

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**INTRODUÇÃO DA TECNOLOGIA DE CONGELAÇÃO
NA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE OVELHA**

Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial

Nuno Bartolomeu Mendes Godinho de Alvarenga

Orientador: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

Júri:

Presidente: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Helena Margarida Nunes Pereira, professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, professora associada do Instituto Superior de Estudos Interculturais e Transdisciplinares do Instituto Piaget;

Doutor José Manuel Abecassis Empis, professor associado do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor João da Silva Boavida Canada, professor coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja;

Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Pedro Louro Martins, investigador auxiliar do L-INIA do Pólo de Investigação da Quinta do Marquês do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P., na qualidade de especialista.

**LISBOA
2008**

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**INTRODUÇÃO DA TECNOLOGIA DE CONGELAÇÃO
NA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE OVELHA**

**Tese apresentada neste instituto para obtenção do grau de doutor em
Engenharia Agro-Industrial**

Nuno Bartolomeu Mendes Godinho de Alvarenga

Orientador: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

Júri:

Presidente: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Helena Margarida Nunes Pereira, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, Professora Associada do Instituto Superior de Estudos Interculturais e Transdisciplinares do Instituto Piaget;

Doutor José Manuel Abecassis Empis, Professor Associado do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor João da Silva Boavida Canada, Professor Coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja;

Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Pedro Louro Martins, Investigador Auxiliar do L-INIA do Pólo de Investigação da Quinta do Marquês do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P., na qualidade de especialista.

**LISBOA
2008**

À Memória dos meus pais

AGRADECIMENTOS

Quero expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta tese. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se uma referência especial:

À Doutora Isabel de Sousa, na qualidade de orientadora, pelo grande rigor científico, pelo sentido prático, pela exigência, pelo empenho demonstrado desde o primeiro dia, que se traduz nas respostas rápidas sempre que foi solicitada, pela leitura crítica do texto original e pela constante cedência de documentação bibliográfica.

Ao Doutor João Canada, pelo precioso incentivo e pelo apoio científico na caracterização sensorial das amostras. Como Presidente da Área Departamental de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Escola Superior Agrária de Beja (ESAB), disponibilizou todos os meios para a execução prática deste trabalho.

Aos colegas da ESAB que, de uma forma desinteressada, ofereceram o seu precioso tempo ao Painel de Provedores.

A todas as pessoas que nas diferentes fases deram apoio laboratorial para a execução deste Projecto: à Doutora Silvina Ferro Palma, pelo apoio na montagem de algumas técnicas analíticas, às colegas Eng^a. Manuela Costa, Eng^a. Maria João Alves, Eng^o. António Almodôvar, Célia Lampreia, Fernanda Fragoso, Miguel Floro, Eng^a. Teresa Palma, Libânia Grilo, Maria Ludovina, Lurdes Silva e aos alunos Paula Silva, Laura Carrascal, José Garcia e Sofia Moreira, pelo apoio analítico prestado.

Ao colega e amigo Miguel Horta, pelo constante apoio na manutenção e controlo das condições estabelecidas no processo de congelação das amostras.

À amiga Graça Fernandes, pela leitura cuidada do texto nas suas diferentes fases.

À Senhora Engenheira Décia Carreira, que fez “escola” na tecnologia dos lacticínios à qual tenho honra de pensar pertencer.

À ESAB, pela possibilidade que me concedeu de realizar o Doutoramento, e pela facilidade dos meios concedidos durante a realização da parte experimental.

Ao Laboratório Ferreira Lapa, do ISA-UTL, pelos meios cedidos a este projecto.

Finalmente, à minha esposa Paula e às minhas filhas Maria Luísa e Maria Marta, pelo apoio, encorajamento e amor permanentes.

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a introdução da técnica de congelação no processamento de queijo de leite cru de ovelha de pasta semi-mole amanteigada, e.g. queijo Serpa. O estudo integrou a monitorização das propriedades físico-químicas e estruturais ao longo da cura e a optimização das variáveis envolvidas no processo de congelação: i) período de cura óptimo para congelar, 28, 35, e 42 dias; ii) tipo de congelação, lenta em câmara de congelação a -20 °C e rápida em túnel de congelação a -30 °C; iii) temperatura de congelação, -10 °C e -20 °C; e iv) tempo de congelação, de 2 a 12 meses. A partir da evolução dos espectros mecânicos e dos texturogramas obtidos ao longo da cura, observou-se o esperado amolecimento na pasta dos queijos, coincidindo com uma redução no pH e um aumento das fracções azotadas indicadoras de proteólise. Foi estabelecido um modelo para estimar o tempo de cura do queijo Serpa, a partir de parâmetros reológicos, físicos e químicos, utilizando uma regressão linear múltipla (RLM), com um erro estimado de 1,74 dias. Os resultados demonstraram que é possível a congelação deste tipo de queijo a uma temperatura de -20 °C, por períodos não superiores a 6 meses, com preservação das suas características específicas. Verificou-se ainda que o tipo de congelação (câmara ou túnel de congelação) não influencia as propriedades do queijo e que o tempo de cura óptimo para a introdução da congelação foi o mais longo que foi testado (42 dias).

Palavras-chave: Queijo Serpa, ovelha, cura, congelação, reologia, estrutura.

Introduction of Freezing on the Production of Ewe's Milk Cheese

ABSTRACT

The present thesis was performed to study the introduction of freezing on the production of raw ewe's milk semi-soft cheese, e.g. Serpa cheese. The study has integrated the monitoring of physico-chemical and structural properties during ripening and the optimisation of parameters related to the freezing process: i) the optimum stage of ripening to perform the freezing, 28, 35, and 42 days; ii) type of freezing, slow freezing in a normal -20 °C freezer and fast freezing in a forced convection -30 °C ultra-freezing; iii) freezing temperature, -10 °C and -20 °C; and iv) frozen storage period, from 2 to 12 months. From the mechanical spectra and the texturogram evolution during ripening, it was possible to observe a predictable softening of the cheese core, concomitant to a pH reduction and an augment of the nitrogen fractions, considered as proteolysis indicators. A model to estimate Serpa cheese ripening time was established, considering rheological, physical and chemical parameters, using multiple linear regression (MLR), with an estimation error of 1,74 days. The results have evidenced that it is possible the frozen storage of this type of cheese at -20 °C, for periods no longer than 6 months, with the preservation of its specific characteristics. Moreover, it was possible to ascertain that the type of freezing (fast or slow) does not influence the cheese properties, and that the best stage of ripening to introduce the freezing was the longest that was tested (42 days).

Keywords: Serpa cheese, ewe, rheology, ripening, freezing, structure.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
CAPÍTULO 1 – ENQUADRAMENTO DO TRABALHO E OBJECTIVOS	1
CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	4
2.1 – Implicações químicas e estruturais da transformação de leite em queijo	4
2.1.1 – Estrutura da micela de caseína	4
2.1.2 – Coagulação	7
2.2 – Maturação	9
2.2.1 – Glicólise	10
2.2.2 – Proteólise	11
2.2.3 – Lipólise	14
2.3 – Queijo	15
2.3.1 – Caracterização	15
2.3.2 – Queijos de ovelha e segurança alimentar	27
2.4 – Congelação	29
2.4.1 – Ciclo congelação/descongelação	29
2.4.2 – Estado de vítreo e congelação	31
2.4.3 – Congelação de queijo	33
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIAS	38
3.1 – Obtenção das amostras de queijos	38
3.2 – Metodologias usadas na caracterização das amostras	38
3.2.1 – Avaliação química	39
3.2.2 – Avaliação física	41
3.2.3 – Avaliação sensorial	42
3.3 – Tratamentos estatísticos	44
3.3.1 – Estatística descritiva e análise de variância a um factor	44
3.3.2 – Técnicas exploratórias multivariadas	45
CAPÍTULO 4 – “MONITORIZAÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DO QUEIJO AO LONGO DA MATURAÇÃO” (ENSAIO 1).....	47
Resumo	47
4.1 – Introdução	48
4.2 – Material e métodos	50
4.2.1 – Delineamento experimental	50
4.2.2 – Procedimentos laboratoriais	52
4.2.3 – Análise estatística	52
4.3 – Resultados e discussão	52
4.3.1 – Monitorização da evolução das propriedades do queijo	52
4.3.2 – Análise em componentes principais	67

4.3.3 – Estimativa do tempo de cura do queijo Serpa.....	72
4.4 – Conclusões	73
CAPÍTULO 5 – “OPTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS DE CONGELAÇÃO DE QUEIJO DE OVELHA DE PASTA SEMI-MOLE” (ENSAIO 2).....	76
Resumo	76
5.1 – Introdução	77
5.2 – Material e métodos.....	78
5.2.1 – Delineamento experimental	78
5.2.2 – Procedimentos laboratoriais.....	81
5.2.3 – Análise estatística	81
5.3 – Resultados e discussão	82
5.3.1 – Impacto da congelação nas propriedades químicas do queijo	82
5.3.2 – Impacto da congelação nas propriedades físicas do queijo	91
5.4 – Conclusões	103
CAPÍTULO 6 – “INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONGELAÇÃO NAS PROPRIEDADES DO QUEIJO DE OVELHA DE PASTA SEMI-MOLE” (ENSAIO 3).....	105
Resumo	105
6.1 – Introdução	106
6.2 – Material e métodos.....	108
6.2.1 – Delineamento experimental	108
6.2.2 – Procedimentos laboratoriais.....	110
6.2.3 – Análise estatística	110
6.3 – Resultados e discussão	111
6.3.1 – Impacto da congelação nas propriedades químicas do queijo	111
6.3.2 – Impacto da congelação nas propriedades físicas do queijo	115
6.3.3 – Impacto da congelação nas propriedades sensoriais do queijo	124
6.4 – Conclusões	134
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES GERAIS	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
ANEXO	165

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de congelação divulgados em publicações científicas.....	35
Tabela 2 – Plano de amostragem do ensaio 1.....	51
Tabela 3 – Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para o produtor A, ao longo do tempo de cura.....	54
Tabela 4 – Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para o produtor B, ao longo do tempo de cura.....	55
Tabela 5 – Resultados das correlações (r) e valores de significância (P) entre o módulo conservativo e a dureza em relação à humidade, ao pH, à acidez, e aos indicadores de proteólise (NNP% e NA%).	65
Tabela 6 – Valores próprios e extracção dos componentes principais.....	67
Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	68
Tabela 8 – Plano de amostragem do ensaio 2.....	80
Tabela 9 – Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.....	83
Tabela 10 – Valores próprios e extracção dos componentes principais, obtida na ACP aos atributos químicos.....	87
Tabela 11 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos químicos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	88
Tabela 12 – Caracterização física: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.....	92
Tabela 13 – Valores próprios e extracção dos componentes principais dos valores médios dos atributos químicos.....	99
Tabela 14 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos físicos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	100
Tabela 15 – Plano de amostragem do ensaio 3.....	109
Tabela 16 – Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.....	112
Tabela 17 – Caracterização física: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.....	116
Tabela 18 – Avaliação sensorial: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.....	125
Tabela 19 – Valores próprios e extracção dos componentes principais dos valores médios dos atributos sensoriais.....	129
Tabela 20 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos sensoriais (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da micela de caseína (Schmidt, 1982).	5
Figura 2 – Ligação fosfato de cálcio (Alais, 1985).	6
Figura 3 – Modelo em corte da micela de caseína (Walstra, 1999a).	8
Figura 4 – Espectros mecânicos típicos de quatro sistemas: (a) solução diluída, (b) solução concentrada de macro-moléculas, (c) gel forte e (d) gel fraco (Alves, 2003).	22
Figura 5 – Imagens de crio-microscopia electrónica de varrimento de queijos Karish: (a) estrutura de caseína densa e (b) estrutura de caseína com poros maiores (Hassan et al., 2004).	23
Figura 6 – Análise dos compostos voláteis do “flavour” durante a cura do queijo Gouda por GC-MS (Schmidt, 1982).	26
Figura 7 – Ficha de Prova para obtenção do perfil sensorial.	43
Figura 8 – Varrimentos de tensão médios das amostras aos 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura ($\omega = 1\text{Hz}$).	56
Figura 9 – Espectros mecânicos médios das amostras com 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias cura ($G' - \blacksquare \blacklozenge \blacktriangle \bullet$; $G'' - \square \diamond \triangle o$).	57
Figura 10 – Perfil de textura médio da pasta das amostras com 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias cura.	59
Figura 11 – Evolução dos valores médios da dureza (a) e do módulo conservativo (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (---■---) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	60
Figura 12 – Evolução dos valores médios da humidade (a) e da gordura (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (---■---) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	61
Figura 13 – Evolução dos valores médios das fracções NSA% (a) NNP% (b) e NA% (c) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (---■---) durante a cura.	62
Figura 14 – Evolução dos valores médios da acidez (a) e do pH (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (---■---) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	64
Figura 15 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor L^* (a), a^* (b) e b^* (c) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (---■---) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	66
Figura 16 – Distribuição dos atributos no plano principal.	69
Figura 17 – Projecção das amostras no plano principal (0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura; produtores A e B).	70
Figura 18 – Dendrograma das amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura; produtores A e B).	71
Figura 19 – Valores de tempo de cura observados vs valores previstos (MLR).	73
Figura 20 – Valores médios da humidade (a), gordura (b) e azoto total (c) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	84
Figura 21 – Valores médios das fracções azotadas NSA% (a) NNP% (b) e NA% (c) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	85

Figura 22 – Distribuição dos atributos químicos no plano principal.....	89
Figura 23 – Projecção das médias no plano principal (CP1 vs CP2).....	90
Figura 24 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos químicos).	90
Figura 25 – Valores médios dos parâmetros de dureza (a) e adesividade (b) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.....	93
Figura 26 – Varrimentos de tensões médios para cada tipo de amostra ($\omega = 1\text{Hz}$).	94
Figura 27 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho e amostras submetidas à câmara de congelação. Destacado, a cinzento, o espectro mecânico da amostra testemunho.	95
Figura 28 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho e amostras submetidas ao túnel de congelação. Destacado, a cinzento, o espectro mecânico da amostra testemunho.	96
Figura 29 – Valores médios dos parâmetros de cor L* (a) a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. Destacado, a cinzento, o valor médio para a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	98
Figura 30 – Distribuição dos atributos físicos no plano principal.	100
Figura 31 – Projecção das amostras no plano principal (atributos físicos).	101
Figura 32 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos físicos).	102
Figura 33 – Dendrograma exemplificativo (exclusão do provador 1).	111
Figura 34 – Valores médios do pH (a), bem como das fracções NSA% (b) NNP% (c) e NA% (d) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	114
Figura 35 – Valores médios dos parâmetros de dureza (a) e adesividade (b) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.	117
Figura 36 – Varrimento de tensões médios.	118
Figura 37 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho (—■—) e das amostras congeladas a -10 °C (—■—) para diferentes períodos de congelação em meses (M).	119
Figura 38 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho (—■—) e das amostras congeladas a -20 °C (—■—) para diferentes períodos de congelação em meses (M).	120
Figura 39 – Valores médios dos parâmetros de cor da crosta L* (a), a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.....	122
Figura 40 – Valores médios dos parâmetros de cor da pasta L* (a), a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.....	123
Figura 41 – Valores médios dos atributos de aspecto e textura das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (—) e congeladas durante 12 meses (■ ■ ■), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).	126

Figura 42 – Valores médios dos atributos de cheiro e sabor das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (——) e congeladas durante 12 meses (▪▪▪), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).....	127
Figura 43 – Valores médios dos atributos de “flavour” das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (——) e congeladas durante 12 meses (▪▪▪), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).....	128
Figura 44 – Distribuição dos valores médios dos atributos sensoriais no plano principal (CP1 vs CP2).	131
Figura 45 – Projecção das amostras no plano principal (atributos sensoriais).	132
Figura 46 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos sensoriais).	133

CAPÍTULO 1 – ENQUADRAMENTO DO TRABALHO E OBJECTIVOS

Em Portugal existe um grupo de queijos de ovelha de pasta semi-mole, amanteigada, produzidos a partir de leite cru e coagulados com extracto aquoso de flor de cardo, *Cynara cardunculus* L.. Estes queijos têm características de textura e “flavour” únicas, de grande valor comercial, salvaguardadas pela protecção da denominação de origem protegida (DOP).

No fabrico dos queijos de ovelha com DOP, não é permitido a congelação do produto final. Sob o ponto de vista económico, esta é uma limitação importante na produção e comercialização destes produtos (e.g. nos picos de produção há pressões sobre os produtores no sentido de os levar a baixar o preço). A introdução da congelação leva à possibilidade de diluição dos picos de produção e à sincronização entre a oferta e a procura, o que permitirá aumentar a competitividade das empresas. Para além disso, há um aspecto importante a ter em conta nos circuitos de comercialização, principalmente quando envolvem grandes distâncias como no caso da exportação do produto: a congelação pode evitar os exigentes cuidados de manutenção do queijo que se verificam quando se usa a refrigeração (Alvarenga *et al.*, 2003; Alvarenga *et al.*, 2004).

Paralelamente considera-se que, no futuro, se deve agir de forma a alcançar, progressivamente, uma posição no mercado da exportação, em condições competitivas. Decerto que esta competição exige qualidade ao produto, apoiada em tecnologias actualizadas, avaliada segundo índices adequados e compatíveis com as práticas e técnicas utilizadas. É, por isso, necessário o estudo das tecnologias de conservação na produção do queijo, a que se atribui carácter prioritário, uma vez que se deve acautelar a minimização dos danos desta tecnologia nas características texturais e sensoriais dum produto que possui identidade própria.

O enquadramento sócio-económico das unidades onde se produzem estes queijos tem características comuns, que devem ser equacionadas nas propostas de investigação e desenvolvimento tecnológico nesta área: (1) a produção existente de leite de ovelha é sazonal, com flutuações ao longo do ano, sendo máxima no Inverno e Primavera e muito reduzida no Verão e Outono; (2) também há flutuações bastante acentuadas na procura, havendo uma forte concentração no período de Natal; (3) existe desconfiança nalguns consumidores, pelo facto de estes queijos serem produzidos com leite cru de ovelha, dificultando os processos de exportação; (4) o período de comercialização

destes queijos é muito reduzido, se considerarmos a optimização da textura e do “flavour”; (5) durante este período, caso as condições de armazenamento não sejam as adequadas, pode haver necessidade de manutenção do produto, como por exemplo lavagens para limpar bolores e (6) a maioria das unidades de produção são micro-empresas, localizadas num contexto social deprimido e adverso ao associativismo.

É importante aumentar a competitividade destas unidades, pelo que devem ser resolvidas algumas destas questões. No que se refere às flutuações sazonais da procura e da oferta, existem dois caminhos: a sincronização dos partos e a utilização de tecnologias de conservação. Embora hajam experiências de sincronização – mais conhecidas em unidades de produção de queijo com rebanhos próprios – a implementação tem sido difícil por diferentes motivos: aptidão mista (leite e carne) da maioria dos rebanhos e o facto de nalgumas regiões de produção existir muito calor no Verão, dificultando a recolha transporte e conservação do leite.

Os processos de produção de queijos artesanais têm sofrido algumas modificações e, muitas delas, não têm sido motivo de avaliação no que se refere ao impacto na especificidade e na qualidade do produto. Entre outras, podem-se apontar a introdução de raças importadas, de técnicas de conservação de leite, de prensagem, de cura em atmosfera controlada e do uso do aço inoxidável. Sem pôr em causa a importância da introdução de algumas dessas técnicas, não se deve deixar de referir que, por vezes, foram introduzidas de uma forma empírica, sem respeitar as características distintivas destes produtos, promovendo uma uniformização indesejada das propriedades entre os diferentes queijos.

Tomando como exemplo um dos queijos deste grupo – queijo Serpa – pretendeu-se com este trabalho resolver algumas destas dificuldades, no sentido de contribuir para o aumento da competitividade destas pequenas unidades. Para isso, o estudo efectuado teve por base dois objectivos principais.

O primeiro inseriu-se na área do desenvolvimento científico e teve como objectivo ampliar o conhecimento relacionado com os fenómenos que ocorrem durante a cura do queijo Serpa. Foi dado especial relevo aos mecanismos bioquímicos responsáveis pelo amolecimento da estrutura destes queijos.

O segundo, na área do desenvolvimento tecnológico, teve como objectivo estudar a introdução de uma tecnologia de conservação. Dividiu-se em duas fases: na fase inicial

pretendeu-se otimizar o processo de congelação, no sentido de fixar as condições operativas, necessárias à minimização dos danos nas propriedades físicas e químicas do queijo. Para isso estudou-se: (a) a fase da cura em que se deve aplicar o processo, (b) as condições de arrefecimento e (c) a temperatura de conservação. Com estas condições fixadas, passou-se à fase seguinte em que se estudou a influência do tempo de armazenamento dos queijos no estado congelado, nas propriedades referidas anteriormente e no perfil sensorial.

O trabalho prático foi organizado em 3 ensaios distribuídos por 3 anos (2004-2007). Esta dimensão temporal elevada deveu-se ao facto de os ensaios de congelação serem longos (cerca de um ano cada) e de o delineamento experimental do terceiro ensaio estar dependente dos resultados do segundo. As amostras utilizadas tiveram origem em duas queijarias detentoras de DOP. O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Física e Reologia Alimentar do Instituto Superior de Agronomia e nos Laboratórios de Lacticínios, Reologia Alimentar e Análise Sensorial da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

Esta dissertação compreende um capítulo inicial com considerações teóricas, em que se abordam, essencialmente, aspectos relacionados com a produção, maturação, propriedades do queijo e do modo como a congelação os pode influenciar. Segue-se um capítulo onde se descrevem as técnicas laboratoriais usadas para a caracterização das amostras em ambos os ensaios.

