 30 min). Foi então realizada a secagem das amostras, em secador de ponto crítico CPD030 (Bal-tec AG, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as amostras foram fraturadas a temperatura ambiente, montadas em *stubbs* de alumínio com cola de prata, metalizadas com ouro usando metalizador SCD 050 (Bal-tec

AG, Balzers, Liechtenstein) e levadas para observação em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5800LV a 10kV. As fotomicrografias dos queijos de manteiga com os diferentes níveis de pH de fusão (5,1 a 5,6), foram impressas e o tamanho dos glóbulos de gordura (espaços vazios) foram medidos com uma régua (em centímetros) de forma aleatória. Foi calculado o tamanho médio de cada espaço vazio e o valor foi convertido de cm para μ .

3.8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O tratamento com seis níveis de variação foi agrupado em três blocos completos e aleatorizados, resultando em um total de dezoito ensaios.

O fator estudado foi a variação do pH de fusão na faixa de 5,1 a 5,6. Os resultados de composição foram analisados através do procedimento ANOVA. Para verificar a diferença entre as médias foi realizado teste de Tukey. Para as análises de pH, acidez, proteólise, formação de óleo livre, textura instrumental e cor realizadas nos dias 5, 20 e 35 de armazenamento refrigerado, foi adotado um delineamento do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado.

A análise estatística foi realizada através software SYSTAT 8.0 (Statistics. 1998. SYSTAT user's guide. SPSS Inc., Chicago).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO DO LEITE

A tabela 2 mostra a composição média do leite desnatado pasteurizado utilizado nos experimentos.

Tabela 2. Composição média (n = 3) e desvio padrão do leite desnatado pasteurizado utilizado nos experimentos.

Componente	Leite
Sólidos totais %	9,1 (\pm 0,77)
Gordura %	0,2 (\pm 0,37)
Proteína total %	3,6 (\pm 0,63)
Acidez, °Dornic	16,5 (\pm 0,84)
pH	6,78 (\pm 0,035)

O leite desnatado pasteurizado utilizado na fabricação do queijo de manteiga encontrava-se de acordo com os padrões de identidade e qualidade da legislação brasileira (BRASIL, 2002).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA MANTEIGA DE GARRAFA

A tabela 3 mostra as características físico-químicas da manteiga de garrafa usada na fabricação do queijo de manteiga.

Tabela 3. Características físico-químicas da manteiga de garrafa

Característica	Manteiga
Acidez (% ácido oléico)	0,7
Índice de peróxido (meq O ₂ / kg)	2,5
Ponto de Fusão (°C)	35,3
Gordura (%)	99,20
Umidade (%)	0,15

Os resultados das análises de caracterização físico-química da manteiga de garrafa estão de acordo com a legislação brasileira, que determina o mínimo de matéria gorda de 98,5%, umidade máxima de 0,3 % e acidez máxima 2,0 % (BRASIL, 2001).

A tabela 4 apresenta o comportamento da a manteiga de garrafa em várias temperaturas. Na faixa de 25 a 35°C observa-se baixo teor de sólidos, assim, o armazenamento do queijo de manteiga à temperatura ambiente pode ser um dos fatores que contribuem para a excessiva liberação de óleo deste queijo. No entanto na faixa de refrigeração (5 a 15°C) a manteiga de garrafa apresenta alto teor de sólidos e menos suscetível à liberação de óleo.

O perfil de sólidos reflete grande influência na espalhabilidade dos produtos, além da aparência, propriedades organolépticas e na exsudação do óleo (LIDA & ALI, 1998).

Tabela 4. Perfil de sólidos da amostra de manteiga de garrafa.

Temperatura °C	% Sólidos
5	63,9
10	57,1
15	45,3
20	26,7
25	15,3
30	8,1
35	2,3

A composição dos ácidos graxos da manteiga de garrafa (Tabela 5), imprescindível ao estabelecimento da sua identidade, apresentou resultados similares aos encontrados na literatura. O teor de ácidos graxos trans foi superior ao encontrado por SMITH *et al.* (1978), de 1,8-2,0% e, inferior aos encontrados por AMBROSIO *et al.* (2003), na faixa de 3,69-3,71. Segundo SOMMERFELD (1983), é previsível uma variabilidade de 4-11 % destes isômeros, uma vez que a constituição da gordura pode ser afetada por condições locais e sazonais. Os ácidos graxos trans estão presentes naturalmente em gorduras originadas de animais ruminantes, como resultado do processo de biohidrogenação na flora microbiana do rúmen. O teor de ácidos graxos trans no leite varia de 1,5 a 6,5%. O isômero

trans predominante corresponde ao C18:1 conhecido como ácido trans eláidico (FRITSCHÉ & STEINHART, 1998). A presença dos ácidos graxos trans contribui na mudança de propriedades físicas e na forma de cristalização (ERICKSON, 1995).

Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%m/m) da amostra de manteiga de garrafa

Ácido graxo	%
Capróico (6:0)	1,51
Caprílico (8:0)	1,06
Cáprico (10:0)	2,39
Láurico (12:0)	2,87
Mirístico (14:0)	11,30
Pentadecanóico (15:0)	1,67
Palmítico (16:0)	32,80
Palmitoléico (16:1)	1,83
Margárico (17:0)	1,26
Esteárico (18:0)	11,92
Elaídico (18:1 Trans)	2,39
Oléico (18:1)	21,15
Linoelaídico (18:2 Trans)	0,15
Linoléico (18:2)	1,38
Translinolênico (18:3 Trans)	0,22
Linolênico (18:3)	0,56
Estearidônico (18:4)	0,77
Araquídico (20:0)	0,42
Gadoléico (20:1)	0,19
Behênico (22:0)	0,17
Outros	3,99

4.3. COMPOSIÇÃO DOS QUEIJOS

A composição média dos queijos é mostrada na tabela 6. Em relação à umidade e gordura em base seca (GBS), os queijos apresentaram valores de acordo com a legislação brasileira, sendo a umidade máxima permitida de 54,9% e gordura em base seca variando entre 25-55%. Os teores de proteína total, gordura, umidade e gordura em base seca (GBS), não variaram significativamente entre os queijos ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre os queijos quanto ao teor de cálcio total ($p = 0,001$), cálcio solúvel ($p = 0,002$), pH final do queijo ($p < 0,001$), acidez titulável ($p < 0,001$) e sal ($p = 0,036$).

Em relação às diferenças no teor de cálcio total, os queijos com pH de fusão 5,1 e 5,2 diferiram significativamente do queijo com pH de fusão 5,6. Em geral, o aumento do pH de fusão resultou no aumento do cálcio total, o que ocorreu provavelmente devido às diferenças do pH de drenagem do soro, temperatura de desacidificação da massa, onde ocorre a coagulação quando é incorporado um volume determinado de leite para a desacidificação da mesma, além de um volume diferenciado de leite para cada nível de pH, (Tabela 7). Entretanto, não houve diferença significativa no teor de CNSA, relação CS/CT.

Em relação ao teor de sal (NaCl), a amostra 5,1 diferiu significativamente da amostra 5,4 ($p = 0,049$), possivelmente pelo fato da amostra 5,4 ter apresentado umidade um pouco mais elevada que as demais amostras, principalmente em relação à amostra 5,1.

Tabela 6. Composição média (n = 3) dos queijos com seis níveis de pH.