A parte central da dissertação compreende os capítulos 4, 5 e 6, que incluem o desenvolvimento dos ensaios práticos, respectivamente “monitorização da evolução das propriedades estruturais do queijo ao longo da maturação” (ensaio 1), “otimização de variáveis de congelação de queijo de ovelha de pasta semi-mole” (ensaio 2) e “influência do tempo de congelação nas propriedades do queijo de ovelha de pasta semi-mole” (ensaio 3). Todos estes 3 capítulos têm uma organização quase independente, no sentido de, ao leitor, se bastarem a si mesmos. Os resultados do ensaio 1 foram publicados na revista “Journal of Dairy Research” da editora “Cambridge University Press”, que se apresenta em anexo.

Por fim, existe um capítulo de conclusões gerais, em que se enunciam as possíveis contribuições da tese para o desenvolvimento tecnológico nesta área e se apresentam os caminhos de trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Nas regiões mediterrânicas, os rebanhos de ovelha são abundantes e extensamente distribuídos (Freitas e Malcata, 1996; Marcos e Esterban, 1999). Alguns queijos Portugueses, Espanhóis, Franceses e Italianos são obtidos a partir da coagulação de leite cru de ovelha com extractos aquosos da flor de algumas espécies de cardos do género *Cynara* L. (Marcos e Esterban, 1999). A espécie *Cynara cardunculus* L. cresce espontaneamente em terrenos marginais das zonas do mediterrâneo ocidental, sudoeste de Portugal, ilhas Canárias e Madeira (Férrandez-Salguero e Sanjuán, 1999) e é uma das mais usadas na produção de alguns queijos Portugueses com DOP, por exemplo, Serpa, Serra da Estrela e de Azeitão (Martins, 1999), bem como de alguns queijos Espanhóis, dos quais se destaca Los Pedroches, La Serena e Torta del Casar.

O queijo Serpa é definido, no anexo II do Decreto Regulamentar n.º 39/87 (DR, 1987), como queijo curado, de pasta semi-mole, amanteigada, com poucos ou nenhuns olhos, obtida por esgotamento lento da coalhada após coagulação do leite cru de ovelha, estreme, por acção de uma infusão de cardo (*C. cardunculus* L.) e proveniente da região demarcada, que engloba uma grande parte do Baixo Alentejo. O teor de humidade referido ao queijo isento de gordura varia entre 61% e 69%, o teor de gordura referido ao resíduo seco entre 45% e 60% e o coeficiente de maturação mínimo é de 45% (percentagem de azoto solúvel em relação ao azoto total). A tecnologia de produção deste queijo encontra-se descrita nalguns estudos (Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Roseiro *et al.*, 2003c). Não há muitos trabalhos sobre este queijo, referenciados nas bases bibliográficas consultadas (Science Direct, Blackwell-synergy, Scopus), bem como nas revistas científicas internacionais da especialidade. A caracterização do leite utilizado na produção deste queijo também foi alvo de alguns trabalhos, principalmente na última década (Carvalho, 1989; Martins, 1989; Alvarenga, 1995; Alvarenga *et al.*, 1996; Monteiro, 1998; Canada, 2001).

2.1 – Implicações químicas e estruturais da transformação de leite em queijo

2.1.1 – Estrutura da micela de caseína

Para entender a dinâmica de coagulação, bem como os processos ocorridos durante a cura, é fundamental definir um modelo aceitável para o comportamento das moléculas de proteína bem como para as alterações que se vão verificando ao longo dos processos

mais importantes durante a obtenção do queijo: a coagulação, a sinérese e a cura. As moléculas de proteína encontram-se associadas em partículas que são conhecidas como micelas de caseína e contêm cerca de 80% da proteína do leite. A sua estrutura é coloidal, a forma pode ser considerada esférica e são compostas por várias moléculas agrupadas em diferentes tipos: α_{S1} -, α_{S2} -, β -, e κ -caseínas (Schmidt, 1982; Alais, 1985; Dalglish, 1999; Horne, 2002; Farrell Jr. *et al.*, 2006).

Em todos os modelos de organização estrutural conhecidos, a κ -caseína aparece na superfície da micela e desempenha um papel fundamental na estabilidade do colóide (Heth e Swaisgood, 1982; Schmidt, 1982; Dalglish, 1999; Walstra, 1999a; Horne, 2006). Destes, o mais difundido foi proposto em 1982 por Schmidt e pode observar-se na Figura 1.

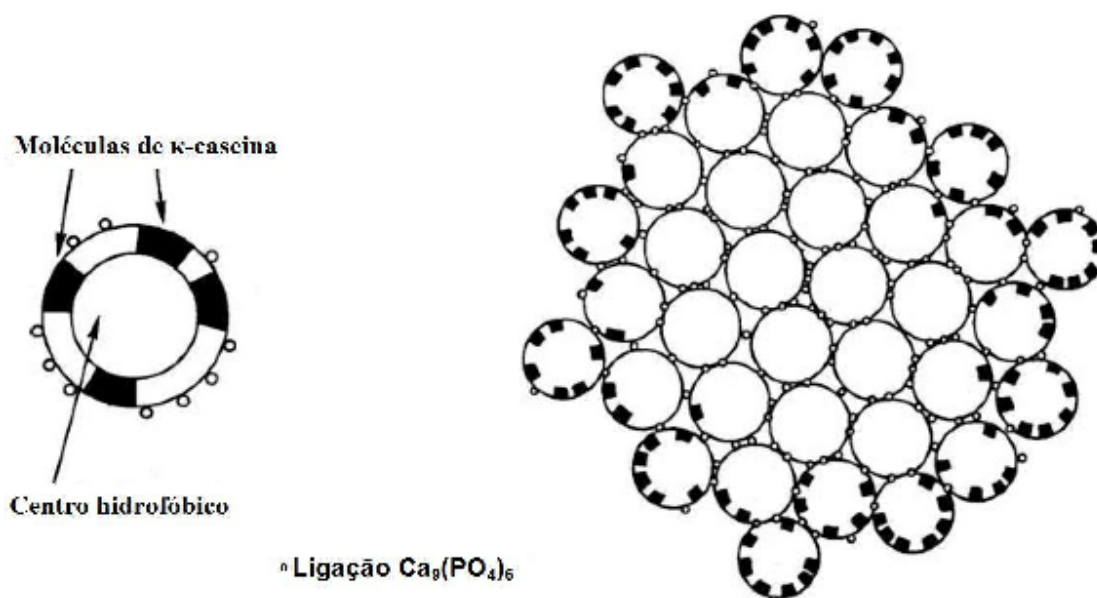


Figura 1 – Estrutura da micela de caseína (Schmidt, 1982).

As α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseínas são fosforiladas nos resíduos específicos do aminoácido serina (Ser) e contêm 8, 9–11, 5 e 1 grupos fosfato respectivamente (Farrell Jr. *et al.*, 2004). Os grupos fosfato são esterificados na forma de monoésteres de serina e, esta associação, tem a capacidade de se ligar fortemente aos cátions polivalentes (Figura 2) contribuindo para a neutralização da carga (Pinho, 2003). Para as concentrações de proteína e cálcio existentes na maior parte dos leites, as α_{S1} -, α_{S2} - e β -caseínas têm tendência a precipitar a partir desta ligação, bem como da neutralização da carga a ela associada (Farrell Jr. *et al.*, 2004). No entanto, a κ -caseína estabiliza as micelas assim

formadas num estado coloidal estável, devido ao seu comportamento simultaneamente hidrofóbico e hidrofílico, conferindo-lhe propriedades de superfície.

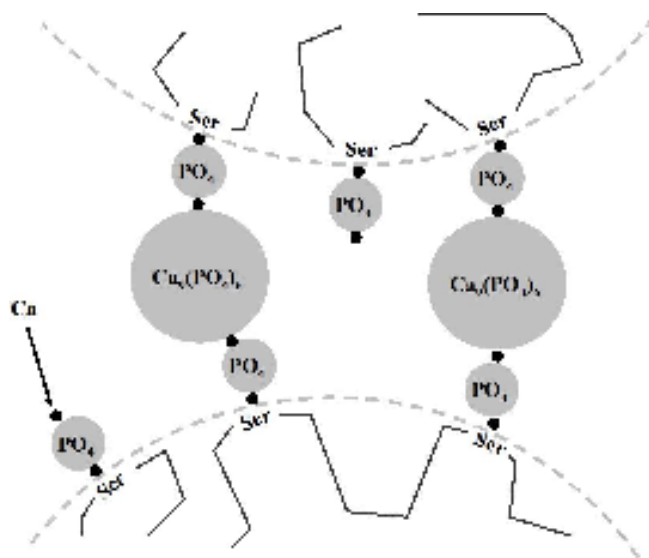


Figura 2 – Ligação fosfato de cálcio (Alais, 1985).

O modelo assenta numa orientação sub-micelar, sendo o centro hidrofóbico ocupado pelas α_{S1} -, α_{S2} - e β -caseínas, que se ligam entre si por ligações fosfato de cálcio e as sub-micelas exteriores são mais ricas em κ -caseínas, uma vez que estas têm propriedades de superfície (Chakraborty e Basak, 2008). Quanto à existência de sub-micelas subsistem algumas dúvidas (Mellema *et al.*, 2002), as quais têm motivado estudos recentes para clarificar o mecanismo da ligação (Walstra, 1999a; Dalgleish *et al.*, 2004).

Apesar destas diferenças, há unanimidade quanto à importância da ligação fosfato de cálcio, uma vez que é esta que permite ligar as diferentes caseínas sensíveis ao cálcio (Horne, 2006) e, em acréscimo, no modelo sub-micelar, esta ligação tem a responsabilidade de unir os diferentes agregados (sub-micelas) entre elas. Devido ao seu papel fundamental na estabilidade da estrutura da micela, esta ligação tem sido alvo de estudos recentes para clarificar o mecanismo de ligação (Horne, 2003, 2006).

A estrutura da micela de caseína é sensível a factores externos, como por exemplo a presença de enzimas, o pH e a temperatura. Na secção seguinte, descreve-se o mecanismo de actuação enzimática, no sentido de destabilizar esta estrutura, durante o processo de coagulação, no entanto, é essencial compreender a contribuição do pH. Em estudos desenvolvidos no leite de cabra, Jaubert *et al.* (1999) mostraram que, à medida

que o pH do leite vai descendo, entre 6,7 e 5,9, observa-se uma dissociação de 40 a 50% dos minerais da micela e uma solubilização lenta das caseínas (entre 5 e 20%, dependendo da temperatura). Para valores de pH entre 5,9 e 5,3, a dissociação mineral continua e é acompanhada por uma solubilização extensiva das caseínas (principalmente a β -caseína). Como consequência destes dois efeitos combinados, observa-se a expansão da micela, aumento da porosidade e solvatação. Os fenómenos de solvatação e expansão são mais evidentes a baixas temperaturas, porque as interações hidrofóbicas nestas condições são fracas. Para valores de pH inferiores a 5,3, próximos do ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6), observa-se a esperada desmineralização total e precipitação da caseína. Todas estas observações sugerem uma reorganização extrema da micela a pH próximo de 5,3, acompanhada de um aumento dramático das dimensões das caseínas e o início de uma nova fase de agregação (Jaubert *et al.*, 1999).

2.1.2 – Coagulação

A coagulação enzimática da proteína do leite ocorre em duas fases e pode ser efectuada por meio de enzimas de origem animal, vegetal e microbiana (Alais, 1985; Macedo *et al.*, 1993; Macedo *et al.*, 1996a; Esteves *et al.*, 2003; Gunasekaren e Ak, 2003).

A primeira fase designa-se por enzimática e o coagulante promove um corte na ligação peptídica existente entre a posição 105 e 106, constituída pelos aminoácidos fenilalanina e metionina da κ -caseína (Phe₁₀₅-Met₁₀₆). A enzima que apresenta maior especificidade para quebra desta ligação, a quimosina, é de origem animal. Esta acção divide a κ -caseína em dois resíduos: o resíduo glicomacropéptido (GMP), solúvel, hidrofílico, constituído pelos aminoácidos 106-169, o qual fica no soro e o resíduo para- κ -caseína, insolúvel, hidrofóbico, constituído pelos aminoácidos 1-105, o qual permanece ligado às α _{S1}- e β -caseínas e, por ser altamente hidrofóbico e alcalino, conduz à destabilização das micelas (Alais, 1985; Dalgleish, 1999; Gunasekaren e Ak, 2003; Awad, 2007). O modelo, em corte, da micela de caseína, que se apresenta na Figura 3, destaca a importância do resíduo GMP na estabilização da sua estrutura. O carácter hidrofílico do resíduo GMP promove a sua disposição à superfície da micela, conferindo-lhe um aspecto filamentosso (Walstra, 1999a).

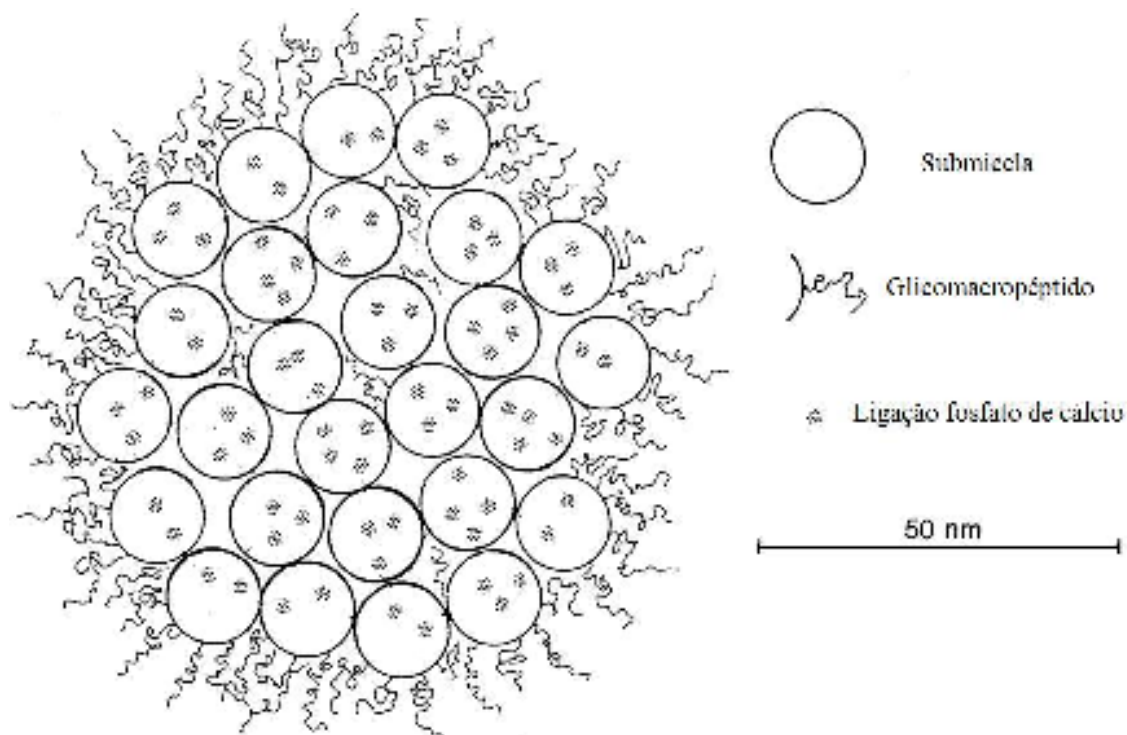


Figura 3 – Modelo em corte da micela de caseína (Walstra, 1999a).

A primeira acção do agente coagulante é a quebra da ligação que fixa o resíduo GMP à κ -caseína (Phe₁₀₅-Met₁₀₆), separando-o da estrutura micelar, desestabilizando a micela e obrigando-a ao início de uma nova ordem coloidal: a segunda fase da coagulação. Apesar de haver uma grande semelhança entre as enzimas de origem vegetal e animal (quimosina), o facto é que as enzimas de origem vegetal não têm um grau de especificidade tão grande para a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína. No entanto, são mais proteolíticas e têm uma maior especificidade no que se refere à hidrólise das α _S- e β -caseínas (Macedo *et al.*, 1993, 1996b).

Na segunda fase da coagulação, as micelas modificadas tendem a agregar-se e a formar uma rede, inicialmente débil, que vai aprisionando os glóbulos de gordura, a água e os materiais solúveis em água (Omar e El-Zayat, 1986; Lawrence *et al.*, 1987). A agregação corresponde à formação do gel pela associação de resíduos de micela modificados, e é altamente dependente do pH, da temperatura, do conteúdo em cálcio e em caseína. Uma subida nestes três últimos factores provoca uma diminuição no tempo de coagulação e um aumento na firmeza do gel (Lopez *et al.*, 1998; Gunasekaren e Ak, 2003; St-Gelais e Hache, 2005; Sandra *et al.*, 2007). A maioria dos autores é unânime relativamente à importância decisiva das ligações fosfato de cálcio na agregação das

micelas (Mellema *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2007). O número destas ligações aumenta com a concentração de Ca^{2+} no meio (Najera *et al.*, 2003; Awad, 2007) mas, por outro lado, diminui com o decréscimo do pH, pois o nível de fosfato de cálcio coloidal decresce e este começa a solubilizar a pH inferior a 5,8 (Le Graët e Gaucheron, 1999; Lucey *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2007).

A agregação de micelas de caseína forma uma estrutura constituída por cordões com cerca de três unidades micelares de largura e dez de comprimento, alternados por alguns nódulos de unidades micelares (Walstra, 1999b). Estes cordões começam a crescer e a ocupar o volume do recipiente e o gel começa a formar-se (Green, 1999). A rede, entretanto formada, é irregular e tem bastantes poros de vários micrómetros de largura. Posteriormente, as partículas começam a agregar-se em cadeias cada vez maiores, que começam a ramificar e, por fim, formam a estrutura de gel assumida pela rede proteica conhecida como coalhada (Walstra, 1999b).

Devido à natureza dos poros e à dinâmica de formação das cadeias, a coalhada tem tendência a contrair provocando a exsudação do líquido. Este fenómeno é conhecido por sinérese (Alais, 1985; Walstra, 1999b; Mellema *et al.*, 2002; Gunasekaren e Ak, 2003) e depende de vários factores como o tratamento térmico, a homogeneização do leite, a quantidade sais como cloreto de cálcio e cloreto de sódio, a quantidade de agente coagulante, a temperatura de coagulação, o pH e o uso de práticas como corte e lavagem da coalhada (Walstra, 1999c). O controlo da sinérese permite, aos produtores de queijo, controlar a humidade final e a actividade da água (a_w) da coalhada fresca e, assim, exercer influência determinante na dinâmica do processo de maturação. Como veremos adiante (secção 2.3.1.1 – Propriedades químicas), durante a fase inicial da cura observa-se um abaixamento do pH que fomenta o aumento da sinérese, devido a reajustes nas ligações proteína-proteína no gel de caseína.

2.2 – Maturação

A composição básica e estrutura da rede proteica são condicionadas pelas operações de obtenção da coalhada. Contudo, a maturação (ou cura) tem um papel fundamental no desenvolvimento das características individuais de cada queijo. Apesar de haver algumas variedades de queijos que são consumidas frescas, a maioria são consumidas após um período de maturação que pode ir dos 30 dias até mais de dois anos (Fox *et al.*, 1999). Durante este período ocorrem três eventos bioquímicos primários: o

metabolismo da lactose, o metabolismo das proteínas e o metabolismo dos lípidos, conhecidos por glicólise, proteólise e lipólise, respectivamente. Estas reacções primárias são as responsáveis pelas alterações ocorridas durante a cura que mais determinam a textura e o desenvolvimento do “flavour” básico dos queijos. No entanto, numerosas modificações secundárias ocorrem paralelamente e, não só são responsáveis pelo desenvolvimento dos aspectos finos do “flavour”, como também contribuem para modificar a textura (Fox *et al.*, 1999). Estes fenómenos complexos afectam todos os compostos solúveis e insolúveis da matriz, e são devidos à acção das enzimas do agente coagulante, dos microrganismos e, com menor importância, das enzimas nativas do leite (García *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1999; Narimatsu *et al.*, 2003).

O tipo de leite usado é um dos factores mais importantes na maturação de queijo devido à presença de microrganismos de diferentes géneros. Em queijos obtidos a partir de leite cru, os microrganismos dominantes, durante a cura, são bactérias ácido lácticas dos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Pensa-se que estas bactérias sejam as principais responsáveis pelo desenvolvimento dos aromas ao longo da cura e, enquanto estas crescem, as leveduras, enterobactérias e estafilococos diminuem drasticamente para valores residuais. No final da cura, estas bactérias lácticas prevalecem e controlam a proliferação de microrganismos indesejáveis (Dahl *et al.*, 2000).

2.2.1 – Glicólise

Grande parte da lactose é extraída com o soro durante a produção de queijo, apesar de permanecer sempre uma quantidade de lactose residual dissolvida no soro existente nos poros da matriz da coalhada. Esta é rapidamente convertida em ácido láctico pela acção das bactérias lácticas e, a acidificação do meio, tem um efeito importante na estrutura da matriz proteica, por via da desmineralização das micelas de caseína (Lawrence *et al.*, 1987). Um metabolismo da lactose residual completo e extenso é essencial para a produção de queijos de boa qualidade (Fox *et al.*, 1999) e a sua rapidez depende, entre outros factores, da quantidade de sal existente na coalhada, uma vez que as bactérias lácticas de arranque são mais sensíveis ao sal do que as bactérias lácticas não de arranque.

Para além das bactérias lácticas, existem outros microrganismos capazes de fermentar os monossacáridos da lactose e transformá-los em diversos produtos, que podem ser

indesejáveis e produzem defeitos no queijo. Por exemplo, os coliformes transformam a lactose em ácido láctico, em ácido acético e em ácido fórmico, enquanto que as leveduras transformam-na em ácidos orgânicos, em álcool, em acetaldeído e em CO₂ (Dumais *et al.*, 1991).

O ácido láctico resultante da fermentação da lactose também sofre modificações. Por exemplo, pode combinar-se com o cálcio do soro para formar lactato e, dependendo do tipo de queijo, o lactato e o ácido láctico podem ser transformados em ácido propiónico, acético e CO₂ (Dumais *et al.*, 1991).

2.2.2 – Proteólise

A matriz proteica sofre mudanças estruturais durante a cura. Em queijos recentemente coagulados, os agregados de caseína perdem a sua forma esférica devido aos fenómenos ocorridos durante a coagulação, passando a apresentar uma estrutura fibrosa conhecida como rede proteica e, à medida que a cura avança, ocorrem processos de dissociação nas proteínas fibrosas, levando à formação de camadas com estrutura mais homogênea (Omar, 1984; Omar e El-Zayat, 1986). O fenómeno responsável por esta alteração é a proteólise, que é o evento primário mais complexo que ocorre durante a maturação e o mais importante no desenvolvimento do perfil de “flavour” e da textura (Innocente, 1997; Fox *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2001; Pinho, 2003; Poveda *et al.*, 2004a). A proteólise contribui para as alterações neste perfil de quatro formas diferentes: (1) libertação de aminoácidos e péptidos, que podem estar directamente associados ao sabor amargo e, indirectamente através da via do catabolismo dos aminoácidos, pela formação de compostos que influenciam o “flavour” como aminas, ácidos, tióis, tioésteres, entre outros; (2) maior libertação de compostos sápidos durante a mastigação; (3) subida do pH devido à produção de compostos alcalinos dos quais se destaca o NH₃ e; (4) colapso da rede proteica, aumento de pH e captação da água, devido aos recém-formados grupos amina e carboxilo (Fox *et al.*, 1999).

As enzimas responsáveis pela proteólise podem-se agrupar em dois grupos principais: as endoproteínases e as exopeptidases. As endoproteínases cortam as cadeias polipeptídicas em ligações peptídicas específicas no interior da cadeia, semelhante à especificidade da quimosina para a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína. As exopeptidases hidrolisam um (ou alguns) aminoácido(s) de cada vez, em ambos os lados N-terminal (aminopeptidases) e C-terminal (carboxipeptidases) dos polipeptídeos

(Raksakulthai *et al.*, 2002). A proteólise é um fenômeno muito complexo, devido à diversidade das proteínas do leite, à variedade da flora existente e à variedade das enzimas proteolíticas que nele participam (Dumais *et al.*, 1991). Os principais contribuintes para o processo de proteólise são: o agente coagulante, as proteases e as peptidases do fermento láctico e/ou da flora secundária, bem como das enzimas naturais do leite (McSweeney e Fox, 1997; Fox *et al.*, 1999; Narimatsu *et al.*, 2003).

A maior parte dos estudos de proteólise, foram elaborados em queijos fabricados com leite de vaca pasteurizado, com culturas lácteas e com agentes coagulantes à base de quimosina e pepsina (O'Keeffe *et al.*, 1978). Apesar de haver algumas divergências quanto à importância relativa do agente coagulante e das enzimas produzidas pelos microrganismos na proteólise, foi estabelecido que as peptidases do agente coagulante são responsáveis pela fase inicial da proteólise, que corresponde à produção de péptidos de cadeia longa, sendo as peptidases microbianas responsáveis pela fase final da proteólise, que corresponde à produção de péptidos de cadeia curta e aminoácidos (O'Keeffe *et al.*, 1978). Assim, há uma fase inicial da cura em que agregados de caseína são transformados em péptidos de grandes dimensões, protagonizada pelas enzimas do agente coagulante e pelas enzimas naturais do leite e uma fase final, onde estes péptidos são transformados em péptidos de menores dimensões. Nesta segunda fase intervêm enzimas provenientes das bactérias lácticas e da flora secundária, que vão transformar estes pequenos péptidos de cadeia curta em aminoácidos livres (Omar, 1984; McSweeney e Fox, 1997; Sousa *et al.*, 2001).

A degradação das caseínas é sequencial. A primeira ligação a ser quebrada, como já foi referido anteriormente, é a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína. Quanto às outras caseínas, as α _S-caseínas são mais sensíveis à proteólise do que as β -caseínas (Férrandez-Salguero e Sanjuán, 1999; Poveda *et al.*, 2004a). Numa fase inicial da proteólise a degradação das β -caseínas é predominante. No entanto, no final, observam-se taxas de degradação das α _S-caseínas superiores e, como resultado final, a extensão de degradação no final da cura é superior para as α _S-caseínas (Macedo e Malcata, 1997; McSweeney e Sousa, 2000; Sousa *et al.*, 2001; Gorostiza *et al.*, 2004). A evolução do pH do queijo ao longo da cura, pode estar relacionada com estas diferenças. Enquanto que a extensão da hidrólise da β -caseína é semelhante para valores de pH 6,5 e 5,5, no caso das α _S-caseínas só se verifica hidrólise completa a pH 5,5. Em ambas as caseínas, a hidrólise é mais rápida para pH's inferiores (Sousa e Malcata, 1998).

A hidrólise das β -caseínas tem como resultado um resíduo C-terminal com características hidrofóbicas, que se designa por γ -caseína e polipéptidos N-terminais hidrofílicos. Estes dois polipéptidos interagem entre si e formam um complexo solúvel no soro, designado proteose-peptona (Visser, 1993). Os produtos da hidrólise das β -caseínas poderão estar relacionados com o aparecimento do sabor amargo (Alais, 1985; Visser, 1993; Madsen e Ardo, 2001). As α_S -caseínas têm um comportamento diferente. Enquanto que a hidrólise das α_{S1} -caseínas é lenta e também tem como produto as γ -caseínas, as α_{S2} -caseínas têm uma hidrólise mais rápida e já foram detectados onze péptidos diferentes desta reacção, todos eles associados a cortes em ligações constituídas por lisina e arginina (Alais, 1985).

As enzimas provenientes de agentes coagulantes de origem vegetal, principalmente extractos de flor de *C. cardunculus* L., têm sido alvo de vários estudos (Faro, 1991; Roseiro, 1991; Martins *et al.*, 1996; Sousa e Malcata, 1998; Fernández-Salguero e Sanjuán, 1999; Martins, 1999; Sousa *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2003; Esteves *et al.*, 2003; Roseiro *et al.*, 2003b; Tavarria *et al.*, 2003; Roseiro *et al.*, 2005; Silva e Malcata, 2005; Prados *et al.*, 2006; Tejada. *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Está bem estabelecido por estes autores que o sistema enzimático existente nos extractos de flor do *C. cardunculus* é constituído por 3 formas de proteases ácidas (I, II e III). Como as formas I e II são similares, é comum agruparem-se e designar-se a este grupo por cardosina A, sendo a forma III designada por cardosina B. O complexo enzimático cardosina A apresenta semelhanças com a quimosina, enquanto que a cardosina B é similar à pepsina. Ou seja, a acção proteolítica da cardosina B não é tão específica (Silva e Malcata, 2005). Por outro lado, as enzimas vegetais demonstram ter maior capacidade proteolítica que as enzimas animais e são específicas para um maior número de ligações peptídicas (Faro, 1991; Fernández-Salguero e Sanjuán, 1999; Sousa *et al.*, 2001; Esteves *et al.*, 2003; Roseiro *et al.*, 2003b; Tavarria *et al.*, 2003; Prados *et al.*, 2006).

É comum subdividir a proteólise em dois tipos sequenciais: a proteólise primária ou extensão da proteólise, que indica até que ponto as caseínas estão hidrolisadas em péptidos solúveis em água, sendo medida a partir do quociente entre azoto solúvel em água e azoto total, e a proteólise secundária ou o grau de profundidade da proteólise, que mede até que ponto esses péptidos foram degradados em péptidos de pequenas dimensões, ou aminoácidos, podendo ser determinada a partir da relação entre azoto não

proteico, ou azoto aminoacídico, e azoto total (ver secção 2.3.1.1 – Propriedades químicas). A extensão da proteólise em queijos obtidos a partir de agentes coagulantes vegetais é superior à de queijos obtidos a partir de coalho animal. Pelo contrário, o grau de profundidade da proteólise é semelhante em ambos os tipos de queijos. Assim, enquanto que a extensão da proteólise depende das enzimas do agente coagulante, o grau de profundidade da proteólise depende das enzimas microbianas das bactérias lácticas (Fox, 1989; Fernández-Salguero e Sanjuán, 1999; Pereira *et al.*, 2008).

A acção proteolítica dos extractos de *C. cardunculus* é superior à observada noutras espécies do género *Cynara*, como o *C. humilis*. Apesar disso, a acção proteolítica deste último agente coagulante é superior à observada usando coalho animal (Fernández-Salguero e Sanjuán, 1999; Vioque *et al.*, 2000). Como foi referido, o sistema enzimático do *C. cardunculus* tem duas enzimas componentes: uma com actividade semelhante à quimosina, e outra com actividade semelhante à pepsina, enquanto que o sistema enzimático de outros cardos, como o *C. humilis*, apresenta apenas uma componente enzimática semelhante à quimosina (Vioque *et al.*, 2000; Esteves *et al.*, 2003).

A proteólise ocorrida na cura do queijo de ovelha depende do procedimento utilizado na sua produção (Roseiro *et al.*, 2003a). Por exemplo, a pasteurização do leite mostrou ter uma influência marcada na proteólise: verifica-se que a degradação das κ - e β -caseínas é mais intensa em queijo obtido a partir de leite cru, enquanto que as α_{S2} -caseínas é mais intensa em queijo obtido a partir de leite pasteurizado. A pasteurização do leite não tem influência na proteólise da α_{S2} -caseína (Gaya *et al.*, 2005).

Estudos realizados em queijo Serra da Estrela, demonstraram que a extensão da proteólise é muito elevada, mas o grau de profundidade é moderado. As taxas de crescimento das fracções azotadas são mais elevadas nos 3 primeiros dias de cura, porque neste período ocorre um aumento do azoto solúvel em água na ordem dos 3,2% dia⁻¹ e do azoto não proteico na ordem dos 14,3% dia⁻¹ (Tavaria *et al.*, 2003).

2.2.3 – Lipólise

A lipólise é a hidrólise dos lípidos e ocorre por acção de lipases naturais do leite e de lipases de origem microbiana. A maior parte dos queijos têm uma actividade lipolítica muito ligeira durante a cura e, muitos consumidores, associam um elevado grau de ácidos gordos livres nos queijos ao sabor a ranço (Fox *et al.*, 1999). No entanto, a libertação de ácidos gordos voláteis, principalmente os de baixo peso molecular,

contribui para o desenvolvimento do aroma característico do queijo. Dentro destes, são de realçar o cáprico e o caprótico, que conferem ao queijo o que muitos designam por cheiro característico (Silva, 2001).

No leite existem uma série de lipases naturais, sensíveis à temperatura, sendo necessário um tratamento de 78 °C/10 s para a sua inactivação completa. Assim, queijos obtidos a partir de leite cru, ou apenas submetidos a tratamentos térmicos muito ligeiros, estão sujeitos à acção destas lipases, que são específicas para a posição 3 do triglicérido, onde o ácido butírico se encontra preferencialmente esterificado na gordura do leite, o que explica a concentração elevada deste ácido nalguns tipos de queijos (Fox *et al.*, 1999).

As bactérias lácticas de ambos os géneros, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, contêm uma actividade proteolítica elevada. No entanto, a actividade lipolítica é reduzida (Choisy *et al.*, 1987) e pensa-se que a lipólise se deve principalmente às enzimas do leite e às enzimas produzidas por bactérias lácticas não de arranque. Quando se usam extractos de flor do cardo como agente coagulante, as enzimas existentes na mistura podem ter actividade lipolítica significativa (Macedo *et al.*, 1996a).

2.3 – Queijo

2.3.1 – Caracterização

2.3.1.1 – Propriedades químicas

pH

O pH tem importância decisiva nas propriedades texturais do queijo, devido ao seu efeito na estrutura das caseínas, quer através de alterações provocadas na carga, quer a partir da desmineralização que pode ocorrer por acção dum diminuição do pH (Watkinson *et al.*, 2001).

Na monitorização do pH ao longo da maturação, observa-se uma fase inicial de diminuição do pH, correspondente ao consumo da lactose e produção de ácido láctico pela acção do crescimento das bactérias ácido-lácticas (quer sejam nativas quer sejam adicionadas) e uma fase final da cura, em que se verifica um aumento de pH, atribuído à utilização do ácido láctico com formação de produtos neutros ou alcalinos (McSweeney e Fox, 1993; Watkinson *et al.*, 2001). O abaixamento de pH observado na fase inicial da

cura é mais evidente em queijos obtidos a partir de leite cru do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado, em que são utilizadas bactérias ácido-lácticas de arranque (Awad, 2006). No entanto, quando se combina a utilização de bactérias de arranque com o uso de leite cru, a descida de pH é ainda mais evidente (Macedo *et al.*, 2004).

Gordura

A gordura tem influência fundamental no desenvolvimento das características texturais e na formação de aroma (Canada, 2001). A gordura encontra-se no queijo sob a forma de glóbulos gordos. Estes têm dimensões elevadas relativamente às micelas e são aprisionados durante a formação da matriz proteica que ocorre durante o processo de coagulação (Omar e El-Zayat, 1986; Lawrence *et al.*, 1987). Devido às suas elevadas dimensões, a presença de glóbulos gordos obriga à existência de grandes extensões de rede proteica, com uma densidade de ligações reduzida, resultando numa estrutura menos elástica e com uma textura mais macia e homogénea. Uma matriz proteica com menor quantidade de glóbulos gordos apresenta menos interrupções, contribuindo para uma textura mais dura (Drake *et al.*, 1996), ou com propriedades mais elásticas (Ustunol *et al.*, 1995). A firmeza é inversamente proporcional à quantidade de gordura do queijo, que actua na sua matriz como agente lubrificante (Johnston e Murphy, 1984).

Quanto à participação da gordura na formação do aroma do queijo, a gordura do leite caracteriza-se por ter uma elevada concentração de ácidos gordos de cadeia curta que, no decurso da maturação, podem ser libertados por acção da lipólise condicionando fortemente o aroma do queijo. A lipólise é catalizada por enzimas lipolíticas que são libertadas pelos microrganismos contaminantes gram negativos (Moussa *et al.*, 2008). A influência da gordura na produção do aroma característico dos queijos depende de factores como o tipo de queijo (Nájera *et al.*, 1993), bem como a alimentação e o período de lactação, devido à influência que estes factores podem ter na composição da fracção gorda nos diferentes ácidos gordos (Macedo *et al.*, 1996a),

Os queijos podem classificar-se, quanto ao teor de gordura referida ao resíduo seco (GRS), em: extragordo (GRS > 60%), gordo (45% < GRS < 60%), meio gordo (25% < GRS < 45%), pouco gordo (10% < GRS < 25%) e magro (GRS < 10%) (DR, 1990).

Humidade

A humidade final da maioria dos queijos curados é condicionada pela taxa e a duração da sinérese e pela compactação da estrutura de caseína. Após a coagulação, os processos que se seguem, como moldagem, prensagem e salga, que diferem conforme o tipo de queijo, são acompanhados por um abaixamento de pH e originam uma perda de humidade considerável, através da remoção do soro (Walstra, 1999c).

O teor de humidade referida ao queijo isento de gordura (HQIG) é usado para classificar queijos quanto à consistência, existindo diversas classificações, com diferentes classes (Fox, 1999). Na Legislação Portuguesa (DR, 1990), as classes usadas na classificação são: extraduro (HQIG < 51%), duro (49% < HQIG < 56%), semi-duro (54% < HQIG < 63%), semi-mole (61% < HQIG < 69%) e mole (HQIG > 67%).

Azoto e fracções azotadas

A caseína é incorporada na matriz proteica durante o processo de coagulação e, como vimos anteriormente, durante o processo de cura vai-se transformando em péptidos cada vez mais pequenos e, por fim, em aminoácidos e outros produtos do processo de proteólise. O estudo da proteólise envolve, muitas vezes, a determinação de fracções azotadas, como o azoto solúvel em água, o azoto não proteico e o azoto aminoacídico, que correspondem à percentagem de cada um destes componentes azotados em relação ao azoto total (McSweeney e Fox, 1999).

A fracção de azoto solúvel em água (NSA%) é normalmente encarada como um indicador de maturação. Designa-se por coeficiente de maturação, pois contém as proteínas do soro, bem como os produtos resultantes da hidrólise das caseínas, dos péptidos de elevado e baixo peso molecular, e dos aminoácidos, entre outros. Esta fracção é definida por muitos autores como a extensão da proteólise (Férrandez-Salguero e Sanjuán, 1999; Pavia *et al.*, 1999; Irigoyen *et al.*, 2002; Verdini *et al.*, 2005), uma vez que apenas tem capacidade de medir a composição em fracções peptídicas solúveis em água, independentemente da dimensão destas (Verdini *et al.*, 2005). Os valores de NSA% aumentam ao longo da cura, sendo mais pronunciado em queijos obtidos com coalho animal do que queijos em obtidos com coalho vegetal (Férrandez-Salguero e Sanjuán, 1999).

As fracções de azoto não proteico (NNP%) e azoto aminoacídico (NA%) representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto as proteínas e os péptidos estão

a ser degradados em péptidos de média e pequena dimensão, indicando se o processo de cura foi mais ou menos completo (Gorostiza *et al.*, 2004; Horne *et al.*, 2005). Estas fracções são boas indicadores de actividade proteolítica das peptidases microbianas, uma vez que os valores destas fracções, no final da cura, não dependem do tipo de agente coagulante usado (McSweeney e Fox, 1993; Fernández-Salguero e Sanjuán, 1999; Vioque *et al.*, 2000).

2.3.1.2 – Propriedades físicas

Textura

A textura representa um papel fundamental na aceitação dos alimentos pelos consumidores (Sousa *et al.*, 1997; Sousa, 2001) e, em particular nos queijos, é um dos atributos mais importantes na determinação da identidade do produto (Buffa *et al.*, 2001). Existem diversas definições de textura (ISO 5492, 1992; prNP 4263, 1992; Sánchez, 1996) e nenhuma é plenamente satisfatória. Todavia, a textura dos alimentos pode definir-se resumidamente da seguinte forma (Bourne, 1982): (1) é um conjunto de propriedades físicas que deriva da estrutura do alimento, (2) tem o seu lugar próprio dentro das propriedades físicas dos alimentos, (3) é sentida pela percepção ao toque na boca ou por outras partes do corpo, como por exemplo as mãos, (4) não está relacionada com as sensações químicas de aroma e sabor e (5) a sua medição objectiva faz-se recorrendo a funções de massa, distância e tempo.

A textura do queijo é condicionada inicialmente pelo pH e pela razão entre a caseína intacta e a humidade (Yun *et al.*, 1994). O abaixamento de pH provoca a desmineralização dos componentes das micelas que, por sua vez, tem uma grande influência nas ligações entre as caseínas na rede proteica (Lawrence *et al.*, 1987).

Nas duas primeiras semanas de cura observam-se alterações bastante acentuadas na textura, devido à hidrólise das α_{S1} -caseínas e à formação de produtos α_{S1} -I que enfraquecem a sua estrutura (Lawrence *et al.*, 1987). Posteriormente, as mudanças na textura são lentas e são determinadas principalmente pela taxa de proteólise, pela relação entre o teor em sal e a humidade e pela temperatura. O decréscimo da a_w durante a cura, devido à libertação de grupos iónicos com capacidade de reterem água e, em muitos casos, devido à evaporação da água, também pode ser importante no desenvolvimento da textura (Fox *et al.*, 1999). Assim, apesar da proteólise desempenhar

um papel importante no amolecimento da estrutura de alguns queijos (Attaie, 2005; Pripp *et al.*, 2006), noutros prevalece o efeito da diminuição do a_w e/ou evaporação da água que provoca um endurecimento do queijo, uma vez que se perdem propriedades plastificantes (Attaie, 2005; Awad, 2006).

Existem diferentes testes, largamente difundidos, para avaliar instrumentalmente a textura de queijos em compressão, como a análise de perfil de textura (TPA), a compressão uniaxial e a relaxação da tensão (Ak e Gunasekaran, 1992; Risch, 1992; Raphaelides *et al.*, 1995; Pavia *et al.*, 1999; Fenelon e Guinee, 2000; Breuil e Meullenet, 2001; Raksakulthai *et al.*, 2002; Verdini e Rubiolo, 2002b; Adhikari *et al.*, 2003; O'Mahony *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2006; Garde *et al.*, 2007; Juan *et al.*, 2008). No entanto, testes alternativos em penetração, com sondas cilíndricas e cónicas, têm-se mostrado eficazes na monitorização da textura de queijos, principalmente quando são de pasta mole (Korolczuk e Mahaut, 1990; Kaya, 2002; Benedito *et al.*, 2006; Abrahama *et al.*, 2007) e, a utilização destes testes é mais consistente com a análise sensorial do que os testes de compressão (Stampanoni e Noble, 1991). Em queijos de ovelha de pasta semi-mole, a penetração também se mostrou eficaz para discriminar diferenças entre queijos e monitorizar a evolução da cura dos mesmos. Dos parâmetros de textura estudados (dureza, adesividade e coesividade) a dureza foi o que mostrou maior eficácia na caracterização da textura de queijos de ovelha de pasta semi-mole, mostrando-se bem correlacionada com o tempo de cura (Alvarenga, 2000; Alvarenga *et al.*, 2001; Alvarenga e Sousa, 2001).

A composição tem importância capital na textura de um queijo (Alvarenga, 2000). Como vimos, a gordura e a humidade promovem a lubrificação da rede proteica, ou seja, funcionam como componentes plastificantes. Queijos com baixo teor de gordura apresentaram uma pasta mais dura e elástica (Chen *et al.*, 1979; Medina *et al.*, 1991; Stampanoni e Noble, 1991; Bryant *et al.*, 1995; Drake *et al.*, 1996; Fenelon e Guinee, 2000; Madsen e Ardo, 2001; Awad, 2006). Uma das maiores dificuldades de produzir queijos com baixo teor de gordura, por motivos dietéticos, é conseguir que a sua estrutura seja lisa e maleável (Madsen e Ardo, 2001). O aumento dos teores de sal e caseína também promovem um aumento da dureza (Medina *et al.*, 1991; Kaya, 2002; Cunha *et al.*, 2006).