Componente	pH de fusão					
	5,1	5,2	5,3	5,4	5,5	5,6
Umidade (%)	45,29 ± 3,35 ^a	45,32 ± 0,53 ^a	47,02 ± 2,02 ^a	49,83 ± 3,55 ^a	49,38 ± 1,23 ^a	48,54 ± 2,68 ^a
Gordura (%)	23,00 ± 1,32 ^a	23,67 ± 1,15 ^a	22,50 ± 0,87 ^a	21,67 ± 3,21 ^a	22,17 ± 1,04 ^a	22,33 ± 0,76 ^a
GBS ¹ (%)	42,37 ± 0,73 ^a	43,27 ± 1,70 ^a	42,78 ± 0,86 ^a	42,39 ± 3,42 ^a	45,08 ± 3,32 ^a	44,42 ± 3,58 ^a
Proteína total (%)	27,53 ± 0,64 ^a	27,08 ± 0,47 ^a	26,64 ± 1,21 ^a	26,13 ± 1,46 ^a	27,07 ± 0,16 ^a	26,57 ± 0,29 ^a
Caseína (%)	26,74 ± 0,49 ^a	26,19 ± 0,46 ^a	25,65 ± 1,27 ^a	25,14 ± 1,59 ^a	25,93 ± 0,08 ^a	25,36 ± 0,30 ^a
Sal (%)	2,13 ± 0,08 ^a	1,98 ± 0,11 ^{a,b}	2,02 ± 0,11 ^{a,b}	1,760 ± 0,18 ^b	1,79 ± 0,05 ^{a,b}	1,86 ± 0,14 ^{a,b}
Cálcio total (%)	1,660 ± 0,076 ^a	1,800 ± 0,153 ^a	1,960 ± 0,087 ^{a,b}	2,190 ± 0,175 ^{a,b}	2,520 ± 0,251 ^{a,b}	2,510 ± 0,451 ^b
Cálcio solúvel (%)	1,160 ± 0,284 ^a	1,390 ± 0,172 ^{a,b}	1,320 ± 0,235 ^{a,b}	1,250 ± 0,270 ^{a,b}	1,550 ± 0,268 ^{b,c}	1,690 ± 0,285 ^c
CS/CT ²	0,700 ± 0,178 ^a	0,780 ± 0,102 ^a	0,680 ± 0,146 ^a	0,560 ± 0,077 ^a	0,620 ± 0,101 ^a	0,680 ± 0,126 ^a
CNSA ³ (%)	0,496 ± 0,304 ^a	0,403 ± 0,208 ^a	0,641 ± 0,322 ^a	0,946 ± 0,095 ^a	0,972 ± 0,311 ^a	0,820 ± 0,406 ^a
CNSA/caseína ⁴ ,	1,854 ± 1,132 ^{a,b}	1,539 ± 0,792 ^a	2,497 ± 1,198 ^{a,b}	3,764 ± 0,482 ^b	3,750 ± 1,198 ^b	3,233 ± 1,570 ^{a,b}
Acidez tit. (% ácido láctico)	0,280 ± 0,070 ^a	0,310 ± 0,065 ^a	0,360 ± 0,080 ^{a,b}	0,550 ± 0,042 ^b	0,570 ± 0,081 ^b	0,500 ± 0,058 ^{b,c}
pH final do queijo	5,15 ± 0,12 ^a	5,28 ± 0,09 ^{a,b}	5,34 ± 0,11 ^{a,b}	5,44 ± 0,09 ^{c,b}	5,56 ± 0,03 ^c	5,63 ± 0,07 ^c

^{a, b, c} Média seguidas de letras iguais numa mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de significância de 5%.

¹Gordura em base seca. ²Relação Cálcio solúvel/Cálcio total. ³Cálcio não solúvel em água. ⁴Relação cálcio não solúvel em água/caseína.

A tabela 7 apresenta o volume médio de leite adicionado à massa para desacidificação, temperatura de desacidificação, pH da massa após drenagem do soro e pH do soro.

Tabela 7. Volume médio (n = 3) de leite adicionado à massa para desacidificação, temperatura de desacidificação, pH da massa e do soro após drenagem do soro.

Amostra	Volume de leite (mL)	Temperatura de desacidificação (°C)	pH da massa após drenagem do soro	pH do soro drenado
5,1	4000	43,3	5,15	5,05
5,2	4600	47,0	5,23	5,12
5,3	5100	54,3	5,31	5,20
5,4	8313	64,0	5,42	5,31
5,5	9273	69,3	5,51	5,42
5,6	9873	71,0	5,63	5,50

Como esperado, houve um aumento do volume de leite necessário para desacidificar a massa para que essa atingisse pHs maiores de fusão. O pH do soro drenado após a desacidificação com o leite, também apresentou comportamento semelhante; quanto maior o pH de fusão, maior o pH do soro drenado.

À medida que o pH de fusão aumentou, a temperatura de desacidificação aumentou, o que pode ser explicado pelo fato do sistema protéico ser mais instável termicamente a pHs mais baixos.

4.4. MICROESTRUTURA E AVALIAÇÃO DO TAMANHO DOS GLÓBULOS DE GORDURA

A dimensão dos glóbulos de gordura é indicativa da extensão da emulsificação. O tamanho dos glóbulos de gordura diminui com o aumento da emulsificação. A microestrutura da matriz protéica também é indicativa da extensão da emulsificação, durante a qual a caseína primeiramente se desagrega e subsequente forma estruturas semelhantes a cordões (CARIC *et al.*, 1985).

Os fatores que contribuem para a formação da estrutura após o processamento dos queijos fundidos e durante o resfriamento incluem a solidificação da gordura e interações proteína-proteína, as quais resultam na formação de uma nova matriz. Os glóbulos de

gordura emulsificados tornam-se uma parte integrante da matriz devido à interação da membrana que os envolve com a matriz de paracaseinato. O tamanho dos glóbulos de gordura varia com o grau de emulsificação, que é regulado pela formulação e pelas condições de processamento. O tamanho do glóbulo de gordura é importante pois, influencia a firmeza do produto final e a habilidade da gordura para tornar-se livre e contribuir para a saída de óleo (“oiling-off”) quando o queijo processado é aquecido. Geralmente, para uma dada formulação, a redução no diâmetro médio do glóbulo de gordura emulsificado resulta em queijos processados que são firmes e exibem uma baixa tendência à saída de óleo sob aquecimento (FOX *et al.*, 2000)

As fotomicrografias dos queijos em aumento de 500 vezes (Figura 4), revelaram que os queijos de manteiga apresentaram uma matriz protéica contínua, permeada por glóbulos de gordura, cujo tamanho e distribuição foi função do pH de fusão. Nos pHs 5,1 a 5,3 a matriz apresentou-se mais compacta, e nos pHs 5,4 a 5,6, a matriz apresentou uma aparência mais esponjosa. Os tamanhos médios dos glóbulos de gorduras para os pHs de fusão 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, e 5,6 foram, respectivamente, 23,75 μ , 24,38 μ , 36,9 μ , 21,9 μ , 10 μ e 18,75 μ . O queijo fundido a pH 5,5 apresentou uma distribuição mais uniforme de glóbulos de gordura com diâmetros menores na matriz protéica, o que indica que, neste pH, a gordura presente no queijo encontra-se mais emulsificada.

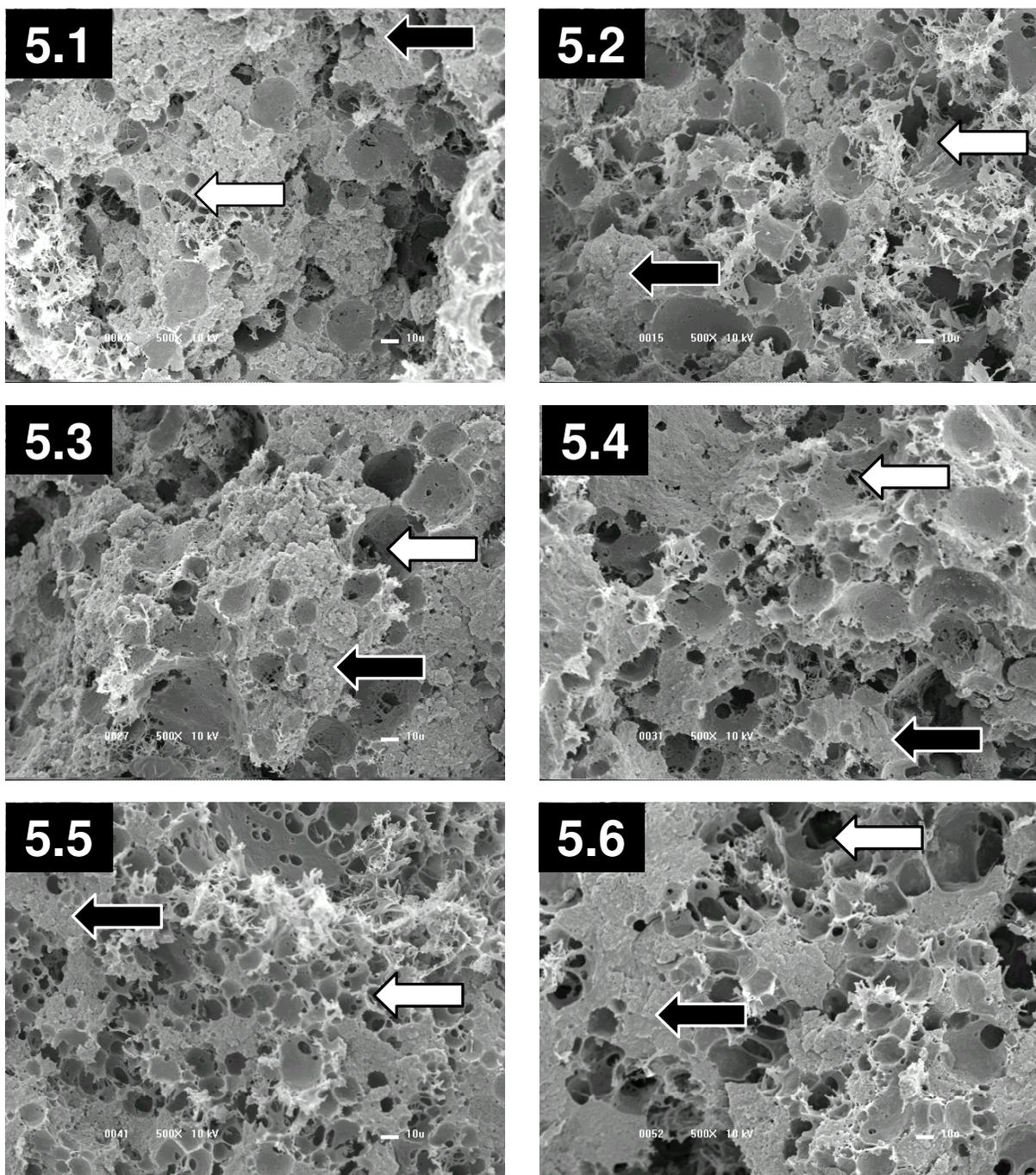


Figura 4. Fotomicrografias do queijo de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6). O valor de pH está indicado no canto superior esquerdo de cada figura. Setas brancas: espaços ocupados pelos glóbulos de gordura. Setas pretas: matriz protéica. Aumento de 500 x, a10 kv.

4.5. MUDANÇAS OCORRIDAS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

4.5.1. Evolução do pH e acidez titulável

Os pHs de fusão e o tempo de armazenamento tiveram influência significativa no pH final dos queijos e na acidez titulável (Tabela 8). As figuras 5A e 5B, mostram respectivamente, o comportamento do pH e da acidez titulável dos queijos durante 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C. O aumento do pH de fusão resultou em aumento do pH do queijo. Durante o período de armazenamento, houve um leve declínio nos valores de pH, e um leve aumento na acidez titulável.

Tabela 8. Quadrados médios e probabilidades para evolução do pH e acidez titulável dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	pH queijo		Acidez titulável	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	0,218	< 0,001	0,183	< 0,001
Processo	2	0,008	0,354	0,006	0,546
Erro	10	0,007		0,010	
Tempo	2	0,087	< 0,001	0,015	0,003
Interação: pH de fusão x Tempo	10	0,003	0,436	0,001	0,702
Interação: Processo x Tempo	4	0,015	0,010	0,009	0,006
Erro	20	0,003		0,002	

Apesar de estatisticamente significativas, as mudanças de pH e acidez titulável com o tempo podem ser consideradas desprezíveis do ponto de vista prático. Por exemplo, o pH final da amostra com pH de fusão 5,5, teve um declínio de 5,55 para 5,40 e aumento da acidez titulável de 0,57 para 0,67% de ácido láctico, ou seja um declínio 0,15 e aumento de 0,10 respectivamente, durante 35 dias de armazenamento refrigerado. Lembrando ainda que, essas pequenas variações ocorreram nas amostras de pH de fusão 5,4-5,6 (veja Figura 5), ressaltando que nas demais amostras os valores mantiveram-se praticamente constantes.

A manutenção do pH e acidez titulável dos queijos em níveis praticamente constantes, era esperada, tendo em vista o tempo e a temperatura aos quais o queijo de manteiga é submetido durante o processamento

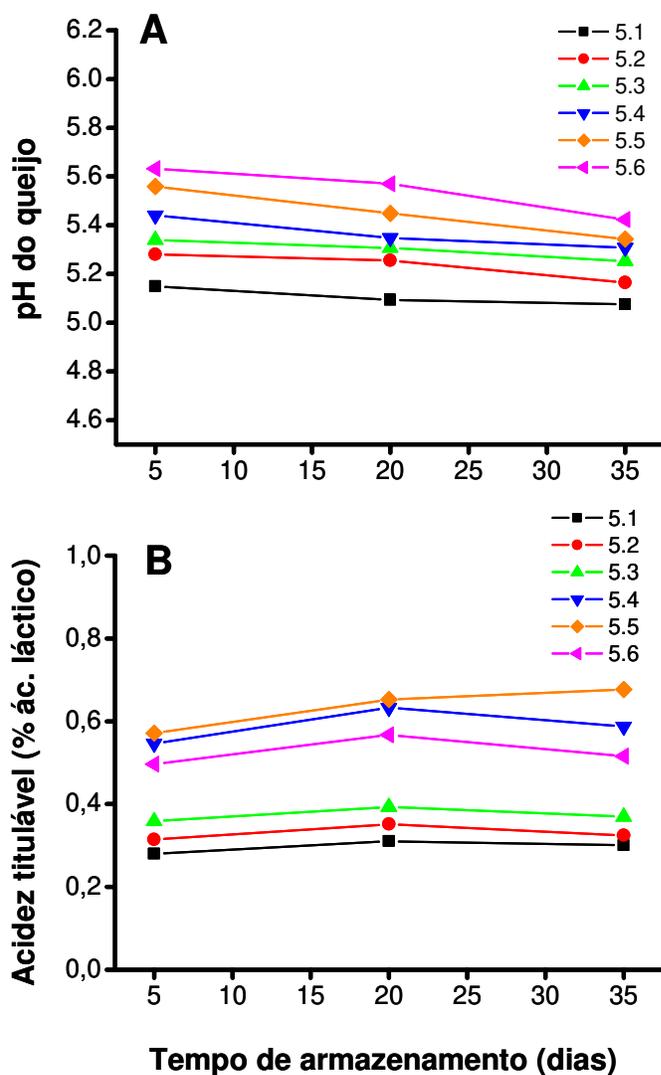


Figura 5. Evolução do pH dos queijos (A) e da acidez titulável (B), durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

4.5.2. Extensão e profundidade da proteólise

O índice de extensão da proteólise está fundamentalmente relacionado com as proteinases naturais do leite e do agente coagulante, as quais degradam a proteína em peptídeos de alto peso molecular (FOX, 1988). A evolução dos níveis de nitrogênio solúvel a pH 4,6 é um indicativo da proteólise primária, e no queijo de manteiga, como não houve adição do agente coagulante, a proteólise ocorreu possivelmente pela ação da protease alcalina do leite (plasmina) ou por ação de proteases microbianas provenientes de microorganismos psicrotróficos, e microorganismos termodúricos que sobreviveram à pasteurização do leite e ao processo de cocção do queijo de manteiga.

A figura 6 mostra a evolução da extensão da proteólise do queijo de manteiga. O pH de fusão do queijo ($p = 0,002$) e o tempo de armazenamento ($p = 0,001$) afetaram significativamente a extensão da proteólise. Quanto maior o pH de fusão, maior foi a extensão da proteólise. Houve um aumento da extensão da proteólise com o tempo de armazenamento. Entretanto é importante ressaltar que a extensão da proteólise no queijo de manteiga foi bastante baixa quando comparada a outros queijos. Por exemplo, o queijo prato, estudado por HENRIQUE (2005), apresentou 20% de extensão de proteólise em 58 dias de armazenamento, enquanto que em nosso estudo, o queijo de manteiga atingiu 5%, valor similar aos encontrado por FERREIRA (2004) para queijo mussarela fabricado por ultrafiltração (UF) e acidificação direta (AD). Isso significa que o queijo de manteiga sofre pouca proteólise primária durante o período de armazenamento refrigerado.

O índice de profundidade de proteólise, medido pelo teor de N solúvel em TCA 12% está relacionado principalmente com a atividade enzimática da cultura láctica empregada na fabricação do queijo e de possíveis contaminantes, que degradam os peptídeos de alto peso molecular a peptídeos de baixo peso molecular.

Como mostra a tabela 9, o pH de fusão não afetou significativamente a profundidade de proteólise ($p = 0,106$). Entretanto, o aumento do tempo de armazenamento resultou em aumento do índice de profundidade da proteólise ($p < 0,001$), como pode ser observado na figura 7. Contudo, essa possível ação enzimática foi insignificante tendo em vista o leve aumento nos níveis da profundidade da proteólise e a manutenção do pH e da acidez titulável dos queijos praticamente constantes ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 9. Quadrados médios e probabilidades para evolução da extensão de proteólise (NS pH 4,6) e profundidade de proteólise (NS TCA 12%) dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	NS pH 4,6		NS TCA 12%	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	2,511	0,002	0,150	0,106
Processo	2	0,552	0,209	0,136	0,159
Erro	10	0,300		0,061	
Tempo	2	4,049	< 0,001	2,725	< 0,001
Interação: pH de fusão x Tempo	10	0,041	0,543	0,062	0,212
Interação: Processo x Tempo	4	0,237	0,005	0,236	0,003
Erro	20	0,045		0,041	

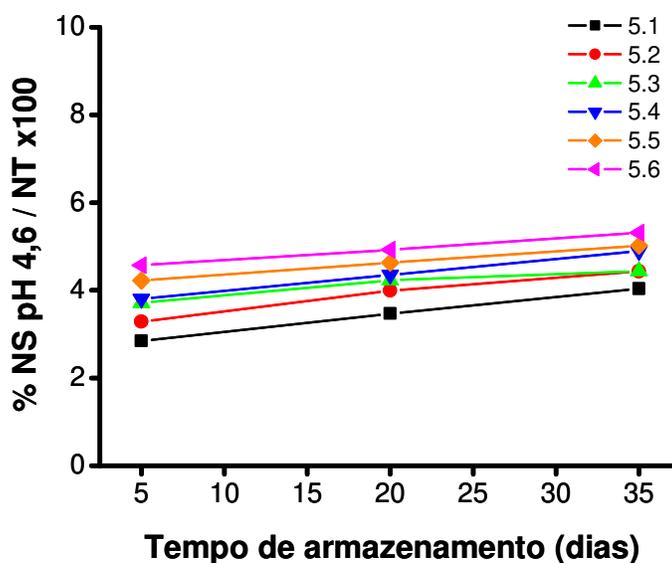


Figura 6. Evolução da extensão da proteólise (% nitrogênio solúvel a pH 4,6/ % nitrogênio total x 100⁻¹) dos queijos de manteiga com seis níveis de pH de fusão, durante 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