O tratamento térmico também influencia as propriedades texturais. Queijos obtidos a partir de leite pasteurizado, apresentam menor elasticidade das massas frescas, mas, no

final da cura, apresentam valores mais elevados de dureza, quando comparados com queijos obtidos a partir de leite cru, provavelmente devido às maiores taxas de proteólise observadas quando o queijo é obtido a partir de leite cru (Buffa *et al.*, 2001; Awad, 2006).

Resumindo, pode-se dizer que a textura do queijo depende de 3 factores fundamentais: a humidade, o pH e a taxa de proteólise. O desenvolvimento destas propriedades já foi descrito em secções anteriores (2.1.2 – Coagulação, 2.2.1 – Glicólise e 2.2.2 – Proteólise).

Propriedades viscoelásticas

O comportamento reológico do queijo é viscoelástico, ou seja, o material exhibe, em simultâneo, os comportamentos de sólido elástico e de líquido viscoso, para um intervalo muito grande de condições. Um sólido elástico é representado esquematicamente pela mola de Hooke que armazena a energia mecânica durante a deformação e liberta-a após remoção das forças externas, voltando à forma inicial. Um líquido viscoso é representado, esquematicamente, por um amortecedor mecânico e caracteriza-se por dissipar a energia durante a deformação. O comportamento viscoelástico pode ser observado a partir de testes não destrutivos, ou seja, quando se aplicam tensões (ou deformações) que não destroem a estrutura do material (Gunasekaran e Ak, 2003).

As medições em que se empregam tensões oscilatórias de baixa amplitude, SAOS “small amplitude oscillatory stress”, são usadas para estudar a viscosidade linear de queijos. Estes testes permitem determinar os módulos de deformação, ou seja, o módulo elástico ou conservativo (G') e o módulo viscoso ou dissipativo (G''), em função da frequência (ω), nas condições de teste em que o material se apresenta na região viscoelástica linear, LVE “linear viscoelastic”. O módulo conservativo ou elástico (G') mede a energia armazenada e reconvertida por ciclo, enquanto que o módulo dissipativo ou viscoso (G'') mede a energia dissipada por ciclo de deformação. A tangente dissipativa, $\tan \delta$, obtém-se a partir da relação entre o módulo viscoso e o módulo elástico (G''/G'). Quando este valor é inferior a 1 a estrutura apresenta características tipo-sólido, uma vez que predomina a componente elástica; quando é superior a 1 as características da estrutura são tipo-líquido, pois predomina a componente viscosa (Subramanian e Gunasekaran, 1997; Messens *et al.*, 2000). Outra forma de apresentar

os resultados dos SAOS é através da viscosidade complexa η^* , que está relacionada com as componentes viscosas (parte real da viscosidade η') ou com a componente elástica (parte complexa da viscosidade $-i\eta''$); a tangente dissipativa (G''/G') também pode estar relacionada com a viscosidade complexa, sendo expressa pela relação η'/η'' (Alves, 2003). Estas medições são realizadas em reômetros, que se podem classificar de tensão controlada ou de deformação controlada conforme a variável de “input” (Gunasekaren e Ak, 2003).

A viscosidade complexa pode ser representada em função da frequência, a partir da lei de potência ($|\eta^*| = \alpha\omega^{-b}$ ou $\log |\eta^*| = \log \alpha - b \times \log \omega$), em que $\log \alpha$ e b podem ser obtidos a partir do ajuste logarítmico dos dados experimentais, sendo $\log \alpha$ uma função das propriedades viscoelásticas que depende da consistência do material, e b relata a dependência das propriedades viscoelásticas em relação à frequência (Kasapis *et al.*, 1997).

Considerando o exemplo de reômetros de tensão controlada, em que se impõe uma tensão sinusoidal sobre o material, existem quatro tipos fundamentais de testes SAOS, dependendo das variáveis em estudo (Gunasekaren e Ak, 2003): (1) nos varrimentos de tensão medem-se os módulos (G' e G'') quando se faz crescer a tensão, mantendo a frequência constante, por exemplo a 0,1, 1 ou 10 Hz, e são usados geralmente para determinar o ponto crítico, ou seja, o valor de tensão a partir do qual os módulos (G' e G'') dependem da tensão (variável de “input”) e, por esse motivo, devem-se realizar para determinar o limite da viscoelasticidade linear (LVE) (Yun *et al.*, 1994; Subramanian e Gunasekaran, 1997); (2) nos varrimentos de frequência medem-se os módulos (G' e G''), numa gama crescente de frequências, com tensão constante e inferior ao limite LVE, sendo que o resultado deste teste é conhecido como o espectro mecânico do material. Estes testes são utilizados para determinar diferenças estruturais entre diferentes tipos de queijos (Messens *et al.*, 2000; Karoui e Dufour, 2003) ou, por exemplo, para monitorizar a evolução da estrutura ao longo do processo de maturação (Messens *et al.*, 1999) e também no desenvolvimento de produtos pouco gordos ou com pouco sal (Yun *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1997). Tipicamente, usam-se intervalos de frequências entre 10^{-2} e 10^2 mas, caso se justifique, a amostra tenha estabilidade e o reómetro tenha sensibilidade suficiente, podem-se baixar as frequências até 10^{-5} , sabendo que estas frequências conduzem a tempos de 28 horas por ciclo. Nestes casos, deve-se ter em consideração a estabilidade do material; (3) no varrimento de

temperaturas, mantêm-se constantes a tensão e frequência e faz-se variar a temperatura. Estes testes são usados para investigar transições de fase a partir do ponto crítico (por exemplo $G' = G''$) e, no caso dos queijos em que o ponto de fusão é uma propriedade importante, são testes obrigatórios, como acontece no Emental (Karoui *et al.*, 2003), no Mozzarella (Hsieh *et al.*, 1993; Ribero *et al.*, 2007a) ou no Cheedar (Ustunol *et al.*, 1995; Sutherawattananonda e Bastian, 1998); (4) no varrimento de tempo, mantêm-se constantes a tensão, a frequência e a temperatura e determinam-se os módulos variando apenas o tempo. Este teste pode ser usado para monitorizar reacções enzimáticas, como por exemplo o processo de coagulação do leite (Johnston e Murphy, 1984; Esteves *et al.*, 2003).

Destes testes, o mais importante na análise da estrutura dos materiais é o varrimento de frequências e, na Figura 4, pode-se observar o comportamento reológico de diferentes tipos de sistemas a partir da análise dos seus espectros mecânicos.

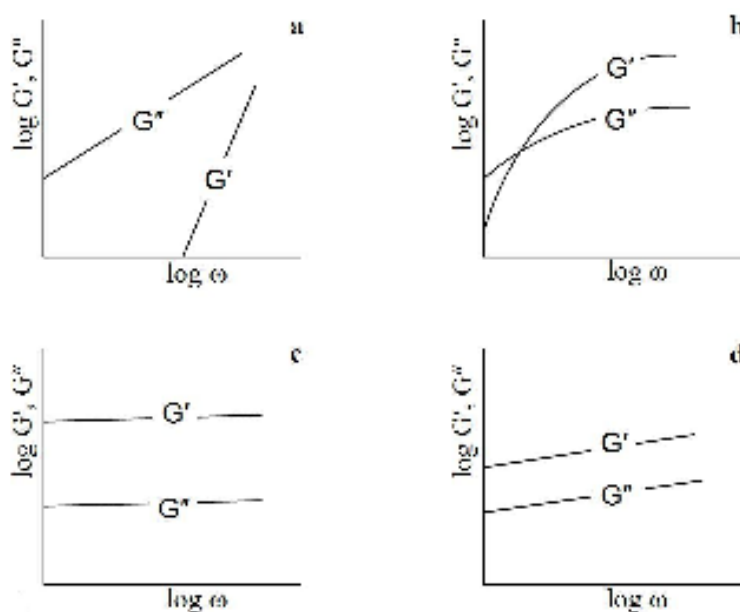


Figura 4 – Espectros mecânicos típicos de quatro sistemas: (a) solução diluída, (b) solução concentrada de macro-moléculas, (c) gel forte e (d) gel fraco (Alves, 2003).

Da observação dos espectros mecânicos podem-se tirar conclusões em relação à organização da estrutura das moléculas dos materiais. Por exemplo, nas soluções de macromoléculas, os módulos (G' e G'') estão fortemente dependentes da frequência, existindo um ponto crítico em que $G' = G''$, enquanto que nos geles, esta dependência não é tão notável, sendo os valores de G' superiores aos valores de G'' em toda a gama

do espectro. Neste caso, as linhas que unem os pontos de cada um dos módulos (G' e G'') são relativamente paralelas (Alves, 2003).

Assim, o comportamento viscoelástico dos queijos está fortemente condicionado pela sua estrutura (Zalazar *et al.*, 2002). Para obter informações sobre a sua estrutura também se podem fazer observações microscópicas da matriz de caseína e, em simultâneo, a determinação dos seus espectros mecânicos. A combinação da informação proporcionada pelos testes dinâmicos com a da microscopia electrónica mostra que, quando uma estrutura se caracteriza por uma rede proteica densa, com muitas ligações e com dimensões dos poros pequena (Figura 5a), observam-se valores superiores de ambos os módulos (G' e G''). Pelo contrário, uma rede proteica menos densa, com menos ligações peptídicas, e com poros de maiores dimensões (Figura 5b) apresenta valores superiores em ambos os módulos (G' e G'') (Hassan *et al.*, 2004).

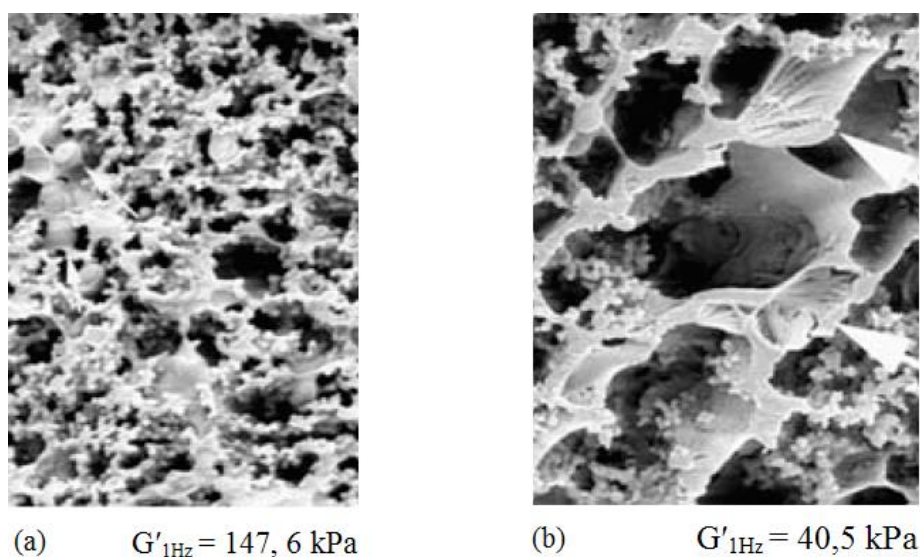


Figura 5 – Imagens de crio-microscopia electrónica de varrimento de queijos Karish: (a) estrutura de caseína densa e (b) estrutura de caseína com poros maiores (Hassan *et al.*, 2004).

A tangente dissipativa cresce com a proteólise, com a diminuição de pH e com o aumento de humidade (Tunick *et al.*, 1995; Karoui e Dufour, 2003). A quantidade de gordura (Madsen e Ardo, 2001), bem como as dimensões dos glóbulos (Karoui e Dufour, 2003), também influenciam as propriedades viscoelásticas de queijos. Para além disso, as propriedades viscoelásticas dependem muito do tipo de queijo, podendo-se encontrar valores de G' da ordem dos 10^4 Pa em queijos brandos, como o queijo Quarg (Kelly e O'Donnell, 1998) e 10^5 Pa para queijos duros, como o Cheddar.

Cor

A cor pode ser avaliada instrumentalmente usando o sistema de coordenadas CIELAB definido pela “Commission Internationale de L’éclairage” – “CIE 1976 L*a*b* Uniform Colour Space” e tem sido um método usado para a determinação instrumental da cor da pasta e da crosta em queijos (Hong *et al.*, 1995; Alvarenga, 2000; Buffa *et al.*, 2001). A coordenada L* traduz a variação da luminosidade claro/escuro, variando entre 0% (escuro) e 100% (claro), a componente a* varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e a componente b* varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo).

Ao longo da cura os valores do parâmetro L* e a* vão diminuindo, enquanto que os valores de b* vão aumentando, o que significa que, com o desenvolvimento da cura, a pasta torna-se um pouco mais escura, mais esverdeada e mais amarela (Buffa *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2004). O desenvolvimento de algumas bactérias, durante a cura, pode ter um papel muito importante na produção de pigmentos que podem ir do amarelado ao vermelho (Dofossé *et al.*, 2005). Por outro lado, os parâmetros cromáticos podem ser influenciados pela composição em gordura, por exemplo, queijos com maior teor de gordura apresentam-se mais amarelos e menos avermelhados do que queijos com menores teores de gordura (Drake *et al.*, 1998).

2.3.1.3 – Propriedades sensoriais

Os queijos obtidos a partir de leite cru apresentam um desenvolvimento de aromas mais intenso e uma textura mais macia, o que pode ser explicado pela intensidade e pela extensão da proteólise ocorrida nestes queijos (Irigoyen *et al.*, 2002; Awad, 2006). Os produtos deste processo, como péptidos e aminoácidos, influenciam consideravelmente as características sensoriais do queijo (Poveda *et al.*, 2004a). Por exemplo, o sabor amargo, observado em certos queijos, pode estar relacionado com a parte C-terminal de alguns péptidos hidrofóbicos, formados a partir da hidrólise da β -caseína (Smit *et al.*, 2000; Madsen e Ardo, 2001; Pripp *et al.*, 2006).

Como vimos anteriormente, a proteólise está dividida em várias etapas, que se iniciam com a hidrólise das caseínas nativas do leite, transformando-as em péptidos de alto peso molecular, os quais, posteriormente, são hidrolisados em péptidos de baixo peso molecular e, por fim, em aminoácidos (ver 2.2.2 – Proteólise). A questão central é saber qual a influência destas etapas no “flavour” do queijo. Em termos gerais, pode referir-se que os péptidos e os aminoácidos contribuem para o desenvolvimento do aroma e do

“flavour” global dos queijos. No entanto, os aminoácidos são os precursores de compostos aromáticos muito importantes, formados durante a maturação (Pripp *et al.*, 2006). Estes compostos formam-se a partir de alterações catabólicas e das reacções ocorridas entre aminoácidos livres e outros compostos (Marilley e Casey, 2004).

Alguns aminoácidos livres, como por exemplo ácido glutâmico, leucina e metionina, entre outros, são precursores dos aromas do queijo curado (Raksakulthai *et al.*, 2002), ou seja, o seu metabolismo está envolvido na produção de compostos como por exemplo aminas, ácidos carboxílicos, tióis, ésteres, álcoois, aldeídos e tioésteres (Salles *et al.*, 2000). Existem enzimas envolvidas na conversão dos aminoácidos e, da sua actividade, resulta a produção de vários componentes voláteis do “flavour”. Nestas conversões, destaca-se a decomposição de metionina e outros aminoácidos, com a concomitante produção de aromas. No entanto, os produtos destas degradações ainda não estão bem estabelecidos (Smit *et al.*, 2000).

A capacidade dos microrganismos do queijo de transformar os aminoácidos em compostos aromáticos é altamente dependente das estirpes (Yvon e Rijnen, 2001) bem como das condições do meio, como o pH (Smit *et al.*, 2000), e pode justificar as diferenças no impacto das culturas de arranque no “flavour” de queijo curado.

As diferenças no desenvolvimento dos aromas também podem ter origem na razão entre endoproteínases e exopeptidases. A excessiva actividade das endoproteínases, em relação às exopeptidases, pode causar sabor amargo, devido à excessiva produção de péptidos hidrofóbicos resultantes da degradação da β -caseína. Por outro lado, as exopeptidases produzem aminoácidos livres que podem ser responsáveis pelo aparecimento de aroma amargo, como a arginina, e aroma adocicado, como prolina, a serina e a asparagina (Izco e Torre, 2000; Macedo *et al.*, 2004).

O tipo de queijo também pode ter influência no desenvolvimento do perfil sensorial ao longo da cura. Em queijos coagulados pela acção do coalho de origem animal, observa-se menor intensidade dos aromas, do sabor ácido e da luminosidade da cor, além de serem mais firmes e menos cremosos quando comparados com queijos coagulados a partir de extractos vegetais (Tejada *et al.*, 2007). Por outro lado, em queijos obtidos a partir de leite cru, o desenvolvimento do “flavour” é mais rápido e completo do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado. A rápida fermentação da lactose, garantida pelas bactérias nativas, permite maior eficácia na expulsão do soro, influenciando o

“flavour” e a textura final dos queijos (Mendia *et al.*, 1999; Awad, 2006). Quando isto é associado ao uso de extractos de enzimas vegetais como agente coagulante, obtêm-se queijos com características sensoriais ímpares, podendo-se destacar o surgimento dum “flavour” ligeiramente picante e cremoso (Tejada *et al.*, 2000).

A lipólise também influencia o desenvolvimento dos aromas do queijo. Em termos gerais, julga-se que esta maior intensidade de aromas poderá estar relacionada com a maior quantidade de ácidos gordos voláteis presentes, ou mesmo com as elevadas concentrações destes (Horne *et al.*, 2005). Os ácidos gordos livres têm sido citados como bastante influentes no desenvolvimento do “flavour” do queijo (Omar, 1984) e também podem ser metabolizados posteriormente em compostos aromáticos (Pripp *et al.*, 2006). Para além da origem peptídica ou aminoacídica, o sabor amargo também pode estar relacionado com a presença de ácido butírico, cáprico e capróico (Omar, 1984).

A maior parte dos compostos voláteis do “flavour” são formados durante a cura e têm origem na conversão da proteína, gordura e lactose a partir dos processos de proteólise, lipólise e glicólise. Utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS) (Smit *et al.*, 2000), é possível perceber a evolução da formação destes compostos ao longo do tempo de maturação (Figura 6).

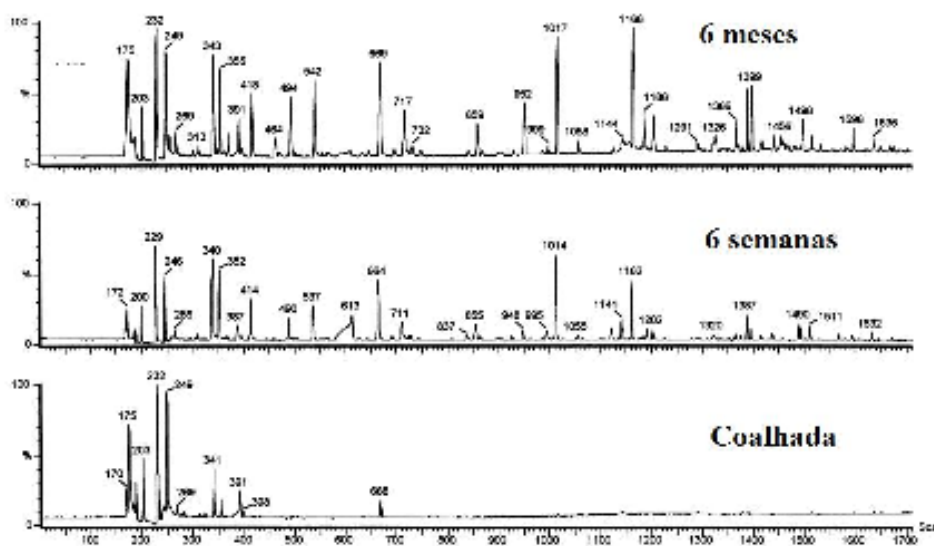


Figura 6 – Análise dos compostos voláteis do “flavour” durante a cura do queijo Gouda por GC-MS (Schmidt, 1982).

O metabolismo de formação dos compostos voláteis durante a cura envolve 3 fases distintas: (1) na primeira, verifica-se a transformação dos componentes de maior dimensão em componentes de menor dimensão, através da proteólise, lipólise e glicólise; (2) seguidamente, processa-se a peptidólise com a formação de aminoácidos; (3) por fim, a partir da interação dos compostos resultantes destes processos, como ácido láctico, ácidos gordos, diacetil, ácido propiónico e aminoácidos, com intervenção das enzimas provenientes de bactérias lácticas não de arranque, produzem-se os compostos mais importantes do “flavour” (Smit *et al.*, 2000). Estes compostos, mesmo em quantidades muito pequenas, têm a capacidade de influenciar o “flavour” (Kubícková e Grosch, 1998).

2.3.2 – Queijos de ovelha e segurança alimentar

Como já foi referido, os países mediterrâneos – Portugal em particular – caracterizam-se pela existência de vários tipos de queijos artesanais produzidos a partir de leite de ovelha cru, que representam um papel muito importante na actividade rural e na economia local. A popularidade destes queijos tem aumentado nos últimos anos, principalmente o Serra da Estrela, Serpa, Azeitão e Castelo Branco, devido às características de textura e “flavour” únicas (Freitas *et al.*, 2000), tendo-se assistido em Portugal (Roseiro *et al.*, 2003a; Roseiro *et al.*, 2003c) e noutros países (Zhang *et al.*, 2006) ao aumento da procura por parte do consumidor e uma intensificação na sua produção.

Estes queijos apresentam uma pasta macia, fácil de barrar, resultado duma proteólise muito intensa. A tecnologia de produção destes queijos está descrita nos regulamentos legais em vigor (DR, 1985, 1986, 1987, 1988; Tavarina *et al.*, 2006) e, recentemente, têm surgido alguns estudos no sentido de fixar a tecnologia artesanal e compará-la com uma tecnologia ligeiramente mecanizada, onde se podem destacar trabalhos elaborados no âmbito da tecnologia do queijo Serpa (Canada, 2001; Roseiro *et al.*, 2003c) e do queijo Serra da Estrela (Reis e Malcata, 2007).