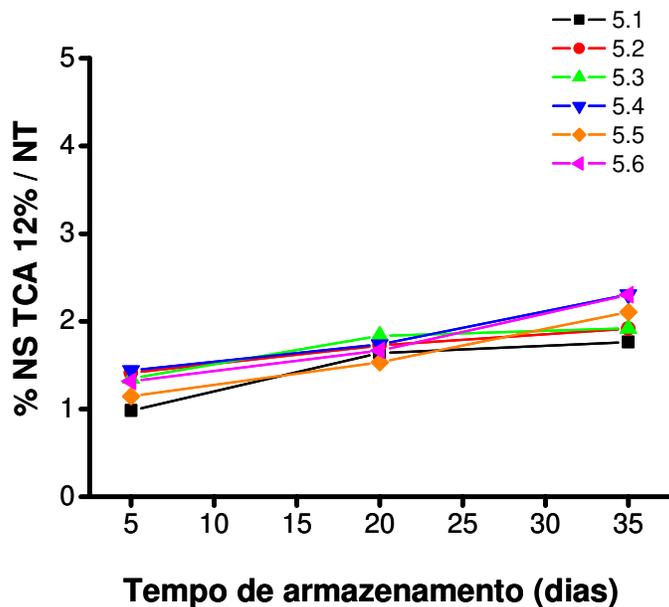


Figura 7. Evolução da profundidade da proteólise (% nitrogênio solúvel em TCA 12%/ % nitrogênio total $\times 100^{-1}$) dos queijos com seis níveis de pH de fusão, durante 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

4.5.3. Lipólise e rancidez oxidativa

A tabela 10 mostra os quadrados médios e probabilidades para a evolução da formação de AGL (%) e peróxidos (meq/kg). O pH de fusão não afetou significativamente a formação de ácidos graxos livres ($p = 0,550$) e a formação de peróxidos ($p = 0,034$). Houve um aumento significativo dos níveis de ácidos graxos livres ($p < 0,001$) e peróxidos ($p < 0,001$) ao longo do período de armazenamento. Contudo, o teor de ácidos graxos livres foi baixo, quando comparado ao teor de AGL em Cheddar que foi de cerca de 2 e 3 % aos 28 e 56 dias de armazenamento, respectivamente (HICKEY *et al.*, 2007). Assim, como pode ser observado nas figuras 8A e 8B, houve muito pouca lipólise e rancidez oxidativa durante os 35 dias de armazenamento refrigerado do queijo de manteiga.

Tabela 10. Quadrados médios e probabilidades para evolução formação de ácidos graxos livres (AGL) e índice de peróxidos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	AGL(%)		Índice de peróxidos (meq/kg)	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	0,016	0,550	0,082	0,733
Processo	2	0,274	0,001	0,715	0,034
Erro	10	0,019		0,148	
Tempo	2	0,135	< 0,001	3,803	< 0,001
Interação: pH de fusão x Tempo	10	0,007	0,156	0,035	0,848
Interação: Processo x Tempo	4	0,011	0,066	0,135	0,127
Erro	20	0,004		0,066	

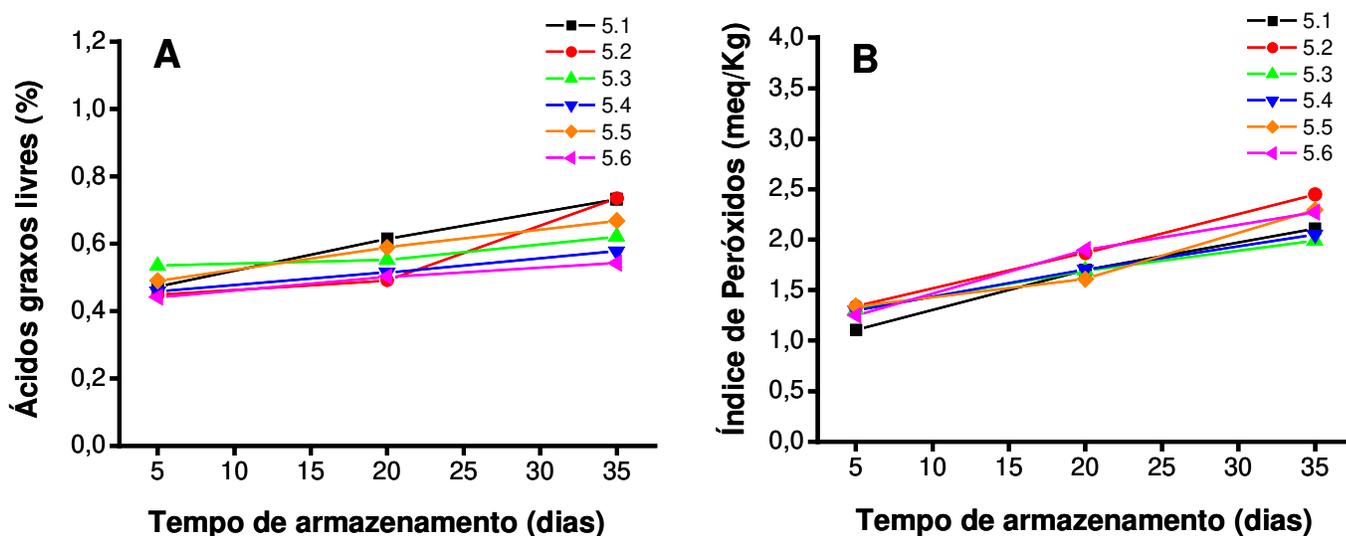


Figura 8. Evolução da formação de ácidos graxos livres (A) e peróxidos (B) durante o armazenamento refrigerado a 4°C.

4.5.4. Avaliação da Cor

A tabela 11 apresenta os quadrados médios e probabilidades para evolução da luminosidade (L^*), densidade de cor vermelho-verde (a^*) e densidade de cor amarela (b^*) dos queijos durante os 35 dias de armazenamento refrigerado. O valor L^* é uma medida da luminosidade da amostra, ou seja, quanto maior o valor L^* , mais claro é o queijo. O pH de fusão e o tempo de armazenamento não influenciaram significativamente a luminosidade e a intensidade da cor amarela (valor b^*) dos queijos, como pode ser observado na tabela 14.

As figuras 9A e 9C mostram a luminosidade (valor L^*) e a intensidade da cor amarela (valor b^*) dos queijos, que se mantiveram praticamente constantes ao longo do tempo de armazenamento refrigerado. O pH de fusão também não afetou significativamente a intensidade da cor vermelha / verde (valor a^*) ($p = 0,058$) que no entanto foi afetada significativamente pelo tempo de armazenamento refrigerado ($p = 0,003$). A figura 9B mostra a intensidade da cor vermelha/verde (valor a^*) dos queijos ao longo do tempo de armazenamento. As amostras de pH de fusão 5,1 a 5,3, apresentaram um declínio na intensidade da cor vermelha no 20º dia. Neste período também ocorreu a maior formação de óleo livre, e a liberação da gordura pode ter ocasionado a diminuição na intensidade de cor vermelha, já que a manteiga de garrafa contém carotenóides que conferem cor ao queijo.

Tabela 11. Quadrados médios e probabilidades para evolução da luminosidade (L*), densidade de cor vermelho-verde (a*) e densidade de cor amarela (b*) dos queijos de manteiga fabricados com diferentes pHs de fusão (5,1 a 5,6) durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	L*		a*		b*	
		QM	P	QM	P	QM	P
pH de fusão	5	6,560	0,572	0,538	0,058	4,589	0,504
Processo	2	31,077	0,059	0,072	0,669	17,158	0,072
Erro	10	8,164		0,171		4,961	
Tempo	2	2,242	0,082	0,138	0,003	0,825	0,087
Interação: pH de fusão x Tempo	10	1,146	0,230	0,022	0,304	0,502	0,154
Interação: Processo x Tempo	4	1,215	0,230	0,141	< 0,001	0,797	0,062
Erro	20	0,791		0,017		0,298	

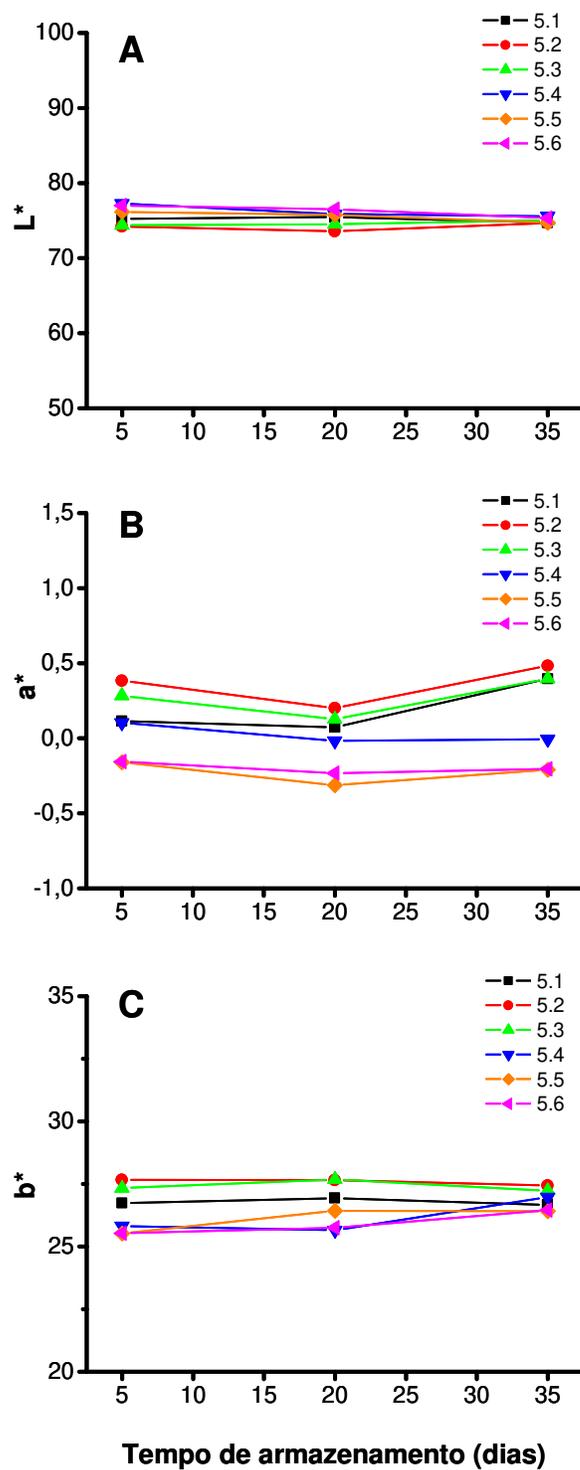


Figura 9. Variação da luminosidade (valorL*) (A), intensidade da cor vermelho/verde (valor a*) (B) e intensidade da cor amarela (valor b*) (C) dos queijo de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6), armazenados durante 35 dias a 4°C.

4.5.6. Propriedades funcionais

4.5.6.1. Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água nos queijos ao longo do tempo manteve-se estável, ou seja, a matriz protéica reteve 100% da fase aquosa durante o tempo de armazenamento, visto que em nenhum momento ocorreu liberação de água da matriz protéica (Tabela 12).

A separação de água e gordura é dependente da composição do queijo processado bem como das condições de aquecimento (tais como, velocidade de aquecimento, tempo de aquecimento). A separação de gordura e água é comumente associada à super-cremificação do queijo processado (LEE *et al.*, 2003).

Tabela 12. Capacidade de retenção de água nos queijos de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6), ao longo do tempo.

pH de fusão do queijo	Retenção de água (%) / Tempo (dias de fabricação)			
	1	5	20	35
5,1	100	100	100	100
5,2	100	100	100	100
5,3	100	100	100	100
5,4	100	100	100	100
5,5	100	100	100	100
5,6	100	100	100	100

4.5.6.2. Óleo livre

Os pHs de fusão ($p = 0,001$) e o tempo de armazenamento ($p < 0,001$) afetaram significativamente a formação de óleo livre, como pode ser visto na tabela 13. Houve interação entre o pH de fusão e o tempo de armazenamento, mostrando que a liberação de óleo livre com o tempo de armazenamento foi diferente em função do pH de fusão dos queijos ($p = 0,001$).

Na figura 11 é apresentada a evolução da formação de óleo livre como porcentagem da gordura total dos queijos ao longo do tempo de armazenamento refrigerado. Os queijos

de menor pH (5,1-5,3) apresentaram maior liberação de óleo que os queijos de maior pH. Também foi observada uma pequena elevação de liberação de óleo no 20º dia de armazenamento nos níveis de pH 5,1-5,3. Nesta faixa de pH, os queijos apresentaram-se levemente granulados, ou seja, a fusão não foi completa, o que deve ter dificultado a ação da caseína como agente emulsificante. Nos queijos de pH 5,4-5,6, houve um pequeno declínio na liberação de óleo durante o tempo de armazenamento refrigerado. Nesta faixa de pH, a gordura apresentou-se melhor emulsificada, ou seja os glóbulos de gordura estavam distribuídos uniformemente na matriz protéica e apresentaram diâmetros menores em relação aos queijos de pHs mais baixo, como pode ser constatado pela microestrutura dos queijos (Figura 4), o contribuiu para uma menor formação de óleo livre. De acordo com KINDSTED (1993), existe uma correlação direta entre o tamanho do glóbulo de gordura e sua distribuição na matriz caseica na formação de óleo livre, onde quanto maior é o tamanho do glóbulo de gordura na matriz caseica, maior será a formação de óleo livre.

Tabela 13. Quadrados médios e probabilidades para evolução formação de óleo livre como porcentagem da gordura total dos queijos de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6), durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	QM	P
pH de fusão	5	383,120	0,001
Processo	2	35,352	0,404
Erro	10	35,525	
Tempo	2	73,173	< 0,001
Interação: pH de fusão x Tempo	10	24,306	0,001
Interação: Processo x Tempo	4	1,815	0,837
Erro	20	5,107	

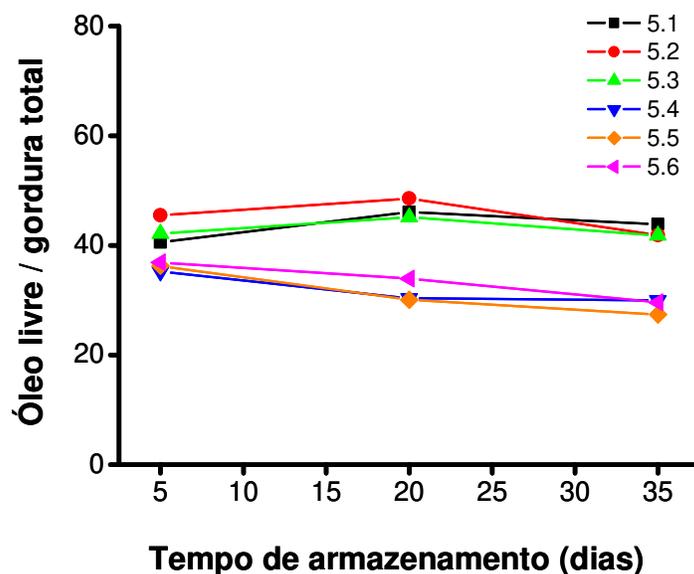


Figura 10. Evolução da formação de óleo livre dos queijos de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6), durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C

4.5.6. Perfil de Textura Instrumental

Como mostram as tabelas 14 e 15 o pH de fusão afetou significativamente a elasticidade ($p = 0,003$) e coesividade ($p = 0,018$) dos queijos. Houve interação do pH de fusão com o tempo de armazenamento para os parâmetros de dureza ($p = 0,001$), gomosidade ($p = 0,043$) e mastigabilidade ($p = 0,042$), o que significa que são variáveis interdependentes e devem ser analisadas em conjunto. Através das figuras 11A, 11E e 11F, pode-se observar que nas amostras de pH de fusão 5,4 a 5,6 ocorreu uma leve diminuição da dureza, gomosidade e mastigabilidade ao longo do tempo, ao contrário das amostras de pH de fusão 5,1 a 5,3 que tiveram um leve aumento da dureza, gomosidade e mastigabilidade no 20º dia de armazenamento, e posterior declínio no 35º dia de armazenamento

Queijos fundidos no pH 5,1 a 5,3 apresentaram maior dureza, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade que os queijos fundidos no pH 5,4 a 5,6. Essas diferenças

devem estar relacionadas à relação CNSA: caseína, que tem influência sobre a capacidade de hidratação da caseína sobre a ação emulsificante.

Pode-ser observado na figura 11A que o aumento do pH implicou na diminuição da dureza. ALMENA-ALISTE & KINDSTED (2000) e MONTEIRO (2004) também verificaram a diminuição da firmeza do cream cheese quando o pH foi aumentado mediante exposição ao hidróxido de amônio. MARCHESSEAU *et al.* (1997) também verificaram este comportamento do pH em relação à dureza de queijos processados. Os autores observaram que, à medida que o pH dos queijos aumentou, ocorreu maior solubilização das proteínas, o que levou a obtenção de produtos com baixa intensidade de interação protéica, porém com grande capacidade de absorção de água. Eles concluíram que, em pHs mais elevados, a textura mais macia dos queijos estaria correlacionada à alta absorção de água pela matriz, a qual atuaria com agente plastificante, reduzindo a firmeza do queijo.