O leite cru pode conter agentes patogénicos e, por isso, os produtos industriais obtidos à base de leite tratado termicamente, têm a pasteurização como ponto crítico de controlo. No entanto, em queijos obtidos a partir de leite cru, não se pode estabelecer esta etapa importante a nível de segurança alimentar. No entanto, existem mecanismos naturais que permitem promover a segurança dos produtos finais. A fermentação da lactose

promove a redução de compostos tóxicos como aflotoxinas e produz factores antimicrobianos como o ácido láctico, o dióxido de carbono, o peróxido de hidrogénio, o etanol (Giraffa, 2004), o diacetil (Veljovic *et al.*, 2007) e bactericidas (Nuñez *et al.*, 1997), que facilitam a inibição, ou eliminação, dos microrganismos patogénicos.

A produção de ácido láctico, durante este período, reduz o pH, promove a expulsão do soro da coalhada, inibe o crescimento de bactérias patogénicas e garante o domínio das bactérias lácticas (Canada, 2001). Este é o principal método de controlo ao alcance dos produtores de queijo para diminuir o risco de doença (Zottola e Smith, 1991; Meyrand *et al.*, 1998). Como o processo de fermentação não é instantâneo, por motivos de segurança alimentar há necessidade destes queijos terem um período mínimo de cura, durante o qual se observa a produção destes compostos, podendo-se considerar que se trata de um período de segurança. Na maior parte dos queijos Portugueses obtidos a partir de leite cru, esse período é de 30 dias e o tempo de cura é entendido como um ponto crítico de controlo.

A necessidade de haver um período mínimo de cura tem estimulado o aparecimento de estudos onde se faz a estimativa do tempo de cura (idade dos queijos) a partir das propriedades do queijo, utilizando métodos estatísticos como o método de regressão linear múltipla (RLM), e nesta matéria podem-se destacar os estudos de queijos Portugueses (Pinho *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006) e Espanhóis (Poveda *et al.*, 2004b). Estes autores utilizaram diferentes abordagens na selecção de parâmetros usados na regressão linear múltipla. Quando foram usados parâmetros químicos, como a quantificação das fracções proteicas, obtiveram-se erros estimados bastante satisfatórios (2,5 dias), sendo a regressão obtida: idade do queijo = $13,6 + 10,7\alpha_{S1-I} \text{ péptido} - 11,8\alpha_{S1} \text{-caseína}$ (Ferreira *et al.*, 2006). Quando se usaram parâmetros físicos, como a determinação instrumental da textura e da cor, do interior (int) e do exterior (ext), obteve-se um modelo com erro estimado um pouco superior (4,2 dias): idade do queijo = $257,8 - 1,16L^*_{\text{ext}} - 1,66L^*_{\text{int}} + 3,38b^*_{\text{int}} + 0,0107\text{dureza} + 9,75a^*_{\text{int}} - 0,0192\text{coesividade}$ (Pinho *et al.*, 2004). No entanto, quando se usaram apenas parâmetros físico-químicos como a humidade, o a_w e o pH, o erro estimado foi ainda superior (11,9 dias) (Poveda *et al.*, 2004b).

2.4 – Congelação

2.4.1 – Ciclo congelação/descongelação

A maior parte dos produtos alimentares de origem animal são submetidos, nalguma fase da fileira, a processos de conservação por acção do frio, como a refrigeração e/ou a congelação. A refrigeração caracteriza-se por manter a temperatura um pouco acima da temperatura de congelação do produto, enquanto que na congelação os alimentos são conservados a temperaturas inferiores à temperatura de congelação, sendo frequentemente usada a temperatura $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em termos de tempo de conservação estes processos têm duas diferenças fundamentais: enquanto que submetido à refrigeração, um alimento só pode durar alguns dias, ou semanas (dependendo do produto), quando submetido à congelação pode durar alguns meses, ou anos.

A designação genérica “congelação” tem implícitos três processos: (1) a congelação propriamente dita, (2) o armazenamento no estado congelado, e (3) o processo de descongelação e é ao conjunto destes processos que se designa por ciclo congelação/descongelação.

A congelação propriamente dita é o abaixamento da temperatura até à temperatura de conservação, envolvendo três etapas: a primeira consiste no arrefecimento do produto até ao ponto de congelação, em que há libertação de calor sensível, a segunda consiste na eliminação do calor latente de fusão e a terceira consiste na eliminação do calor sensível desde o ponto de congelação até à temperatura de conservação. A condutividade térmica do alimento, antes de congelado, é inferior à do alimento congelado e, por isso, à medida que o alimento vai congelando da superfície para o interior, a eficiência do processo vai aumentando. Assim, para o processo ser mais rápido, antes de se iniciar a congelação, todo o volume deve estar à temperatura constante, preferencialmente a uma temperatura um pouco acima do ponto de congelação (Fellows, 1994).

Velocidades de congelação lentas originam cristais maiores, uma vez que há tempo para os processos de agregação e, neste caso, as dimensões elevadas destes podem conduzir à ruptura da estrutura (Widgery, 1990). Se a congelação for rápida, a pequena dimensão dos cristais formados promove uma distribuição uniforme pelo alimento, havendo menor possibilidade de contactarem e crescerem (Fennema, 1989).

O armazenamento, no estado congelado, permite conservar um alimento por um período mais ou menos longo, que depende da temperatura de armazenamento e do tipo de produto. Para a mesma matriz, quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento maior a imobilidade molecular (ver 2.4.2 – Estado de vítreo e congelação) e as reacções enzimáticas processam-se em menor extensão. No entanto, temperaturas de armazenamento mais elevadas permitem maior efeito inibidor sobre os microrganismos do que temperaturas mais baixas (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1999). Durante o período de armazenamento, dependendo das condições deste, principalmente da existência de flutuações de temperatura, os cristais de gelo estão sujeitos a processos de recristalização, que são alterações físicas na sua forma, tamanho e orientação (Ranken, 1993). As recristalizações podem ser: (1) isomássicas, quando se observa uma transformação da estrutura interna dos cristais com redução da relação superfície/volume; (2) agregações, em que se verifica a fusão de cristais e a formação de outros de maior dimensão e; (3) migrações, em que se verifica um incremento nas dimensões dos cristais maiores a partir do contacto com os mais pequenos (Fellows, 1994). A velocidade de congelação tem influência nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do alimento.

A descongelação envolve a subida de temperatura para temperaturas superiores ao ponto de congelação. Durante este processo, a temperatura da superfície é superior à temperatura do interior, dando origem à formação de uma película superficial de produto descongelado cuja condutividade térmica é inferior à do produto congelado no interior. À medida que o processo de descongelação vai avançando a espessura desta película vai aumentando e a taxa de transferência de calor vai reduzindo, o que faz com que a descongelação se torne num processo mais lento do que a congelação. A descongelação deve ser lenta para evitar alterações na textura (Fellows, 1994).

Quanto à embalagem usada, deve ser resistente a baixas temperaturas e proteger o alimento durante a congelação, armazenamento e distribuição. Para além das especificidades de cada produto, a embalagem a usar no armazenamento por congelação deve ser impermeável, para impedir a desidratação e evitar as perdas de peso e de qualidade (Ranken, 1993; Bucci *et al.*, 2005).

2.4.2 – Estado de vítreo e congelação

A água desempenha um papel fundamental em todos os sistemas biológicos e as moléculas de água encontram-se nestes sistemas em duas condições diferentes: água livre e água ligada às estruturas (Sousa, 2001). Admitindo que parte da água ligada às estruturas apresenta ligações fracas, esta está disponível para os processos biológicos. Partindo do princípio que a facilidade de utilização da água ligada nos metabolismos celulares, ou enzimáticos, seja igual à capacidade de remoção do ar, quando se encontra abaixo do seu ponto de saturação, pode-se quantificar a disponibilidade de água numa matriz a partir da determinação do seu a_w , uma vez que o a_w representa a humidade relativa do ar que está em equilíbrio com a matriz (Oliveira *et al.*, 1999).

Ao longo de muitas décadas, este conceito foi suficiente para descrever a estabilidade de alimentos uma vez que explica, de uma forma bastante aceitável, a velocidade de crescimento de microrganismos, a actividade enzimática e a velocidade de reacções degradativas. No entanto, diferenças no crescimento de microrganismos em situações semelhantes, com o mesmo pH e a_w , levou a que, na década de 90 do século passado, tenha sido proposta uma explicação para estes mecanismos, com base no conceito de mobilidade das moléculas de água na matriz, em que se usa o conceito de transição para o estado vítreo, transposto da área da ciência dos materiais (Slade e Levine, 1991; Chirife e Buera, 1995; Slade e Levine, 1995).

A organização estrutural dos alimentos sólidos pode ser amorfa ou cristalina. A estrutura cristalina é altamente organizada, com um grau de estruturação elevado, baixa entropia e onde as ligações existentes envolvem apenas a molécula pura da substância que a constitui. A estrutura amorfa tem um grau de organização baixo, elevada entropia, sendo a entropia dependente da temperatura. Para além das moléculas da matriz principal, encontram-se na sua estrutura, moléculas de outras substâncias, que até podem funcionar como ligantes das moléculas da matriz principal (Oliveira *et al.*, 1999).

A formação destas estruturas sólidas num processo de congelação depende da velocidade de arrefecimento do alimento: se o arrefecimento for lento, há tempo para as moléculas se ordenarem e formarem uma estrutura cristalina. No entanto, se o arrefecimento for rápido, a imobilização rápida das moléculas impede que estas se organizem, forçando a formação de uma estrutura amorfa. Uma vez que a estrutura

amorfa é mais instável que a estrutura cristalina (tem uma entropia superior), o sistema amorfo tenderá a cristalizar e a mobilidade da molécula de água tem um papel decisivo no auxílio a esta cristalização. Se continuarmos a arrefecer uma estrutura amorfa, a entropia (e a energia interna) vai baixando progressivamente. Caso isto acontecesse em contínuo e sem mudança, chegaríamos a um ponto, sem significado físico, em que a entropia da estrutura amorfa seria inferior à entropia da estrutura cristalina correspondente. Assim, deduz-se que deve haver um limite físico para o decréscimo de entropia, abaixo do qual se dá uma mudança de fase, do estado que se designa de borracha para o estado “vítreo”, que corresponde a uma estrutura amorfa com um nível de entropia superior ao da estrutura cristalina, mas inferior ao do estado de borracha. Esta transição, de segunda ordem, é conhecida como transição de estado vítreo e o ponto intermédio de temperatura da transição é conhecido por temperatura de transição vítrea (T_g) (Goff e Sahagian, 1996; Oliveira *et al.*, 1999). Alimentos conservados nestas condições apresentam uma mobilidade molecular quase nula, e a sua percibibilidade é bastante reduzida, mas não nula (Slade e Levine, 1995; Champion *et al.*, 2000).

A composição química da estrutura influencia os valores de T_g . Por exemplo a água e moléculas pequenas, como o glicerol (Oliveira *et al.*, 1999), provocam um aumento na mobilidade molecular, implicando uma diminuição do T_g e, por esse motivo, são conhecidas como moléculas plastificantes. Por outro lado, a T_g aumenta com a adição de macromoléculas, como polissacáridos (Goff e Sahagian, 1996; Rogers *et al.*, 2006), que promovem o aumento do peso molecular médio da estrutura. A maioria dos alimentos contém uma quantidade de água elevada e têm a T_g muito abaixo do ponto de congelação. Ao baixar a temperatura de um alimento, primeiro cristaliza a água e só depois se atinge a T_g . A formação de cristais de gelo tem um efeito muito importante na T_g da matriz, uma vez que os minerais dissolvidos na água vão concentrando à medida que as moléculas de água vão cristalizando (Goff e Sahagian, 1996). Este mecanismo, conhecido como crio-concentração, evolui ao longo do processo de congelação provocando uma diminuição do ponto de congelação e um aumento da T_g , havendo um ponto em que a temperatura de congelação iguala a T_g da matriz (Oliveira *et al.*, 1999).

A maioria dos alimentos tem valores de T_g inferiores às temperaturas normais dos sistemas de frio industrial (cerca de $-18\text{ }^\circ\text{C}$), significando que, em alimentos congelados, podem ocorrer vários fenómenos que deterioram a qualidade do produto. Podem-se destacar: (1) recristalizações de cristais de gelo, cristalização de açúcares e coalescência

da fase orgânica – com implicações na textura; (2) transformação de lípidos para formas mais estáveis, oxidações enzimáticas e não enzimáticas – com implicações sensoriais e nutricionais e (3) crescimento microbiano reduzido mas não nulo. A qualidade dos alimentos obtidos a partir de um processo de congelação rápida pode ser perdida durante o armazenamento, em maior ou menor extensão, dependendo da mobilidade da matriz e, portanto, da velocidade a que decorrem os processos deteriorativos. Em geral, a mobilidade é tanto maior quanto maior for a diferença entre T_g e a temperatura de armazenamento e, nas práticas modernas, pretende-se que um produto tenha valores de T_g tão altos quanto possível, para que apresente estabilidade óptima (Oliveira *et al.*, 1999).

2.4.3 – Congelação de queijo

A produção de leite de pequenos ruminantes é sazonal (Alonso *et al.*, 1987; Fontecha *et al.*, 1993; Voutsinas *et al.*, 1995a; Tejada *et al.*, 2000), podendo-se referir os meses de Inverno e Primavera, como meses em que há abundância de matéria-prima e no Verão e Outono, há escassez. A dessincronização entre a oferta e a procura tem sido apontado como o principal motivo para congelar queijos (Park e Drake, 2005; Park e Lee, 2006). Para além disso, apontam-se outras vantagens associadas à congelação, como evitar cuidados exigentes de manutenção e lavagem dos queijos, durante os circuitos de comercialização de queijos de pasta mole e a diminuição de contagens de algumas bactérias, fungos e leveduras, com repercussões ao nível de segurança alimentar (Park *et al.*, 2004).

Para além da congelação, têm sido usadas outras abordagens mitigadoras da sazonalidade, como a utilização de leite em pó, congelação de leite, congelação de coalhadas e sincronização de partos. A utilização de leite em pó tem sido apontada como estando associada a alguns defeitos de “flavour” nos queijos (FIL/IDF, 1982), pelo que alguns autores têm sugerido, em alternativa, a congelação do leite (ultrafiltrado ou não) (Muir, 1984; Voutsinas *et al.*, 1995a, b; Zhang *et al.*, 2006). No entanto, para além de elevados custos energéticos, o armazenamento de leite congelado não oferece resultados satisfatórios, causando alterações significativas na coagulação (Fuente *et al.*, 1997) e na estrutura final do queijo (Muir, 1984). A congelação de coalhadas, durante os períodos de alta produção de leite, subsequente descongelação e cura nos períodos de baixa produção de leite, é um possível caminho (Alonso *et al.*, 1987). No entanto,

alguns autores apontaram alterações na textura como um problema associado a este procedimento (Alichanidis *et al.*, 1981; Pelaez, 1983; Fontecha *et al.*, 1993).

No âmbito desta controvérsia, foi estabelecido há já algum tempo que os resultados dos estudos de congelação dependem dos parâmetros usados para avaliar os danos causados por este processo (Fennema, 1972). Para além das vantagens a nível de minimização dos danos, efectuar a congelação do queijo curado permite uma maior facilidade em programar o tempo de expedição dos queijos (Tejada *et al.*, 2000), originando evidentes poupanças de recursos físicos, humanos e energéticos. Queijos com valores de humidade médios ou baixos têm elevada longevidade quando conservados à temperatura de refrigeração. No entanto, queijos com elevados teores de humidade, como Cottage, Bakers, Cream, Quarg, Neufchatel, Camembert, Ricotta e Mozzarella têm tempos de vida curtos à temperatura de refrigeração e cedo foram encarados como potenciais candidatos à congelação (Fennema, 1972). A congelação de queijos tem sido alvo de estudos desde o início do século XX. No entanto, esses trabalhos encontram-se dispersos, são em pequeno número e dedicados a um grupo muito restrito de queijos (Fennema, 1972). Este facto, combinado com o desenvolvimento de novas técnicas de congelação e de análise, levou a intensificar os trabalhos de investigação nesta área nos últimos 15 anos, conforme se pode observar em alguns exemplos de estudos publicados, que constam na Tabela 1.

Em quase todos os estudos de congelação encontrados, a temperatura de -20 °C surge como a temperatura (ou uma das) a ensaiar (Ramos *et al.*, 1987; Bertola *et al.*, 1996b; Califano e Bevilacqua, 1999; Tejada *et al.*, 2002; Graiver *et al.*, 2004; Park e Drake, 2005; Van-Hekken *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Park e Lee, 2006; Prados *et al.*, 2006; Ribero *et al.*, 2007a). São apontados diferentes motivos, no entanto dois são fundamentais: o primeiro é ser esta a temperatura normalmente praticada nos sistemas comerciais e industriais, pelo que a sua utilização na conservação do queijo não envolve grandes adaptações a nível de processos e equipamentos e, o segundo motivo, é a proximidade desta temperatura com a temperatura de transição vítrea de queijos macios (Oliveira *et al.*, 1999).

A escassez de trabalhos sobre a congelação é mais evidente relativamente a queijos de ovelha artesanais. Por exemplo, à data deste estudo, não foram encontradas publicações em revistas internacionais sobre congelação de queijos de ovelha de pasta mole amanteigada. Por outro lado, como veremos adiante, muitos dos estudos apontam para

resultados contraditórios, o que se explica pelas diferenças substanciais na matriz dos diferentes tipos de queijos (Verdini *et al.*, 2005), como por exemplo quando são obtidos a partir de leite de diferentes espécies (Van-Hekken *et al.*, 2005). No entanto, é importante resumir o que de mais relevante se concluiu nestes trabalhos, em termos da monitorização das propriedades químicas, físicas e sensoriais de queijos congelados.

Tabela 1 – Estudos de congelação divulgados em publicações científicas.

Tipo de queijo	País	Tipo de leite O ovelha; C cabra; V vaca	Pasteurização + leite pasteurizado; – leite cru	Pasta D dura/semi-dura; M mole/semi-mole	Propriedades estudadas AG ácidos gordos; AS avaliação sensorial; LIP lipólise; PRO proteólise; RE reologia; FV fracção volátil; AM análise microbiológica; ME microscopia electrónica.	Referências bibliográficas
Monterey Jack e outros queijos de cabra	USA	C	+	M	PRO + LIP + AS + AG + RE	(Park <i>et al.</i> , 2004; Park e Drake, 2005; Van-Hekken <i>et al.</i> , 2005; Park <i>et al.</i> , 2006; Park e Lee, 2006)
Queijo de ovelha	Es	O	+	D	PRO	(Fontecha <i>et al.</i> , 1993)
Los Pedroches	Es	O	–	D	AS + MI + PRO	(Tejada <i>et al.</i> , 2000; Tejada <i>et al.</i> , 2002)
Manchego	Es	O	–	D	PRO + AS + AM + RE	(Canet <i>et al.</i> , 1995; Prados <i>et al.</i> , 2006)
Mozzarella	Arg	V	+	D	PRO + RE + ME + AG	(Diefes <i>et al.</i> , 1993; Bertola <i>et al.</i> , 1996b; Bertola <i>et al.</i> , 1996a; Califano e Bevilacqua, 1999; Graiver <i>et al.</i> , 2004; Ribero <i>et al.</i> , 2007a; Ribero <i>et al.</i> , 2007b)
Port Salut Argentino	Arg	V	+	M	RE + PRO	(Verdini e Rubiolo, 2002a; Verdini e Rubiolo, 2002b; Verdini <i>et al.</i> , 2003; Verdini <i>et al.</i> , 2005; Verdini <i>et al.</i> , 2007)

A congelação não afecta a composição do queijo no que se refere aos seus componentes maiores (Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005). No entanto, a maior parte das enzimas demonstram ter actividade proteolítica mesmo depois de congeladas, pelo que os mecanismos da cura, principalmente proteólise e lipólise, são afectados pela

congelamento. Em termos gerais, pode referir-se que a congelamento tem pouco impacto na composioão de ácidos gordos (Califano e Bevilacqua, 1999), no nível de lipólise e no pH (Park e Drake, 2005; Park e Lee, 2006).

As fracções azotadas são mais ou menos atingidas pela congelamento, dependendo do tipo de queijo, verificando-se uma tendência para uma subida nestas fracções ao longo do tempo de congelamento, principalmente naquelas que representam a profundidade da proteólise (azoto não proteico e azoto aminoacídico). Este acontecimento pode estar relacionado com o facto das proteases microbianas continuarem activas, mesmo a baixas temperaturas (Bertola *et al.*, 1996b; Tejada *et al.*, 2000; Graiver *et al.*, 2004), e também é possível ser observado através da hidrólise das α_S -caseínas, pela acção das enzimas provenientes do agente coagulante e da lise de microrganismos (Verdini *et al.*, 2003). Também se pensa que a congelamento provoca mudanças conformacionais na α_{S1} -caseína, afectando a sua estabilidade e vulnerabilidade a ataques enzimáticos, obtendo-se péptidos mais expostos ao ataque das enzimas microbianas que libertam maior quantidade de aminoácidos livres (Verdini *et al.*, 2005). Contudo, não existe consenso em relação a este tema, havendo autores que defendem que o processo de proteólise, em queijos congelados, é muito lento (Ramos *et al.*, 1987; Prados *et al.*, 2006) ou nulo (Van-Hekken *et al.*, 2005). Como estes estudos se fizeram em matrizes diferentes, pode-se deduzir que existe alguma relação entre o tipo de queijo estudado (espécie leiteira, tratamento térmico etc.) e a actividade proteolítica durante a congelamento, devendo haver algum cuidado na transposiçoão de resultados de umas matrizes para outras.