O pH de fusão influenciou significativamente ($p < 0,005$) a coesividade e elasticidade das amostras de queijo de manteiga, como pode ser observado na tabela 15. O tempo de armazenamento, por outro lado, não influenciou significativamente esses parâmetros. Os queijos de pH 5,1 a 5,3, apresentaram maior elasticidade e coesividade em relação aos queijos de pH 5,4 a 5,6. Nos queijos de pH a estrutura protéica apresenta-se mais compacta, ocorrendo uma maior interação proteína-proteína, nos queijos de pH 5,1-5,3, como já visto na microestrutura (Figura 4). De acordo com VERMA & GUPTA (1981), as características de coesividade dependem da estrutura e do arranjo das moléculas de proteína.

A gomosidade e a mastigabilidade foram maiores nos queijos de pH mais baixo (5,1-5,3) do que nos queijos de pH mais elevado (5,4-5,6) (Tabela 16). Nos queijos de pH 5,1-5,3, ocorreu maior liberação de óleo livre da rede protéica. Isso significa que durante a análise de textura, estes queijos apresentaram um teor de gordura reduzido em relação aos demais queijos. De acordo com GWARTNEY *et al.* (2002) e YATES & DRAKE (2007), queijos com teor de gordura reduzido geralmente apresentam maior mastigabilidade.

Ao longo do tempo, as modificações da textura não foram tão intensas, possivelmente devido à baixa extensão de proteólise apresentadas pelos queijos.

Tabela 14. Quadrados médios e probabilidades para evolução da dureza e adesividade dos queijos de manteiga durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	Dureza(g)		Adesividade(g.s)	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	1894623,3	0,001	941,930	0,112
Processo	2	147669,3	0,499	932,421	0,143
Erro	10	198072,2		391,901	
Tempo	2	50030,0	< 0,001	196,679	0,293
Interação: pH de fusão x Tempo	10	20955,6	0,001	172,727	0,379
Interação: Processo x Tempo	4	2340,0	0,702	304,785	0,130
Erro	20	4269,1		150,770	

Tabela 15. Quadrados médios e probabilidades para evolução da elasticidade e coesividade dos queijos de manteiga durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	Elasticidade		Coesividade	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	0,024	0,003	0,017	0,018
Processo	2	0,009	0,112	0,011	0,094
Erro	10	0,003		0,004	
Tempo	2	0,000	0,773	0,001	0,213
Interação: pH de fusão x Tempo	10	0,000	0,531	0,000	0,361
Interação: Processo x Tempo	4	0,000	0,514	0,001	0,191
Erro	20	0,000		0,000	

Tabela 16. Quadrados médios e probabilidades para evolução da gomosidade e mastigabilidade dos queijos de manteiga durante os 35 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	GL	Gomosidade		Mastigabilidade	
		QM	P	QM	P
pH de fusão	5	347862,28	0,012	222022,02	0,009
Processo	2	77962,52	0,343	50259,23	0,312
Erro	10	65392,81		38302,06	
Tempo	2	6924,02	0,026	3082,53	0,046
Interação: pH de fusão x Tempo	10	3824,93	0,043	2083,61	0,042
Interação: Processo x Tempo	4	1750,35	0,375	790,77	0,467
Erro	20	1564,42		851,53	

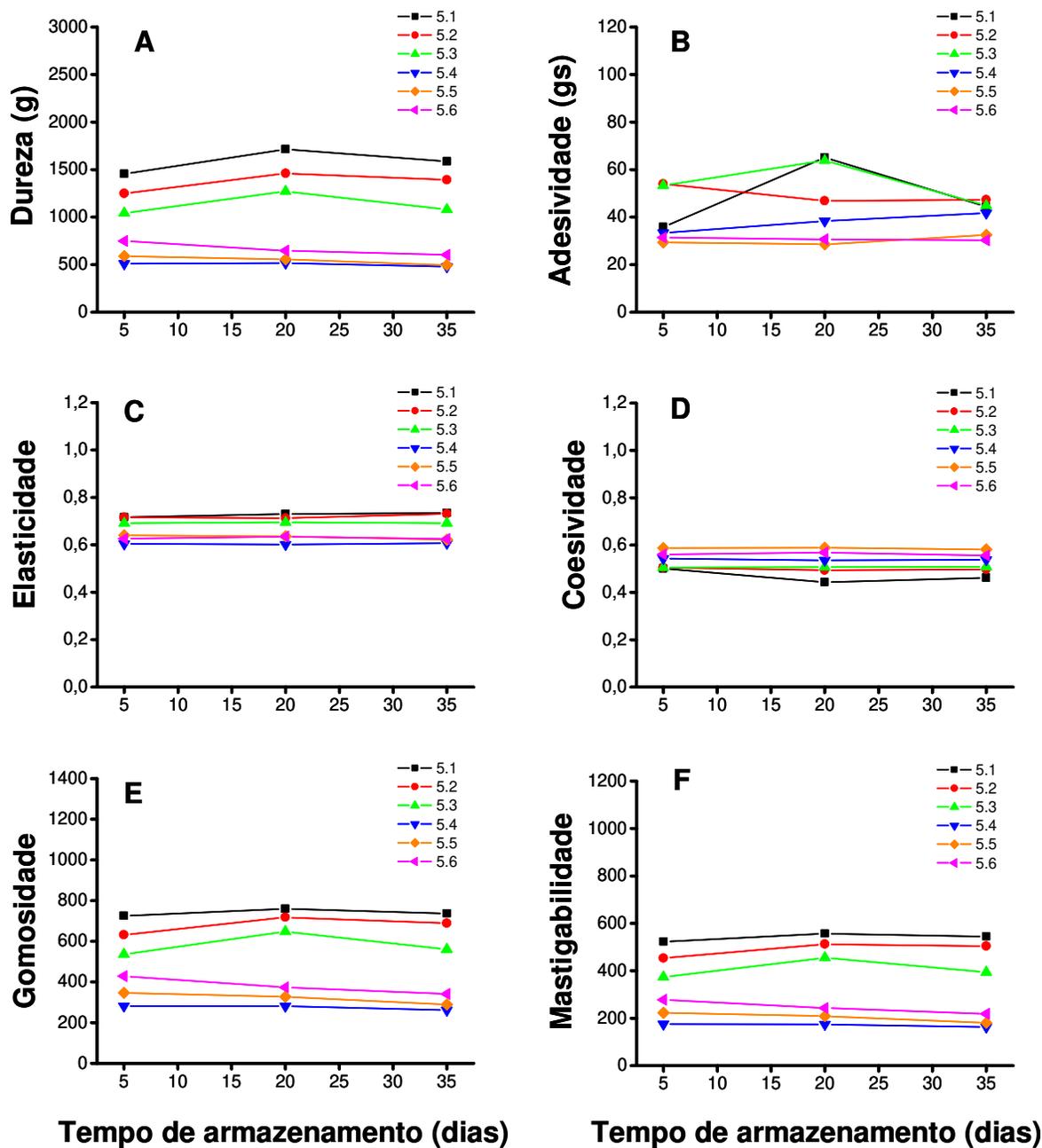


Figura 11. Gráficos obtidos para os parâmetros de dureza (A), adesividade (B), elasticidade (C), coesividade (D), gomosidade (E) e mastigabilidade (F) na avaliação do perfil de textura das amostras de queijo de manteiga fabricados com diferentes pHs (5,1 a 5,6), durante os 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C.