A nível estrutural, como já foi referido anteriormente, a matriz proteica pode ser danificada durante o processo de congelamento, principalmente se o processo for lento (Fontecha *et al.*, 1993; Graiver *et al.*, 2004) e quando se observam flutuações de temperatura (Gormley *et al.*, 2002). Não há, porém, unanimidade em relação ao impacto deste processo nas propriedades reológicas. Existem autores que defendem que as alteraçoões ocorridas durante a congelamento de queijos têm pouco efeito nos parâmetros reológicos (Verdini *et al.*, 2003; Van-Hekken *et al.*, 2005; Ribero *et al.*, 2007a), outros defendem que se observa um amolecimento da estrutura de queijos submetidos à congelamento, devido à lise microbiana e à concomitante libertaçoão de enzimas proteolíticas (Graiver *et al.*, 2004). No entanto, noutros estudos é relatado um endurecimento de queijos congelados, explicado pela desidrataçoão das proteínas,

causando alterações na rede proteica, permitindo aos pequenos glóbulos de gordura contactarem uns com os outros e formarem grânulos. As proteínas vão-se tornando mais compactas, ou interagem para formarem pontes de enxofre que rodeiam os novos grânulos de gordura. Estes processos são, de certo modo, irreversíveis porque, durante o armazenamento por congelação, o aumento das dimensões dos cristais de gelo, devido às recristalizações, dificulta a recolocação da água na interface proteína-gordura, diminuindo o efeito lubrificante, reflectindo-se numa estrutura mais elástica após a descongelação (Diefes *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 1996b). Estas diferenças de resultados podem ser justificadas por vários factores, como o tipo de queijo, as condições do ensaio, o tempo de armazenamento, o processo de congelação, entre outros.

Quanto à influência da congelação nos atributos sensoriais, encontram-se poucos estudos e, em termos gerais, não se relatam perdas significativas nos atributos positivos. Contudo, passadas algumas semanas após descongelação, observam-se algumas alterações importantes no perfil sensorial, como perdas no “flavour” característico (Park e Drake, 2005). No entanto, é ao nível dos atributos de textura, percebida sensorialmente, que os queijos congelados podem perder qualidade apresentando-se mais granulados (Tejada *et al.*, 2000) e menos cremosos (Prados *et al.*, 2006), principalmente se a velocidade de congelação for lenta.

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIAS

3.1 – Obtenção das amostras de queijos

O trabalho prático foi organizado em três ensaios e as amostras foram obtidas em duas queijarias, detentoras de Denominação de Origem Protegida (DOP). No primeiro ensaio recolheram-se amostras na Queijaria Ovelheira (Concelho de Mértola) e na Queijaria Moinho de Almocreva (Concelho de Beja). Nos ensaios seguintes as amostras foram recolhidas na queijaria Moinho de Almocreva. Em semana de ensaio, as amostras eram transportadas para o laboratório à segunda-feira de manhã e eram colocadas numa sala climatizada a 20 °C, onde ficavam a estabilizar até ao dia seguinte, para garantir que as medições do pH e da textura se faziam a 20 °C.

Aproximadamente 24 horas após a recolha, foi efectuada a determinação da cor da crosta (apenas no ensaio 3) e, seguidamente, os queijos foram abertos de forma a remover uma camada superficial com 1 cm de espessura (Alvarenga, 2000; Pinho *et al.*, 2004), no sentido de se alcançar uma superfície exposta do interior do queijo (pasta). Após 5 minutos de espera, para assegurar a estabilização da cor da pasta, foram efectuadas as seguintes operações, respeitando a ordem indicada: (1) determinação da cor, (2) análise de perfil de textura, (3) determinação do pH, (4) conservação de uma sub-amostra (aproximadamente 150 g) em placa de Petri, a 4 °C, para a caracterização viscoelástica e (5) conservação da restante amostra, a 4 °C, para caracterização química e sensorial. A caracterização viscoelástica e sensorial, foi sempre efectuada nas 24 h seguintes ao início da manipulação da amostra.

3.2 – Metodologias usadas na caracterização das amostras

O trabalho experimental foi realizado em dois locais: (1) no Laboratório de Física e Reologia Alimentar do Instituto Superior de Agronomia – caracterização viscoelástica das amostras e (2) nos Laboratórios de Lacticínios, Reologia Alimentar e Análise Sensorial da Área Departamental de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja – propriedades físico-químicas, textura, cor e análise sensorial.

O número de réplicas laboratoriais a utilizar por amostra dependeu do parâmetro e foi estabelecido com base em estudos preliminares de erro, no sentido de se tentar trabalhar com um nível de confiança na ordem dos 95%.

3.2.1 – Avaliação química

Os reagentes químicos usados neste trabalho foram das seguintes marcas comerciais: Merck, Panreac, Riedel, Sigma, Fluka e José Manuel Gomes dos Santos, todos com uma pureza mínima do tipo pró-análise (p.a.), de acordo com as normas ACS (American Chemical Society) ou ISO (International Standard Organization). Para todos os parâmetros químicos foram analisadas três réplicas por amostra. De uma forma sumária, descrevem-se os princípios dos métodos.

pH

A determinação do pH foi efectuada directamente na pasta do queijo, sem diluições, à temperatura de 20 ± 1 °C. Para isso utilizou-se um potenciómetro, marca Metrohm e modelo 691, munido de um eléctrodo de penetração (Metrohm, Switzerland). Precisão do método: $\pm 0,01$ (escala Sorensen).

Humidade (H)

Na determinação da humidade usou-se o método gravimétrico (AOAC, 1990b), sendo a diferença de massas da amostra determinada após secagem em estufa a 101 ± 1 °C, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método: $\pm 0,01$ % (m/m).

Gordura (G)

O teor em gordura foi determinado segundo o método de Van Gulik (ISO 3432, 1975; NP 2105, 1983), que consiste na separação da fase gorda da amostra por centrifugação (1000-1200 rpm), num butirómetro Van Gulik, após dissolução das proteínas do queijo pelo ácido sulfúrico e com a separação da gordura facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool isoamílico. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método: $\pm 0,1$ % (m/m).

Acidez total (A)

A acidez total determinou-se por titulação com solução alcalina de hidróxido de sódio 0,1 N, após extracção dos componentes solúveis em água a 40 °C (AOAC, 1990a). Os resultados foram expressos em cm³ de solução alcalina normal (1 N) necessários à neutralização dos ácidos existentes em 100 g de queijo. Precisão do método: $\pm 0,01$ cm³ NaOH N/100g.

Azoto total (NT)

O azoto total determinou-se pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990c). Foi utilizado um digestor marca Tecator 2015 e um destilador Tecator Kjeltex 1030 Auto Analyser (Tecator, Höganäs, Sweden). Na determinação deste parâmetro, a amostra sofre uma mineralização em meio ácido, a quente, na presença de uma mistura catalisadora metálica (sulfato de potássio e sulfato de cobre). A digestão leva à conversão de todo o azoto orgânico em ião amónio, que é posteriormente convertido em amoníaco, por adição de hidróxido de sódio, destilado em corrente de vapor e recolhido numa solução de ácido bórico onde é doseado, por titulação, com ácido clorídrico de título conhecido. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m). Precisão do método: $\pm 0,01\%$ (m/m).

Azoto solúvel em água (NSA)

O azoto solúvel em água foi quantificado a partir de uma extracção aquosa dos componentes-azotados (Kuchroo e Fox, 1982), utilizando água aquecida a ± 40 °C, de modo a obter uma emulsão homogénea, com volume rigorosamente conhecido. Esta mistura permanece em repouso (conservada em formalina) durante 12 horas, para extracção dos componentes solúveis. Filtra-se e determina-se o teor em azoto numa alíquota, pelo método de Kjeldahl. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m) e em percentagem relativamente ao azoto total (NSA%). Precisão do método: $\pm 0,01\%$ (m/m).

Azoto não proteico (NNP)

O azoto não proteico foi determinado após precipitação dos componentes-azotados com ácido tricloroacético a 12%, filtração através de papel de filtro Whatman N.º 42 e determinação do azoto no filtrado pelo método Kjeldahl (Freitas *et al.*, 1997). Os

resultados foram expressos em percentagem (m/m) e em percentagem em relação ao azoto total (NNP%). Precisão do método: $\pm 0,01\%$ (m/m).

Azoto aminoacídico (NA)

Para a determinação do azoto aminoacídico usou-se a reacção colorimétrica da ninidrina, que determina a presença de grupos de aminoácidos livres, por espectrofotometria de absorção molecular, a um comprimento de onda de 570 nm (Moore, 1968; Pearce *et al.*, 1988; Jovita, 1991). O espectrofotómetro utilizado foi o Shimadzu UV-160A. Os resultados são expressos em mg Leu/g queijo e em percentagem relativamente ao azoto total (NA%). $\pm 0,0001$ (mg Leu/g queijo).

3.2.2 – Avaliação física

Na caracterização física das amostras foram considerados os parâmetros viscoelásticos, a análise de perfil de textura, bem como os parâmetros de cor.

Análise de perfil de textura (TPA)

Na análise de perfil de textura usou-se o texturómetro “Texture Analyser Model TAHDi®” (Stable Micro Systems, Godalming, UK), com uma célula de carga de 25 kg “Interchangeable Low Force Load Cells Model LC/25”. O teste foi realizado em penetração na pasta, com uma sonda cilíndrica de alumínio de 20 mm de diâmetro, à temperatura de 20 ± 1 °C. As condições de teste programadas foram velocidade de teste 1,00 mm/s, tempo de repouso entre o primeiro e o segundo ciclo 5 s, profundidade de penetração da sonda 20 mm. Foram assim obtidos os gráficos força vs tempo (3 réplicas por amostra), onde se calcularam os parâmetros dureza (N), adesividade (-N.mm) e coesividade (adimensional) (Alvarenga, 2000; Alvarenga e Sousa, 2001; Sousa, 2001; Alvarenga *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2004; Van-Hekken *et al.*, 2005).

Parâmetros viscoelásticos (SAOS)

As medições reológicas dinâmicas foram realizadas a $20 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, num reómetro de tensão controlada, modelo Rheometer RS-75 (Haake, Germany), com a geometria de pratos paralelos com 20 mm de diâmetro, serrados para prevenir a derrapagem da amostra (Rosenberg *et al.*, 1995). Para determinar o limite da viscoelasticidade linear foram efectuados, em todas as amostras, varrimentos de tensão (entre 0 e 2000 Pa), às frequências de 1 Hz (primeiro e segundo ensaio) e 0,1, 1 e 10 Hz (terceiro ensaio).

Os espectros mecânicos (varrimentos de frequência) foram realizados a tensões variáveis entre 50 e 200 Pa, dependendo dos resultados obtidos nos varrimentos de tensão. Todos os varrimentos de frequência foram conduzidos com um intervalo de oscilação da frequência entre 0,001 a 100 Hz. O teste foi conduzido em três porções diferentes resultando, assim, três réplicas por amostra. Os resultados obtidos no reómetro foram a variação, com a frequência, dos seguintes parâmetros: módulo conservativo (G' , em Pa), módulo dissipativo (G'' , em Pa), tangente dissipativa ($\tan \delta$, adimensional) e viscosidade complexa ($|\eta^*|$, em Pa.s). Posteriormente obtiveram-se os seguintes parâmetros viscoelásticos: $G'_{1\text{Hz}}$, $\tan \delta_{1\text{Hz}}$, $\log \alpha$ e b . Os valores de $\log \alpha$ e b foram obtidos pelo ajuste logarítmico dos dados experimentais à lei de potência de acordo com a seguinte expressão [$|\eta^*| = \alpha \omega^{-b}$] ou [$\log |\eta^*| = \log \alpha - b \times \log \omega$] (Kasapis *et al.*, 1997).

Cor

A análise instrumental de cor foi realizada com uma pistola colorimétrica Minolta CR-300® (Minolta, Osaka, Japan). Os resultados foram obtidos a partir de um ângulo visual de 2° e foram expressos de acordo com o sistema de coordenadas CIELAB: L^* corresponde à luminosidade que varia entre 0 (preto) e 100 (branco), a^* corresponde à tonalidade verde/vermelho (-60 é verde e +60 é vermelho) e b^* tonalidade azul/amarelo (-60 é azul e +60 é amarelo). Antes das medições o equipamento foi calibrado com um padrão branco ($L^* = 97,10$; $a^* = -4,88$; $b^* = 7,04$). Foram efectuadas dez medições por amostra: três no centro do queijo e as restantes sete na borda (Minolta, 1991).

3.2.3 – Avaliação sensorial

A caracterização do perfil sensorial das amostras, através do método da análise quantitativa descritiva (QDA – “quantitative descriptive analysis”) foi realizada apenas no terceiro ensaio, onde esteve em causa a influência do tempo de congelação nas propriedades sensoriais do queijo. Foram realizadas sete sessões de avaliação sensorial do queijo por um grupo de dezoito provadores seleccionados e \treinados (NP ISO 8586-1, 2001). As provas decorreram numa sala de provas com especificações normalizadas (NP ISO 8586-2, 2001).

A metodologia utilizada na constituição, selecção e treino do painel de provadores, foi efectuada de acordo com as normas internacionais em vigor, bem como com recurso à

terminologia aceite (ISO 3972, 1991; ISO 5492, 1992; Barcenas *et al.*, 2000a, b; Larráyoiz *et al.*, 2002; Barcenas *et al.*, 2004) e encontra-se descrita em anteriores trabalhos de análise sensorial de queijo Serpa (Canada, 2001; Costa, 2006). A ficha de prova, utilizada na obtenção do perfil sensorial, apresenta-se na Figura 7.

ASPECTO	
Espessura da crosta	
Pouco	Muito
Ligação da crosta à pasta	
Pouco	Muito
Cor da pasta	
Branca	Amarela
Olhos	
Poucos	Muitos
CHEIRO	
Cheiro característico	
Pouco	Muito
Cheiro amoniacal	
Pouco	Muito
TEXTURA	
Textura granulosa	
Pouco	Muito
Textura amanteigada	
Branca	Muito
SABOR	
Sabor picante	
Pouco	Muito
Sabor doce	
Pouco	Muito
Sabor salgado	
Pouco	Muito
Sabor ácido	
Pouco	Muito
Sabor amargo	
Pouco	Muito
“FLAVOUR”	
“flavour” característico	
Pouco	Muito
“flavour” azedo	
Pouco	Muito
Persistência	
Pouco	Muito
Gosto residual	
Pouco	Muito

Figura 7 – Ficha de Prova para obtenção do perfil sensorial.

Os atributos que se apresentam na ficha de prova, foram estabelecidos com a participação do painel de provadores (Barcenas *et al.*, 2000a) e seleccionados de acordo com os objectivos do trabalho. A descrição dos atributos sensoriais apresenta-se na secção 6.3.3 – Impacto da congelação nas propriedades sensoriais do queijo. Na definição dos atributos foi realizada uma mesa redonda com os provadores, na presença de amostras de queijo Serpa não congeladas e amostras submetidas a congelação, de forma que cada participante as descrevesse conforme considerasse oportuno. Finalmente fez-se uma selecção dos termos que melhor descrevessem o impacto da congelação nos atributos sensoriais do queijo. Optou-se por fazer uma tabela simples, com poucos atributos, tentando-se conjugar não só atributos que pudessem estar relacionados com o aparecimento de defeitos devido à congelação, mas também os característicos do queijo Serpa.

Para além da ficha apresentada na Figura 7, foi fornecida outra aos provadores, para classificar os queijos numa escala de pior a melhor.

Os resultados das fichas foram convertidos numa escala quantitativa de 1 a 9, do mínimo ao máximo para cada atributo, com auxílio de um acetato com graduação em cada uma das escalas, no sentido de dividir a escala contínua da ficha de prova em escala graduada com nove secções.

3.3 – Tratamentos estatísticos

Os tratamentos estatísticos usados dependeram do ensaio e dos objectivos em causa, pelo que são justificados em cada capítulo/ensaio. Nesta fase, pretende-se fazer um pequeno resumo dos objectivos gerais de cada metodologia. Todos os tratamentos e gráficos foram elaborados pelos “software” Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation, 2002) e Statistica 6.0 (StatSoft, 2001).

3.3.1 – Estatística descritiva e análise de variância a um factor

Os valores médios foram obtidos a partir de duas ou três amostras semelhantes (dependendo do ensaio) e, em cada amostra, foram utilizadas entre 3 ou 10 réplicas laboratoriais (dependendo do parâmetro). Assim, cada valor médio está associado a pelo menos seis repetições ($n = 6$). Para além das médias dos atributos foram determinados

os desvios padrão, para incluir nas tabelas de resultados, bem como o intervalo de confiança a 95%, que foi usado para a apresentação gráfica das médias.

Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores médios obtidos para um determinado parâmetro, foi efectuado o teste de comparação de médias "ANOVA post hoc comparisons Scheffé contrasts" (Montgomery, 1984).

3.3.2 – Técnicas exploratórias multivariadas

3.3.2.1 – Análise em componentes principais

A análise em componentes principais (ACP) é aplicada no sentido de resumir um grande número de dados experimentais (espaço multidimensional) num espaço com poucas dimensões (2 ou 3), sem se perder muita informação. A ACP é baseada na combinação linear das variáveis experimentais (atributos medidos), com variáveis artificialmente produzidas designadas por componentes principais (CP's), que formam um espaço ortogonal (Gardner, 1997). Está em causa a redução de um espaço m-dimensional (variáveis originais) num outro com menor número de dimensões, uma vez que, apenas incorpora as componentes principais significativas. A primeira componente é a que contém maior variância associada, seguindo-se a segunda e assim sucessivamente, até perfazer m-componentes, cuja soma da variância é igual à soma da variância das variáveis originais (100%). De facto, as m-variáveis originais têm valor próprio igual a 1, "pesam" todas o mesmo, enquanto que as m-componentes têm valor próprio diferente de 1. A primeira componente é a que tem maior valor próprio, seguindo-se a segunda, e assim sucessivamente, sendo o somatório do valor próprio das m-componentes, igual ao número de variáveis utilizadas na análise (Johnson e Wichern, 1998). A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais, bem como as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projectão das amostras no plano principal), permite reconhecer correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com comportamento semelhante, que seria mais difícil de analisar pela simples observação de números em tabelas.

3.3.2.2 – Classificação aglomerativa hierárquica (“cluster analysis”)

A classificação aglomerativa hierárquica é uma técnica exploratória multivariada, em que se pretende agrupar um certo número de indivíduos em classes de elementos com comportamento semelhante, ou obter uma família de classificações, representando uma certa hierarquia a partir de, por exemplo, as suas distâncias euclidianas no espaço. Os resultados foram apresentados sob a forma de um dendrograma (Dias, 1985).

3.3.2.3 – Regressão linear múltipla

A regressão linear múltipla (RLM) foi realizada no primeiro ensaio no sentido de obter um modelo que permite estimar o tempo de cura de um determinado queijo a partir dos parâmetros experimentais. O modelo assenta na equação $R_t = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \dots + \beta_n\chi_n + \varepsilon$, onde R_t representa o tempo de cura, $\chi_1 \dots \chi_n$ são os parâmetros estudados, $\beta_0 \dots \beta_n$ representam os coeficientes do modelo e ε é um termo aditivo de erro. Na análise usou-se o modelo misto, por passos “stepwise”, que combina as técnicas de eliminação de parâmetros a partir do conjunto inicial formado por todos os parâmetros analisados, “backward elimination”, com a selecção de parâmetros de forma aditiva ou selecção para diante (“forward selection”). O nível de significância escolhido para a selecção de variáveis foi 0,05 (Draper e Smith, 1998).

CAPÍTULO 4 – “MONITORIZAÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DO QUEIJO AO LONGO DA MATURAÇÃO” (ENSAIO 1)

Resumo

A cremosidade da pasta dos queijos de ovelha obtidos a partir de leite de ovelha cru é um atributo de qualidade essencial, que resulta das respectivas características estruturais. O conhecimento dos fenómenos que controlam o amolecimento da pasta destes queijos ao longo da cura poderá ajudar na tomada de decisões pelos transformadores. Com recurso a ensaios reológicos fundamentais, através dos testes SAOS (“small amplitude oscillatory stress”), fez-se a monitorização da cura de queijo Serpa em dois produtores, usando-se amostras com 0, 3, 7, 14, 21, 35 e 42 dias de cura. Os parâmetros reológicos foram complementados com parâmetros físicos e químicos, no sentido de melhor explicar as modificações estruturais observadas. Os espectros mecânicos das amostras no início da cura mostraram uma estrutura relativamente forte, comparável com um gel, com baixa dependência da frequência e, no final da cura, uma estrutura relativamente frágil, comparável a uma suspensão concentrada de macromoléculas, com um ponto de cruzamento ($G'' = G'$) na zona inicial do espectro. O módulo conservativo à frequência de 1 Hz decresceu de valores médios de cerca de 55 kPa, no início da cura, para valores médios de 10 kPa, até ao final da primeira semana de cura (produtor A), ou da terceira semana (produtor B), e permaneceu relativamente constante até ao final da 5ª semana. Obtiveram-se correlações significativas entre os parâmetros estruturais e os indicadores de proteólise. A análise em componentes principais evidenciou uma mudança bastante visível nas propriedades estruturais das amostras nas primeiras 2-3 semanas de cura e uma estagnação nessas propriedades até ao final da cura. Usando uma combinação entre parâmetros químicos, de cor e reológicos foi possível obter um modelo de regressão linear múltipla, o qual poderá ser usado na determinação do tempo de cura dum queijo Serpa. Este modelo apresentou um erro estimado de 1,7 dias (R^2 ajustado = 0,98, $P < 0,0001$)

Palavras-chave: queijo de ovelha, estrutura, reologia, textura, cura, proteólise.

4.1 – Introdução

Os queijos de ovelha de pasta semi-mole, produzidos a partir de leite de ovelha cru, são muito apreciados pela suavidade da pasta amanteigada. As alterações ocorridas nas propriedades destes queijos, ao longo da cura, têm sido objecto de estudos considerando diferentes aspectos: proteólise (Macedo *et al.*, 1996b; Macedo e Malcata, 1997; Sousa *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2003; Roseiro *et al.*, 2003a; Tavarina *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008), lipólise (Macedo *et al.*, 1996b) e sob o ponto de vista microbiológico (Tavarina *et al.*, 2006). Sob o ponto de vista físico, a evolução das propriedades deste tipo de queijos ao longo da cura está pouco estudada, existindo apenas alguns estudos ao nível da textura e da cor (Alvarenga e Sousa, 2001; Pinho *et al.*, 2004). No entanto, é ao nível das propriedades viscoelásticas que existe maior défice de investigação nesta área.