5. CONCLUSÃO

Variações no pH de fusão na faixa de 5,1 a 5,6 resultaram em diferenças na composição, proteólise, textura, formação de óleo livre e microestrutura do queijo de manteiga. Os queijos fundidos a pH 5,4-5,6, apresentaram menor formação de óleo livre, dureza, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. A fusão nessa faixa de pH (5,4-5,6) resultou em queijos com os maiores teores de cálcio total, cálcio não solúvel em água (CNSA), e a maior relação CNSA:caseína. O queijo fundido a pH 5,5 apresentou glóbulos de gordura com diâmetros menores e distribuídos mais uniformemente na matriz protéica, assim como o maior teor de cálcio micelar e maior relação CNSA:caseína, sugerindo existir um teor de cálcio micelar ótimo que facilite a ação da caseína como emulsificante da gordura do queijo. A fusão dos queijos a pH 5,4-5,6 foi mais fácil e homogênea, confirmando que a fusão adequada depende das características da massa com relação à acidez e ao equilíbrio salino do cálcio na fase coloidal e solúvel. Dessa forma, o teor de cálcio ligado à caseína exerceu um papel fundamental na qualidade da fusão, emulsificação e características de qualidade do queijo de manteiga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, P.B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 24, n. 10/11, p. 1021-1030, 1986.
- ALMENA-ALISTE, M.; KINDSTED, P.S. Application of a model system to evaluate the effect of pH on the texture of cream cheese. *Journal of Dairy Science*, v.83, 2002.
- AMBRÓSIO, C.L.B.; GUERRA, N.B.; MANCINI FILHO, J. Características de identidade, qualidade e estabilidade da manteiga de garrafa. Parte I - Estabilidade. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, Campinas, 21(3): 314-320, set-dez. 2001.
- AMBRÓSIO, C.L.B.; GUERRA, N.B.; MANCINI FILHO, J. Características de identidade, qualidade e estabilidade da manteiga de garrafa. Parte II - Estabilidade. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23(3): 351-354, set-dez. 2003.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. 14 ed. Arlington, Virginia, 1984.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Washington, 1995.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 1997. Vol. II.
- AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5 ed. Champaign: AOCS, 1998.
- BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. Plasmin in milk and dairy products: an Update. *International of Dairy Journal*, Barking, v.6, p. 435-457, 1996.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Food chemistry. 2. ed. Berlin: Springer,. cap. 3, p. 152-235,1999.
- BENFELDT, C.; SORENSEN, J.; ELLEGARD, K.H.; PETERSEN, T.E. Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International of Dairy Journal*, Barking, v.7, p. 723-731, 1997.

- BERGER, W.; KLOSTERMEYER, H.; MERKENICH, K.; UHLMANN, G. Processed cheese manufacture: a JOHA Guide. Ladenburg: BK Ladenburg, 1989. 238p.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O.; Química do Processamento de Alimentos, 3ª ed., Varela: São Paulo, 2001, cap. 3.
- BOURNE, M.C. Texture profile analysis. Food Technology, Chicago, v.32, n.7, p.62-72, 1978.
- BOURNE, M.C. Texture profile of ripening pears. Journal of Food Science, Chicago, v.33, n.2, p.223-226, 1968.
- BRASIL. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. Diário Oficial da União, Brasília, 16 jul. 2001.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado.
- BANON, S.; HARDY, J.A Colloidal approach of milk acidification by glucono - δ -lactone. Journal of Dairy Science, v 75, n.4, p.935-941, 1992.
- BYNUM, D.G; BARBANO, D.M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture chemical changes during ageing. Journal of Dairy Science, Champaign, v.68, n.1, p.1-10, 1985.
- CAVALCANTE, A.B.D. Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão tradicional. Viçosa, 1991. 112p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.
- CARIC, M.; KALÁB, M. Processed cheese product. In FOX, P.F. Cheese chemistry, physics and microbiology. New York: Elsevier Applied Science, 1987. v.2, Chap.11, p.339 –393.

- CARIC, M.; GANTAR, M.; KALAB, M. Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese. A review. *Food Microstructure*, Chicago, v.6, p.297-312, 1985.
- CECCHI, H.M. Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos, 2ª ed., Ed. da Unicamp: Campinas, 2003, cap. 9.
- CERVANTES, M.A.; LUND, D.B.; OLSON, N.F. Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.66, n.2, p.204-213, 1983.
- CHAVES, A.C.S.D. Estudo do efeito do congelamento e do tempo de armazenagem sob refrigeração após o descongelamento nas propriedades funcionais, textura e proteólise do queijo mussarela. Campinas, 1997. 93p. Dissertação (mestrado)- Tecnologia de alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- COHEN, S.H.; DAVIS, E.A.; HOLCOMB, D.N.; KALAB, M. Studies of food microstructure. *Scanning Electron Microscopy*, Inc. AMF O'Hare. 1981.
- DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, Munchen, v.32, n.12, p.731-734, 1977.
- DE KRUIF, C.G. Casein Micelle interactions. *International Dairy Journal*, v.9, 183-188, 1999.
- DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A.S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. *Journal of Food Engineering*, v. 64, n. 2, p. 265-271, 2004.
- DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 104, p. 420-428, 2002.
- ESCUDEIRO, C.J. Estudos do Requeijão do Norte: Composição, qualidade e comportamento durante a estocagem. Campinas, 1979.90p. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

- ERICKSON, M.D. Interesterification. IN: ERICKSON, D.R. Practical handbook of soybean processing and utilization. Champaign: AOCS Press, 1995.
- FARKEY, N.Y.; FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. Trends in Food Science and Technology, Cambridge, v.1, n.2, p.37-40, 1990.
- FEENEY, E.P.; GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science, v.85, n.7, p1646-1654, Julho, 2002.
- FERNANDES, A.G. Sais emulsificantes. In: MARTINS, J.F.P.; FERNANDES, A.G.(Ed.) Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de alimentos, 1981. cap.4, p.IV1-IV7.
- FERREIRA, D.N. Influência do uso de retentado de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da mussarela com reduzido teor de gordura feita por acidificação direta. Campinas, 2004. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FRITSCH, J.; STEINHART, H.; Fett/Lipid 1998, 6, 190.
- FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.
- FOX, P.F., WALLACE, J.M.. Formation of flavour compounds in cheese. Advances in Applied Microbiology, 45, 17-85, 1997.
- FOX, P.F.; LUCEY, J.A.; COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during manufacture and ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.29, n.4, p.237-253, 1990.
- FOX, P.F.; LAW, J. Enzymology of cheese ripening. Food Biotechnology. V.5, n.3, p. 239-262, 1991.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. Processed cheese and substitute or imitation cheese products. In: FUNDAMENTALS of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. Cap.18, p.429-451.
- FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. Progress in Lipid Research, v. 19, p. 1-22, 1980.

- FRIEDMAN, H.H.; WHITNEY, J.E.; SZCZESNIAK, A.S. The texturometer – A new instrument for objective measurement. *Journal of Food Science*, Chicago, v.28, n.4, p.390-396, 1963.
- FURTADO, M.M.; PARTRIDGE, J.A. Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.2877, 1988.
- GASTALDI, E.; LAGAÚDE, A.; DE LA FUENTE, T. Micellar transition state in casein between pH 5,5 e 5,0. *Journal of Food Science*, Chicago, v.61, n.1, p.59-68, 1996.
- GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 55, p. 539-546, jun. 1978.
- GREEN, M.L.; MARSHALL, R.J.; BROOKER, B.E. Instrumental and sensory texture assessment and fracture mechanism of Cheddar and Cheshire cheese. *Journal Texture Studies*, Westport, v.16, n.4, p.351-364, 1985.
- GREEN, M.L.; MANNING, D.J. Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research*, London, v.49, n.4, p.737-748, 1982.
- GUERRA, T.M.M. Influência do sorbato de potássio sobre a vida útil do queijo manteiga (requeijão do norte).1995. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- GUINEE, T.P.; FEENEY, E.P.; AUTY, M.A.; FOX, P.F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.7, p.1655-1669, 2002.
- GUINEE, T.P.; PUDJA, P.D.; FARKYE, N.Y. Fresh acid- curd cheese varieties. In FOX, P.F. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2º Ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, v.2, cap.13, p. 363-419, 1999.
- GUO, M.R.; KINDSTEDT, P. Age-related changes in the water phase of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.78, n.10, p.2099-2107, Oct., 1995.
- GWARTNEY, E.A, FOEGEDING, E.A.; D.K. LARICK. The texture of commercial full fat and reduced fat cheeses.*Journal Food Science*, 87:812-816, 2002.

- HEERTJE, L.; VISSER, J.; SMITS, P. Structure formation in acid milk gel. Food Microstructure, Chicago, v.4, p.267-277, 1985.
- HENRIQUE, V.S.M. Comportamento da fase aquosa e efeito do pH sobre a proteólise e propriedades funcionais do queijo Campinas, SP: [s.n.], 2005.
- HICKEY, D.K.; KILCAWLEY, K.N.; BERESFORD, T.P.; WILKINSON, M.G. Lipolysis in cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks. Journal of Dairy Science, v.90, n.1, p.47-56, 2007.
- HUI, Y.H.; Bailey's Industrial Oil & Fat Products, 5th ed., Wiley: New York, 1996, vol. 4.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. D.B. Rebocho Ed. São Paulo-SP, 1985.
- JACK, F.R.; PETERSON, A Texture of hard cheeses. Trends in Food Science and Technology, Amsterdam, v.3, p.160-164, 1992.
- JASSEN-ESCUADERO, C.; RODRIGUEZ-AMÁYA, D.B. Composition of the Brazilian cheese "Requeijão do Norte". Journal of Food Science, Chicago, v.46, n.3, p.917-919, 1981.
- KALAB, M. Foods under the microscope. Update: 16/03/2000. Disponível em: <<http://anka.livstek.lth.se:2080/microscopy> > Acesso em: 2 nov. 2007.
- KALÁB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. Food Structure, v.12, p.95-114, 1993
- KINDSTEDT, P.S. effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of mozzarella cheese. Critical Reviews in Food Science 33, 167-187, 1993.
- KINDSTEDT, P.S. Functional properties of mozzarella cheese. or pizza: A review. Cultured Dairy Products Journal, Washington, v.45, n.3, p.27-31, 1991.
- KINDSTEDT, P.S.; FOX, P.F. Modified Gerber test for free oil in melted Mozzarella cheese. Journal of Food Science, Chicago, v.56, n.4, p.1115-1116, July-Aug., 1991.
- KOSIKOWSKI, F.V. The manufacture of mozzarella cheese from pasteurized milk. Journal of Dairy Science, Champaign, v.34, p.641-643, 1951.