O queijo Serpa é produzido no Baixo Alentejo, numa região bem definida e protegida com regulamento próprio (DR, 1987). É um queijo curado, obtido a partir de leite de ovelha cru, de pasta gorda, semi-mole e amanteigada, com pelo menos 30 dias de cura, produzido a partir da sinérese lenta da coalhada após coagulação com uma infusão de cardo, *Cynara cardunculus* L. (DR, 1987; Roseiro *et al.*, 2003a). A produção de ácido láctico, durante o período de cura, reduz o pH, promove a expulsão do soro da coalhada, inibe o crescimento de bactérias patogénicas e garante o predomínio das bactérias lácticas (Canada, 2001). Este é o principal método de controlo ao alcance dos produtores de queijo para diminuir o risco de transmissão de vectores potenciais causadores de doença (Zottola e Smith, 1991; Meyrand *et al.*, 1998). Como o processo de fermentação não é instantâneo, há necessidade deste queijo ter um período mínimo de 30 dias de cura, por motivos de segurança alimentar. Como foi referido anteriormente, têm surgido alguns estudos onde se faz a estimativa do tempo de cura (idade dos queijos) a partir das suas propriedades, utilizando o método de regressão linear múltipla (RLM) em queijos Portugueses (Pinho *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006) e Espanhóis (Poveda *et al.*, 2004b).

Em termos gerais, pode-se afirmar que o comportamento viscoelástico do queijo é, principalmente, influenciado pelas propriedades do componente principal que forma a fase contínua da sua estrutura, ou seja, a proteína. Os outros constituintes maiores do queijo, como a gordura e a humidade, contribuem para este comportamento através da modificação das propriedades da rede proteica (Zalazar *et al.*, 2002; Gunasekaran e Ak, 2003). Existem numerosos factores, como a proteólise, a temperatura e o pH, que

também têm uma grande influência no comportamento viscoelástico dos queijos (Park, 2007). Os testes SAOS “small amplitude oscillatory stress” possibilitam a quantificação do efeito elástico e viscoso em simultâneo (Gunasekaren e Ak, 2003). A resposta elástica no queijo é devida, essencialmente, às ligações proteína-proteína. A dissipação viscosa no queijo pode ser devida ao escoamento do próprio material constituinte da matriz, ou seja a proteína, mas também ao fluxo de líquido através da matriz, ou ainda devido ao movimento de outros componentes estruturais entre eles, causando fricção (Luyten *et al.*, 1991; Park, 2007).

A textura também é afectada pelos factores que determinam a estrutura, como a humidade, o sal, o pH e o grau de proteólise (Watkinson *et al.*, 2001; Attaie, 2005; Park, 2007). No início da cura, a textura da pasta é determinada pela composição do leite, especialmente pela razão gordura/caseína (Bryant *et al.*, 1995) e pelas operações de fabrico, uma vez que estas controlam a extensão da sinérese (Cunha *et al.*, 2002), condicionando, a humidade do queijo em fresco e, desta forma, a evolução da textura ao longo da cura.

A proteólise é o evento mais complexo ocorrido durante a cura e, possivelmente, o evento mais importante para o desenvolvimento da textura (Grappin *et al.*, 1985; Rank *et al.*, 1985; Sousa *et al.*, 2001). As mudanças de textura, ocorridas durante a cura, não são iguais em todos os queijos. Nalguns casos, observa-se um amolecimento do queijo, devido à predominância do efeito da proteólise das caseínas (Noomen, 1983; Al-Otaibi e Wilbey, 2006); noutros, observa-se um endurecimento devido à predominância do efeito de secagem (Buffa *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2004; Attaie, 2005; Awad, 2006). Estes efeitos opostos, da secagem e da proteólise, nas propriedades reológicas do queijo foram explicados anteriormente da seguinte forma: a proteólise reduz o módulo conservativo, enquanto que a secagem tem um efeito oposto (Dewettinck *et al.*, 1999). O amolecimento, induzido pela proteólise, é mais evidente quando o queijo é produzido a partir de leite cru (Rosenberg *et al.*, 1995). A secagem provoca uma concentração das moléculas solúveis, diminuindo a mobilidade da água e aumentando a elasticidade (Stampanoni e Noble, 1991). Dentro do processo de cura de um queijo, podem haver fases onde se observa o amolecimento e fases onde se observa o endurecimento.

A glicólise, em queijos produzidos a partir de leite de ovelha cru, é garantida por bactérias lácticas nativas. A lactose residual é convertida em ácido láctico e, a extensão da acidificação, tem impacto na textura dos queijos devido à desmineralização das sub-

micelas de caseína (Fox *et al.*, 1999; Pinho *et al.*, 2004). A taxa de acidificação, na primeira fase da cura, tem importância fundamental nas propriedades estruturais das proteínas, uma vez que o abaixamento de pH promove a desmineralização e enfraquecimento do gel, influenciando os parâmetros de textura/estrutura (Ramkumar *et al.*, 1998; Watkinson *et al.*, 2001; Park, 2007). Com o abaixamento de pH, as sub-micelas de caseína ficam sujeitas a uma perda de fosfato de cálcio coloidal, causando uma dissociação progressiva das sub-micelas em agregados de caseína mais pequenos. Esta alteração, na rede proteica, contribui para uma alteração das propriedades reológicas do queijo (Ramkumar *et al.*, 1998).

Neste ensaio, tomaram-se como base amostras de queijo Serpa, no sentido de concretizar os seguintes objectivos: (i) monitorizar a evolução das propriedades do queijo de ovelha de pasta semi-mole obtido a partir de leite de ovelha cru, ao longo da cura, considerando os parâmetros reológicos (espectro mecânico, módulo conservativo $G'_{1\text{Hz}}$, tangente dissipativa $\tan\delta_{1\text{Hz}}$ e viscosidade complexa $|\eta^*|$), os parâmetros de perfil de textura - TPA (dureza, adesividade e coesividade), os parâmetros de cor (L^* , a^* b^*) e os parâmetros químicos (humidade, gordura, acidez, pH, azoto total, azoto solúvel em água, azoto não proteico, e azoto aminoacídico); (ii) determinar correlações entre os parâmetros reológicos e químicos; (iii) desenvolver um modelo de regressão linear múltipla, capaz de determinar o tempo de cura (idade dos queijos) a partir das suas propriedades físicas e químicas.

4.2 – Material e métodos

4.2.1 – Delineamento experimental

Neste ensaio foram usadas 28 amostras de queijo, com cerca de 0,8 kg, provenientes de dois produtores de queijo Serpa, seleccionados pela qualidade e regularidade da produção, os quais passamos a designar por produtor A e produtor B. O método de produção de queijo foi semelhante em ambos os produtores. Os queijos foram obtidos pela coagulação do leite (30 °C/45 min) a partir duma infusão de flor de cardo, *Cynara cardunculus* L., sinérese lenta da coalhada, prensagem manual, moldagem e curado durante 42 dias. Na cura foram usadas duas câmaras: nas duas primeiras semanas, os queijos permaneceram na primeira câmara a uma temperatura de 8-9 °C e uma humidade relativa de 92-97%. No final desta fase, os queijos foram lavados, cintados

com um pano e passaram para a segunda câmara de cura, onde permaneceram à temperatura de 10-13 °C com humidade relativa de 85-90% (Canada, 2001; Roseiro *et al.*, 2003c).

Em ambos os produtores, as amostras pertenciam ao mesmo lote de fabrico, mas foram colhidas com diferentes tempos de cura. No produtor A foram colhidos grupos de 2 queijos após 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cura. A análise preliminar dos resultados do produtor A, revelaram a necessidade de testar amostras de queijos com 3 e 42 dias de cura. Consequentemente, no produtor B, foram colhidas amostras de queijo após 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura. Na Tabela 2 pode observar-se o desenho experimental e a codificação utilizada para as amostras

Tabela 2 – Plano de amostragem do ensaio 1.

Amostra	Produtor	Tempo de cura (Dias)	Código
1	A	0	A0
2	A	0	A0
3	A	7	A7
4	A	7	A7
5	A	14	A14
6	A	14	A14
7	A	21	A21
8	A	21	A21
9	A	28	A28
10	A	28	A28
11	A	35	A35
12	A	35	A35
13	B	0	B0
14	B	0	B0
15	B	3	B3
16	B	3	B3
17	B	7	B7
18	B	7	B7
19	B	14	B14
20	B	14	B14
21	B	21	B21
22	B	21	B21
23	B	28	B28
24	B	28	B28
25	B	35	B35
26	B	35	B35
27	B	42	B42
28	B	42	B42

As amostras de queijo foram transportadas para o laboratório em malas térmicas e as análises laboratoriais foram iniciadas no mesmo dia. A preparação da amostra foi descrita no Capítulo 3.

4.2.2 – Procedimentos laboratoriais

A caracterização química consistiu na determinação dos seguintes parâmetros: pH, acidez titulável, azoto total (NT), azoto solúvel em água (NSA), azoto não proteico (NNP), azoto aminoacídico (NA), bem como parâmetros obtidos por cálculo indirecto, nomeadamente resíduo seco, humidade referida ao queijo isento de gordura (HQIG), gordura no resíduo seco (GRS), percentagem de azoto solúvel ou coeficiente de maturação (NSA%), percentagem de azoto não proteico (NNP%) e percentagem de azoto aminoacídico (NA%). Na caracterização física usaram-se os parâmetros de cor L^* , a^* , e b^* , os parâmetros de textura dureza, adesividade e coesividade e os parâmetros viscoelásticos módulo de conservação $G'_{1\text{Hz}}$, tangente dissipativa $\tan \delta_{1\text{Hz}}$, $\log \alpha$ e b (descritos no Capítulo 3).

4.2.3 – Análise estatística

As determinações químicas, texturais e viscoelásticas foram realizadas em triplicado (2 amostras, 3 réplicas, $n = 6$) enquanto que para a cor foram usadas 10 réplicas (2 amostras, 10 réplicas, $n = 20$). Para avaliar a qualidade dos resultados laboratoriais, obtidos para cada um dos parâmetros foi usada estatística descritiva, através da determinação da média, desvio padrão, erro e intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. Para monitorizar a evolução das propriedades das amostras de queijo ao longo da cura, foram efectuadas análises de variância a um factor (teste de Scheffé para comparação de médias), análise de correlações e análise de componentes principais. Para estimar o tempo de cura do queijo Serpa usou-se a regressão linear múltipla descrita anteriormente (3.3 – Tratamentos estatísticos).

4.3 – Resultados e discussão

4.3.1 – Monitorização da evolução das propriedades do queijo

As médias, desvios padrão, e resultados da análise de variância, obtidos na caracterização física e química das amostras de queijo ao longo do tempo de cura, encontram-se na Tabela 3 (produtor A) e na Tabela 4 (produtor B). Na maioria dos casos, observaram-se diferenças significativas ($P < 0,05$) na evolução das propriedades analisadas ao longo da cura. Foi também possível observar, em ambos os produtores, um aumento no desvio padrão da maioria dos parâmetros ao longo da cura. Isto deve-se

ao facto de o queijo ser um produto que depende da actividade biológica. Na fase inicial da cura não houve diferenciação das amostras, porque foram preparadas a partir do mesmo lote, apresentando valores de desvios-padrão baixos mas, quando as amostras foram para a câmara de cura, observou-se uma diferenciação ao longo do tempo, resultando no aumento dos valores de desvio padrão.

Ainda em relação ao desvio padrão no final da cura observaram-se valores inferiores no produtor B, quando comparados com o produtor A. Isto significa que o produtor B apresentou condições de cura que garantiram uma maior homogeneidade nos queijos do mesmo lote.

Os parâmetros de textura e as características viscoelásticas dão-nos informações sobre a estrutura do material. Em termos gerais, nos parâmetros de textura, observou-se uma diminuição da dureza (à excepção dos primeiros dias de cura) e um aumento da adesividade e da coesividade. Nos parâmetros viscoelásticos observou-se uma diminuição do módulo conservativo (à excepção dos primeiros dias de cura) e dos valores de b e $\log \alpha$, bem como um aumento da tangente dissipativa. Das propriedades reológicas, foi a dureza e o módulo de conservação a 1 Hz que mais evoluíram ao longo da cura. A dureza das amostras diminuiu de 16 N para 4 N, aproximadamente, dependendo do produtor, o que representa uma redução de cerca de quatro vezes. No caso do módulo conservativo, a redução foi de cerca de 54 kPa para cerca de 9 kPa, representando uma redução superior a seis vezes. A evolução destes parâmetros só encontrou paralelo na evolução do NA%, que é uma propriedade muito influenciada pela actividade enzimática.

Tabela 3 – Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para o produtor A, ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)					
	0	7	14	21	28	35
Dureza (N)	14,66 (0,99) ^a	6,01 (0,90) ^b	5,20 (0,61) ^b	4,80 (0,93) ^b	4,19 (1,85) ^b	3,91 (2,57) ^b
Adesividade (-N.mm)	5,48 (2,61) ^{bc}	4,36 (1,14) ^c	4,21 (1,66) ^c	6,67 (1,42) ^{abc}	15,31 (6,64) ^a	14,81 (8,92) ^{ab}
Coesividade	0,50 (0,02) ^{ab}	0,47 (0,02) ^b	0,53 (0,03) ^{ab}	0,44 (0,02) ^b	0,57 (0,08) ^{ab}	0,63 (0,14) ^a
Módulo de conservação G'_{Hz} (kPa)	53,95 (6,77) ^a	10,63 (3,74) ^b	9,10 (1,37) ^b	8,42 (1,58) ^b	10,47 (6,92) ^b	8,72 (4,09) ^b
Tangente dissipativa $\tan \delta_{Hz}$	0,26 (0,01) ^b	0,38 (0,03) ^{ab}	0,47 (0,02) ^a	0,46 (0,08) ^a	0,41 (0,08) ^a	0,48 (0,15) ^a
b	0,82 (0,01) ^a	0,76 (0,01) ^{ab}	0,66 (0,02) ^b	0,64 (0,08) ^b	0,67 (0,08) ^{ab}	0,64 (0,13) ^b
log α	3,96 (0,05) ^a	3,26 (0,15) ^b	3,24 (0,06) ^b	3,20 (0,08) ^b	3,24 (0,21) ^b	3,17 (0,23) ^b
Cor – L*	92,17 (0,73) ^a	91,67 (1,57) ^a	87,14 (0,91) ^b	86,44 (0,84) ^{bc}	85,31 (1,59) ^c	83,48 (0,98) ^d
Cor – a*	-3,14 (0,46) ^a	-3,98 (0,24) ^b	-5,01 (0,13) ^{cd}	-4,76 (0,29) ^c	-5,02 (0,16) ^{cd}	-5,20 (0,16) ^d
Cor – b*	11,73 (1,23) ^c	15,25 (0,63) ^d	17,84 (0,59) ^{bc}	17,14 (1,20) ^c	18,63 (0,61) ^{ab}	19,20 (0,58) ^a
Humidade % (m/m)	56,68 (0,45) ^a	54,46 (0,37) ^b	52,45 (0,56) ^c	51,03 (0,98) ^{cd}	50,88 (0,72) ^{cd}	50,30 (1,20) ^d
Azoto total % (m/m)	3,13 (0,11) ^c	3,10 (0,11) ^c	3,29 (0,10) ^{bc}	3,30 (0,13) ^{bc}	3,50 (0,13) ^b	3,74 (0,11) ^a
Azoto solúvel em água % (m/m)	0,54 (0,03) ^d	0,66 (0,08) ^{cd}	0,83 (0,01) ^b	0,81 (0,02) ^{bc}	0,88 (0,14) ^b	1,11 (0,10) ^a
Azoto não proteico % (m/m)	0,093 (0,004) ^d	0,098 (0,007) ^d	0,127 (0,008) ^{cd}	0,161 (0,016) ^{bc}	0,177 (0,005) ^b	0,227 (0,046) ^a
Azoto aminoacídico (mg Leu/g)	0,30 (0,02) ^e	0,49 (0,01) ^{de}	0,58 (0,01) ^{cd}	0,76 (0,06) ^c	1,26 (0,06) ^b	1,65 (0,28) ^a
Acidez (ml NaOH N/100g)	2,60 (0,22) ^d	6,60 (0,22) ^c	13,43 (0,40) ^a	10,83 (2,38) ^b	4,20 (1,10) ^d	4,33 (0,30) ^d
Gordura (g/100g)	20,1 (1,1) ^c	21,9 (0,2) ^b	22,0 (0,0) ^b	23,3 (1,1) ^{ab}	23,8 (0,9) ^a	24,4 (0,5) ^a
pH	6,41 (0,07) ^a	5,57 (0,03) ^{bc}	5,45 (0,05) ^{cd}	5,40 (0,11) ^d	5,71 (0,13) ^b	5,71 (0,02) ^b

^{a,b,c,...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 6$, para a cor $n = 20$ (teste de Scheffé).

Tabela 4 – Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para o produtor B, ao longo do tempo de cura.

Parâmetros	Tempo de cura (dias)									
	0	3	7	14	21	28	35	42		
Dureza (N)	16,67 (1,62) ^{ab}	18,77 (2,33) ^{ab}	20,81 (0,95) ^a	14,53 (2,99) ^b	10,16 (0,96) ^c	6,48 (1,27) ^{cd}	7,72 (2,90) ^{cd}	4,33 (0,86) ^d		
Adesividade (-N.mm)	7,35 (1,70) ^c	7,96 (3,27) ^c	9,75 (2,79) ^{bc}	7,17 (1,36) ^c	19,72 (7,69) ^{ab}	13,55 (5,97) ^{abc}	22,88 (7,11) ^a	13,97 (2,25) ^{abc}		
Coesividade	0,48 (0,02) ^{cd}	0,47 (0,02) ^d	0,47 (0,01) ^d	0,45 (0,03) ^d	0,54 (0,04) ^{bc}	0,55 (0,04) ^b	0,63 (0,02) ^a	0,66 (0,03) ^a		
Módulo de conservação G' (kPa)	54,32 (2,43) ^b	62,65 (5,38) ^{ab}	75,88 (10,03) ^a	34,29 (12,84) ^c	11,97 (3,28) ^d	11,47 (3,15) ^d	7,33 (2,34) ^d	8,75 (2,56) ^d		
Tangente dissipativa tan δ_{1Hz}	0,25 (0,00) ^d	0,25 (0,00) ^{cd}	0,26 (0,01) ^{cd}	0,31 (0,01) ^c	0,37 (0,02) ^b	0,39 (0,03) ^b	0,49 (0,04) ^a	0,46 (0,05) ^a		
b	0,82 (0,01) ^a	0,81 (0,00) ^a	0,80 (0,01) ^{ab}	0,77 (0,01) ^{abc}	0,74 (0,02) ^{bc}	0,72 (0,03) ^c	0,61 (0,04) ^d	0,63 (0,05) ^d		
log α	3,98 (0,02) ^{ab}	4,03 (0,03) ^a	4,13 (0,06) ^a	3,77 (0,17) ^b	3,34 (0,10) ^c	3,32 (0,09) ^c	3,14 (0,13) ^c	3,21 (0,12) ^c		
Cor – L*	88,55 (0,23) ^a	88,39 (0,42) ^a	87,42 (0,35) ^b	88,27 (0,87) ^a	83,18 (0,56) ^c	80,47 (0,70) ^d	79,39 (0,30) ^e	80,13 (1,35) ^{de}		
Cor – a*	-3,02 (0,07) ^b	-2,99 (0,22) ^b	-3,21 (0,12) ^c	-2,71 (0,13) ^a	-3,50 (0,16) ^d	-4,07 (0,17) ^e	-3,66 (0,15) ^d	-4,53 (0,13) ^f		
Cor – b*	10,39 (0,29) ^f	10,88 (0,30) ^{ef}	11,23 (0,34) ^e	12,28 (0,62) ^d	13,17 (0,68) ^c	15,01 (0,67) ^a	14,08 (0,46) ^b	14,66 (0,48) ^{ab}		
Humidade % (m/m)	59,31 (2,13) ^a	57,46 (1,38) ^{ab}	55,74 (0,79) ^{bc}	54,82 (0,19) ^c	54,20 (0,18) ^c	54,12 (0,70) ^c	54,19 (0,16) ^c	54,37 (0,33) ^c		
Azoto total % (m/m)	2,58 (0,05) ^c	2,68 (0,12) ^c	2,87 (0,07) ^b	3,05 (0,03) ^a	3,10 (0,08) ^a	3,08 (0,10) ^a	3,10 (0,07) ^a	3,07 (0,06) ^a		
Azoto solúvel em água % (m/m)	0,38 (0,02) ^f	0,48 (0,02) ^e	0,45 (0,02) ^e	0,72 (0,01) ^d	0,93 (0,02) ^c	0,91 (0,02) ^c	1,09 (0,03) ^a	1,01 (0,02) ^b		
Azoto não proteico % (m/m)	0,046 (0,001) ^e	0,031 (0,004) ^d	0,031 (0,001) ^d	0,037 (0,005) ^d	0,049 (0,001) ^c	0,059 (0,002) ^b	0,070 (0,000) ^a	0,077 (0,006) ^a		
Azoto aminoacídico (mg Leu/g)	0,09 (0,02) ^e	0,18 (0,02) ^e	0,28 (0,05) ^d	0,31 (0,06) ^d	0,36 (0,03) ^d	0,61 (0,04) ^c	0,74 (0,03) ^b	0,84 (0,08) ^a		
Acidez (ml NaOH N/100g)	1,80 (0,21) ^d	1,85 (0,21) ^d	4,00 (0,00) ^c	11,00 (0,21) ^a	11,05 (2,30) ^a	9,25 (0,50) ^b	7,60 (0,00) ^b	7,85 (0,71) ^b		
Gordura (g/100g)	17,83 (0,7) ^e	19,1 (0,6) ^{de}	20,1 (0,5) ^{cd}	22,3 (0,6) ^{ab}	21,4 (0,2) ^{bc}	22,1 (0,2) ^{ab}	22,8 (0,3) ^a	22,3 (1,1) ^{ab}		
pH	6,42 (0,02) ^a	6,42 (0,04) ^a	5,89 (0,04) ^b	5,01 (0,08) ^{5d}	5,14 (0,15) ^d	5,05 (0,06) ^d	5,02 (0,14) ^d	5,57 (0,04) ^c		

^{a,b,c,...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 6$, para a cor $n = 20$ (teste de Scheffé).