- KOSIKOWSKI, F.V. Process cheese and related types. in Kosikowski, F. V. cheese and fermented milk food. 2a. ed. New York: Kosikowski, F. V. and associates, brooktondale, 1978. chap. 17, p.290-303.
- LANE, C.N.; FOX, P.F.; JOHNSTON, D.E.; MCSWEENEY, L.H. Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, barking, v.7, p.453-464, 1997.
- LANGSRUD, T.; REINBOLD, G.W. Flavour development and microbiology of Swiss cheese—a review, III. Ripening and flavour production. *Journal of Milk Food and Technology*, 36(12), 593–609, 1973.
- LAU, K.Y.; BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R. Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, Ithaca, v.74, n.3, p.727-740, 1991.
- LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Symposium; Cheese Ripening Technology- Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, v.70, p.1748-1760, 1987.
- LEE, S.K.; BUWALDA, R.J.; EUSTON, S.R.; FOEGEDING, E.A.; McKENNA, A.B. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v.36, p.339-345, 2003.
- LEMAN, J.; KINSELLA, J.E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.28, n.2, p.115-138, 1989.
- LIDA, H.M.D.N., ALI, A.R.M. Physicochemical characteristics of palm based oil blends for the production of reduced fat spreads. *Journal of American Oil Chemists*, 75(11):1625-1631, 1998.
- LIN, S. H. C.;LEONG, S. L.; DEWAN, R.K.; BLOOMFIELD, V.A.; MORR, C.V. Effect of calcium ion on the structure of native bovine casein micelles. *Biochemistry*, Washington, v.11, p.812-821, 1972.
- LUCEY, J.A.; FOX, P.F. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n.6, p. 1714-1724, 1993.

- MACMAHON, D.J.; BROWN, R.J. Composition, structure and integrity of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science*, v.67, n.3, p.499-512, 1984.
- MARCHESSEAU, S.; GASTALDI, E.; LAGAÚDE, A.A influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.8, p.1483-1489, 1997.
- METZGER, L.E.; BARBANO, D.M.; KINDSTEDT, P.S. Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese: III. Post-melt chewiness and whiteness. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.6, 2001.
- MEYER, A. Process cheese manufacture. London: Food Trade Press, 1973. 360p
- MORR, C.V. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v.50, n.11, p.1744-1751, 1967.
- MONTEIRO, R.S. Efeito do pH sobre as características físico-química do cream cheese. 2004, Campinas 126p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NASSU, R. T.; ARAÚJO. R.S.; BORGES, M.F.; LIMA, J.R.; MACÊDO, B.A.; LIMA, M.H.P.; BASTOS, M.S.R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2001.*
- NASSU, R.T.; ARAÚJO. R.S.;GUEDES, C.G.M.; ROCHA, R.G.A. Diagnóstico das Condições de Processamento e Caracterização Físico-Química de Queijos Regionais e Manteiga no Rio Grande do Norte. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2003.*
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R.(Ed.). *Food chemistry*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.
- NIELSEN, S. S. *Food analysis*. 2a ed. Maryland: Aspen, 1998.
- OLIVEIRA, J.S. *Queijo: Fundamentos Tecnológicos*. Campinas: Ícone, 1986. 146p.

- PASTORINO, A.J.; HANSEN, C.L.;McMAHON, D.J. Effect of pH on the chemical composition and structure function relationships of cheese. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2751-2760, 2003.
- PATEL, M.C.; LUND, D.B.; OLSON, N.F. Factors affecting syneresis of renneted milk gels. *Journal of Dairy Science*. v. 55, n.7, p. 913-918, 1972.
- PIÑOL, J.M.G.; BORONAT, M.C. de la T. Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos: lípidos. *Alimentaria*, v. 204, p. 15-21, 1989.
- POVEDA; J.M.; CABEZAS, L.; McSWEENEY, P.L.H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*, v.84, p. 213-218, 2004.
- RIBEIRO, A.J. O genuíno requeijão do nordeste. *Boletim do leite*. V. 1 nº 3, p.13-17, 1947.
- ROEFS, S.P.F.; WALSTRA, P.; DALGLESISH, D.G.; HORNE, D.S. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v.39, p.119-122, 1985.
- SAFETY ASSOCIATES. Soheila Mirhashemi, Michal Mittelstein, John Sorensen, John F.Elias, Virginia C. Gordon. Method and apparatus for determining specific analytes in foods and other complex matrices. CA n. PI 2267226, 09 abr. 1998.
- SCHMIDT, D.G.; BUCHHEIM, W. Particle size distribution in casein solution. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v.30, n.1, p.17-28, 1976.
- SHEEHAN, J.J.; GUINEE, T.P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, v. 14, n.2, p. 161-172, 2004.
- SHIMP, L.A. Process cheese principles. *Food Technology*, Chicago, v.39, n.5, p.63-69, 1985.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

- SINGH, H.; WAUNGAN, A.; Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International of Dairy Journal*, Barking, v.11, p.543-551, 2001.
- SINGH, K.T.; FOX, P.F.; HEALY, A. Water-soluble peptides in cheddar cheese: isolation and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. *Journal of Dairy Research*, London, v.62, p. 629-640, 1995.
- SMITH, L.M.; DUNKLEY, W.L.; FRANKE, A.; DAIRIKI, T. Measurement of trans and other isomeric unsaturated fatty acids in butter and margarine. *Journal of the American Oil chemists Society*, v.55, p.257-261, 1978.
- SOMMERFELD, M. Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Prog. Lipid Res*, v.22, p.221-233, 1983.
- SOUZA, M.J.; MALCATA, F.X.; Influence of pasteurization of milk and addition of starter cultures on protein breakdown in ovine cheeses manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, London, v. 57, n.4, p. 549- 556, 1996.
- SOUZA, M.J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International of Dairy Journal*, Barking, v.11, p.327-345, 2001
- SOUZA, A.V.C- avaliação da qualidade e valor nutricional de óleos e gorduras (2003). Acesso em http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos__agosto03.htm.
- SZCZESNIAK, A. S. Correlating sensory with instrumental texture measurements – an overview of recent developments. *Journal of Food Studies*, Connecticut, v.18, p. 1-15, 1987.
- SZCZESNIAK, A.S.; BRANDT, M.A.; FRIEDMAN, H.H. Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, Champaign, v.28, n.4, p.397-403, 1963.
- TAMIME, A.Y.; KALAB, M.; DAVIES, G.; YOUNIS, M.F. Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. *Food Structure*, Chicago, v.9, n.1, p.23-37, 1990.

- TARAS, M.J. Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, 1971.
- TEMPLETON, H.L.; SOMMER, H.H. Factors affecting the body and texture of processed cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 15, p. 29-41, 1932.
- TUNICK, M.H.; NOLAN, E.D.J. Rheology of cheese. Physical chemistry of food processes fundamental aspects. In: BAIAN, J. C. New York: ed. An AVI Book, p. 273-97, 1992.
- URBACH, G. Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3, 389–422. 1993.
- VAN HOOYDONK, A.C.M.; HAGEDOORN, H.G.; BOERRGTER, I.J. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v. 40, n.2 p.281-296, 1986.
- VAN VLIET, T. Terminology to be used in cheese rheology. *International Dairy Federation Bulletin*, Brussels, n. 268, p. 5-15, 1991.
- VENTURA, R.F. Requeijões do Nordeste: tipos e fabricações. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.42, n. 254, p.3-21, 1987.
- VERMA, B.B.; GUPTA, S.K. Effect of heat processing on the body and texture of milk and milk products. *Indian Dairyman*, New dehi, v.33, n.6, p.361-365,1981.
- VICENTE, M.S.; IBANEZ, F.C.; BARCINA.Y.; BARRON, L.J.R. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type. *Food Chemistry*, v. 72, p. 309-317, 2001.
- VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, v. 268, p. 49-61, 1991.
- WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, v.9, p.189-192, 1999.

- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v.73, n.8, p.1965-1979, 1990.
- WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; CRAIG, D.; JOHNSTON, K.; MCKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, v.11, n.4-7, p. 455-469, 2001.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.L. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do Leite e seus Derivados*, v.56, n.661, p.1-8, nov. 1983.
- YATES, M.D.; M.A. Drake. Texture properties of gouda cheese. *J.Sensory Stud*, 2007.
- ZEHREN, V.L.; NUSBAUM, D.D. *Process cheese*. Madison: Cheese Reporter Publishing Company, 1992. 363p.