Para descrever o comportamento viscoelástico, foram realizados testes SAOS “small amplitude oscillatory stress”. Nestes testes é necessário ter a garantia de que as tensões aplicadas ao material não provocam a destruição da estrutura, ou seja, tratam-se de testes não destrutivos. Assim, antes dos varrimentos de frequência (espectros mecânicos), foi necessário realizar varrimentos de tensão para determinar o limite da viscoelasticidade linear (LVE) e a tensão a aplicar no varrimento de frequência. Na Figura 8, podem-se observar os varrimentos de tensão médios obtidos para os diferentes tempos de cura.

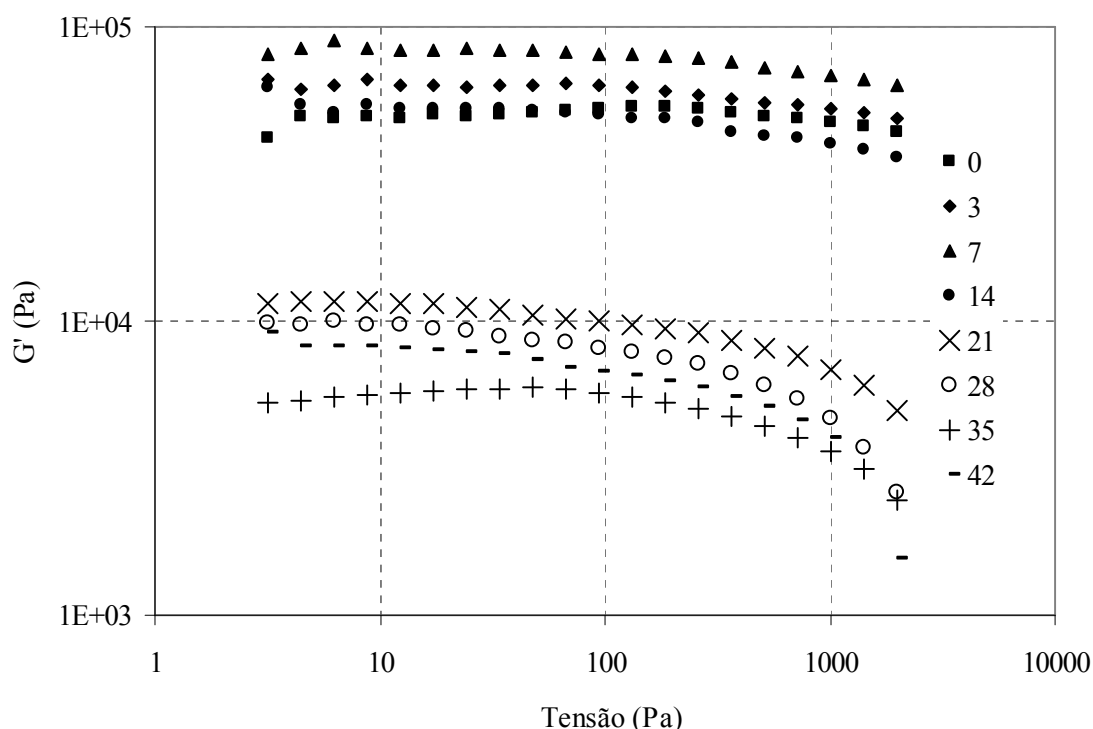


Figura 8 – Varrimentos de tensão médios das amostras aos 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura ($\omega = 1\text{Hz}$).

Com base nestes resultados, para os espectros mecânicos (varrimento de frequências) aplicou-se uma tensão de 200 Pa nas amostras até à segunda semana (■ ◆ ▲ ●) e uma tensão de 50 Pa a partir da terceira semana até ao fim da cura (× ○ + -). Na Figura 8 podemos observar que a região de viscoelasticidade linear foi maior nas primeiras semanas de cura, do que no final. Isto quer dizer que as amostras apresentavam uma maior estruturação interna no início da cura e, assim, maior capacidade de resistir a tensões mais elevadas, sem haver destruição da estrutura interna.

Pelo que ficou descrito e pela análise das Tabela 3 e Tabela 4, pode-se referir que o comportamento viscoelástico das amostras foi semelhante em ambos os produtores, pelo que se apresentam, a título de exemplo, os espectros mecânicos médios do produtor B, por ser neste que existiram maior número de observações, ao longo da cura (Figura 9).

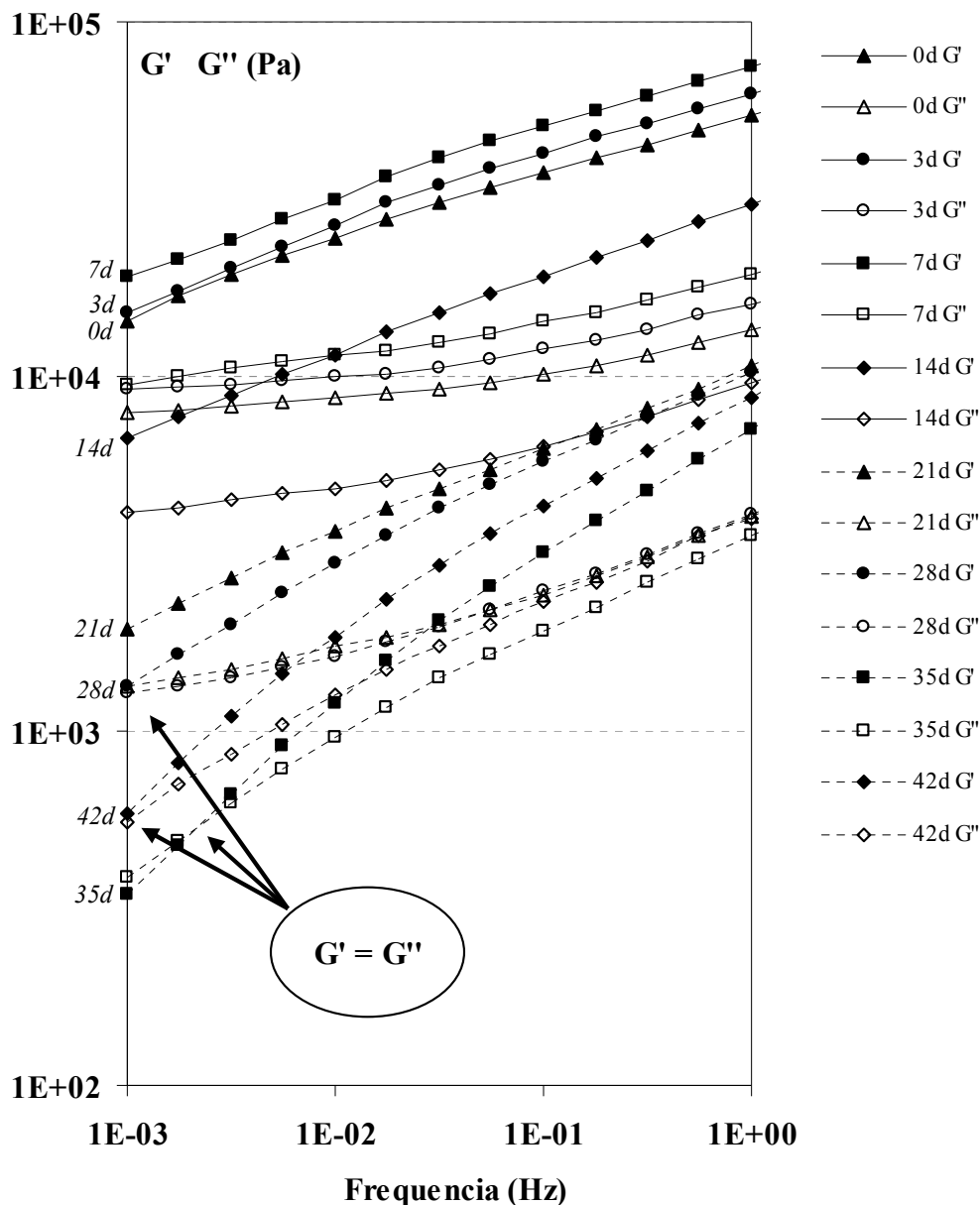


Figura 9 – Espectros mecânicos médios das amostras com 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias cura (G' – ■ ◆ ▲ ●; G'' – □ ◇ △ ○).

Nas primeiras semanas de cura, a componente elástica apresentou-se bastante superior à componente viscosa, em todo o espectro de frequências, indicando um grau relativamente elevado de estruturação do queijo. Com o passar do tempo, observou-se uma descida nos valores de ambos os módulos. No entanto, a descida do módulo

conservativo (G') foi superior à descida do módulo dissipativo (G'') e, no final da cura, as duas linhas encontravam-se mais próximas sendo que, nalguns casos, até se cruzavam para valores baixos de frequência. Assim, à medida que se aproximou o fim da cura observou-se, simultaneamente, uma aproximação dos módulos e uma redução nos seus valores, indicando que a estrutura foi-se tornando cada vez mais débil, ou seja, as amostras foram perdendo propriedades elásticas, ganhando propriedades viscosas e apresentando uma pasta cada vez mais fluida e amanteigada.

Em todas as amostras observou-se dependência das propriedades viscoelásticas com a frequência. No início da cura, as curvas de G' e G'' eram praticamente lineares. No gráfico, G' e G'' tinham um traçado quase recto e paralelo. Assim, para caracterizar as amostras, recorreu-se à determinação do valor de G' à frequência de 1Hz.

Resumindo, a observação dos espectros mecânicos (Figura 9) indicou uma estrutura relativamente forte, comparável com um gel, com baixa dependência da frequência no início da cura, especialmente nas amostras dos 0 aos 21 dias. No fim da cura, nomeadamente nas amostras dos 28 aos 42 dias, observou-se uma estrutura mais débil, comparada com uma suspensão concentrada de moléculas, com ponto de cruzamento “crossing point” entre os valores de G' e G'' (na parte esquerda do gráfico) e ambos os módulos altamente dependentes da frequência (Franco *et al.*, 1998). Os perfis de textura da pasta das amostras apresentam-se na Figura 10. Numa primeira análise, pode-se observar que os resultados obtidos pelas duas metodologias reológicas são concordantes existindo, neste caso, uma grande ligação entre o método fundamental (SAOS) e o método empírico (TPA). A comprovar a concordância entre estes resultados, a correlação entre os valores de $G'_{1\text{Hz}}$ e a dureza foi de 0,961 ($P < 0,0001$).

Nos primeiros 14 dias de cura, as curvas de perfil de textura apresentaram comportamentos de um material com propriedades predominantemente sólidas, observando-se um ponto de fractura nos primeiros segundos da penetração da sonda (Szczeniak, 1963). A partir do 21º dia de cura, as curvas não evidenciaram ponto de fractura, sendo um perfil típico de um fluido predominantemente viscoso. Nas amostras de 21 e 28 dias de cura, não houve ponto de fractura, mas observou-se um declive na fase inicial da curva decrescente, indicando que existia alguma estrutura que ia cedendo à medida que a sonda penetrava.

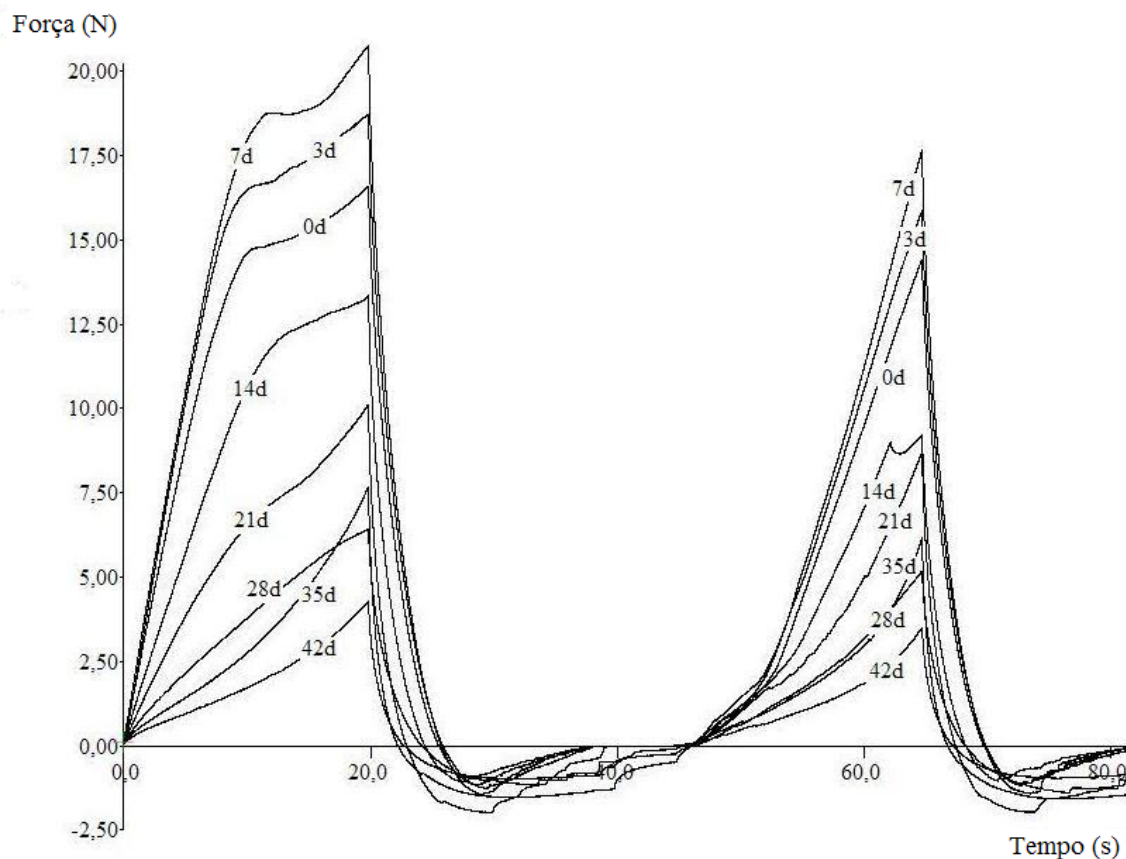


Figura 10 – Perfil de textura médio da pasta das amostras com 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias cura.

Nas duas últimas semanas de cura, o declive inicial da curva era crescente, o que indica que a estrutura era ainda mais débil e suave, revelando-se a existência de escoamento num material mais viscoso e menos elástico que o inicial. Apesar da análise qualitativa dos espectros mecânicos e do perfil de textura, as propriedades estruturais podem ser observadas, em termos quantitativos, a partir dos valores médios de dureza e módulo conservativo a 1 Hz, apresentados na Figura 11.

Em termos gerais, os valores de dureza decresceram ao longo da cura, desde valores de cerca de 15 N no início, para valores de cerca de 5 N no final da cura, em ambos os produtores ($P < 0,05$, Figura 11a). Da mesma forma, os valores de $G'_{1\text{Hz}}$ decresceram de cerca de 55 kPa para cerca de 10 kPa ($P < 0,05$) nos primeiros 7 dias (produtor A) e 21 dias (produtor B) e, posteriormente, permaneceram estáveis até ao final da cura (Figura 11b). No produtor B, estas propriedades evidenciaram um ligeiro aumento no início do processo de cura e até ao 7º dia e só depois os valores começaram a decrescer, tendo este decréscimo apresentado uma taxa inferior, quando comparado com o produtor A.

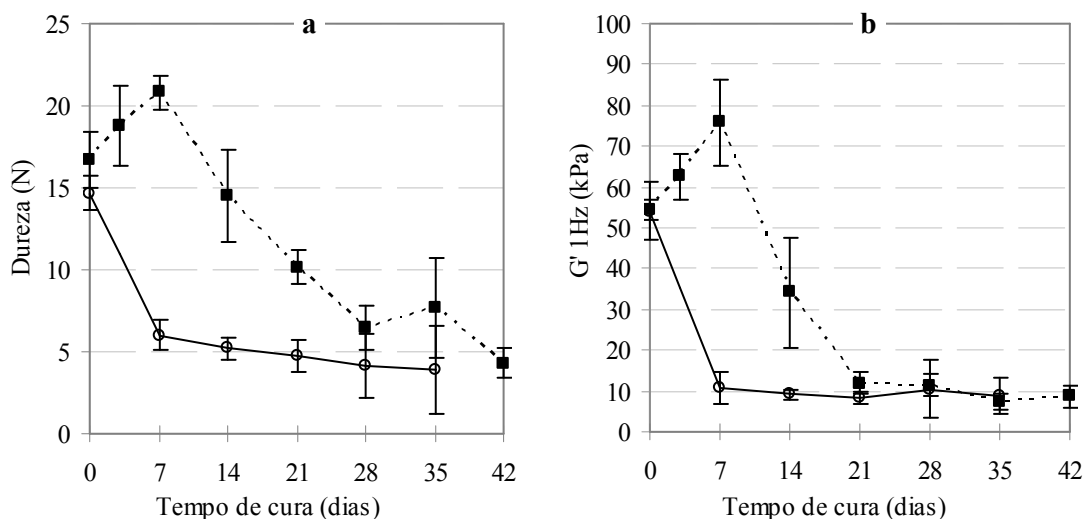


Figura 11 – Evolução dos valores médios da dureza (a) e do módulo conservativo (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (----■----) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Apesar das dinâmicas de cura serem diferentes, para os dois produtores, observou-se que os valores médios destes dois parâmetros foram semelhantes no início e no fim da cura, evidenciando que o processo de fabrico e de condução da maturação leva a um produto final com identidade própria, independentemente do local de produção.

O decréscimo acentuado, observado nos valores médios destes parâmetros nas primeiras semanas de cura, deve-se a uma variação drástica da estrutura interna e coincide com um período em que a actividade enzimática é intensa. Os valores médios de dureza e $G'_{1\text{Hz}}$, no final da cura, são consistentes com valores obtidos noutros estudos envolvendo queijo de ovelha de pasta semi-mole (Alvarenga *et al.*, 2004). De acordo com estes resultados, a dureza e o módulo conservativo podem ser considerados como indicadores estruturais do queijo.

Na Figura 12 pode-se observar a evolução dos valores médios de humidade e gordura ao longo da cura. A humidade (Figura 12a) diminui ao longo da cura, encontrando-se diferenças significativas essencialmente nos primeiros 15 dias ($P < 0,05$). Quanto à gordura (Figura 12b) observou-se um aumento percentual, sendo mais acentuado nos primeiros 14 dias de cura, devido à perda de água.

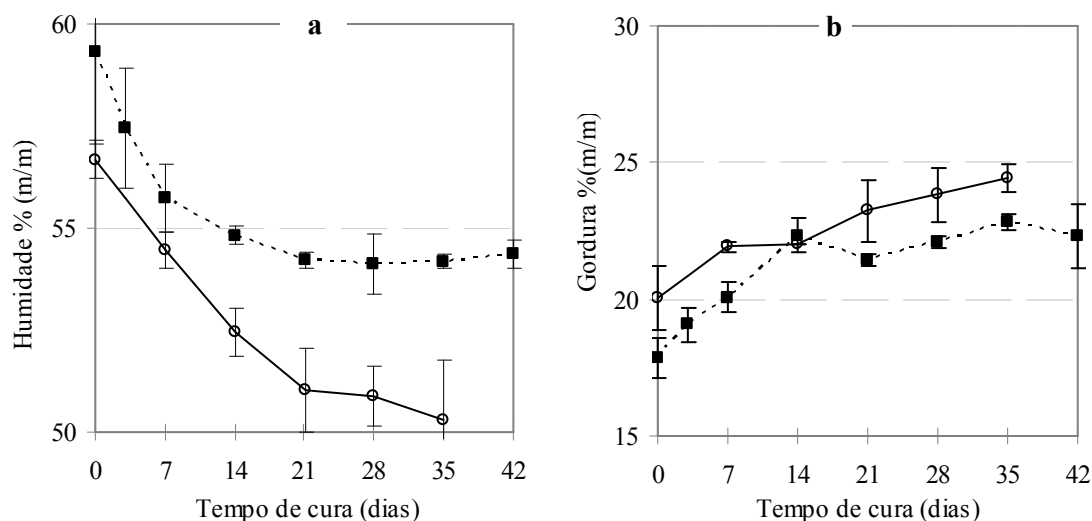


Figura 12 – Evolução dos valores médios da humidade (a) e da gordura (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (----■----) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Quanto às fracções azotadas (Figura 13) observou-se, como era de esperar, uma evolução muito significativa ao longo da cura: no final da cura os valores de NSA% e NNP% eram cerca de duas vezes superiores aos iniciais. Já os valores de NA% apresentaram-se seis vezes superiores.

O valor de NSA%, normalmente designado por coeficiente de maturação, registou um aumento acentuado e significativo nos primeiros dias de cura, nomeadamente nos primeiros 14 dias para o produtor A e 21 dias para o produtor B (Figura 13). Neste período de tempo assistiu-se à primeira manifestação da proteólise, com o aparecimento da fracção solúvel (Jovita, 1991). A partir do 21º dia, o aumento em azoto solúvel, e respectivo coeficiente de maturação, ficou limitado pela diminuição de humidade e pela escassez de substrato para as enzimas, deixando de apresentar diferenças significativas na maioria dos casos. Em relação aos valores médios de fracção de azoto não proteico, observou-se uma fase de estabilidade inicial, ou até de decréscimo, como foi o caso observado no produtor B, e depois uma fase de aumento a partir do 7º dia de cura.

Comportamento semelhante foi observado para os valores médios da fracção de azoto aminoacídico. No entanto, na fase inicial, observou-se um ligeiro aumento dos valores, mas com um declive baixo, tendo estes valores aumentado acentuadamente a partir do 21º dia de cura.

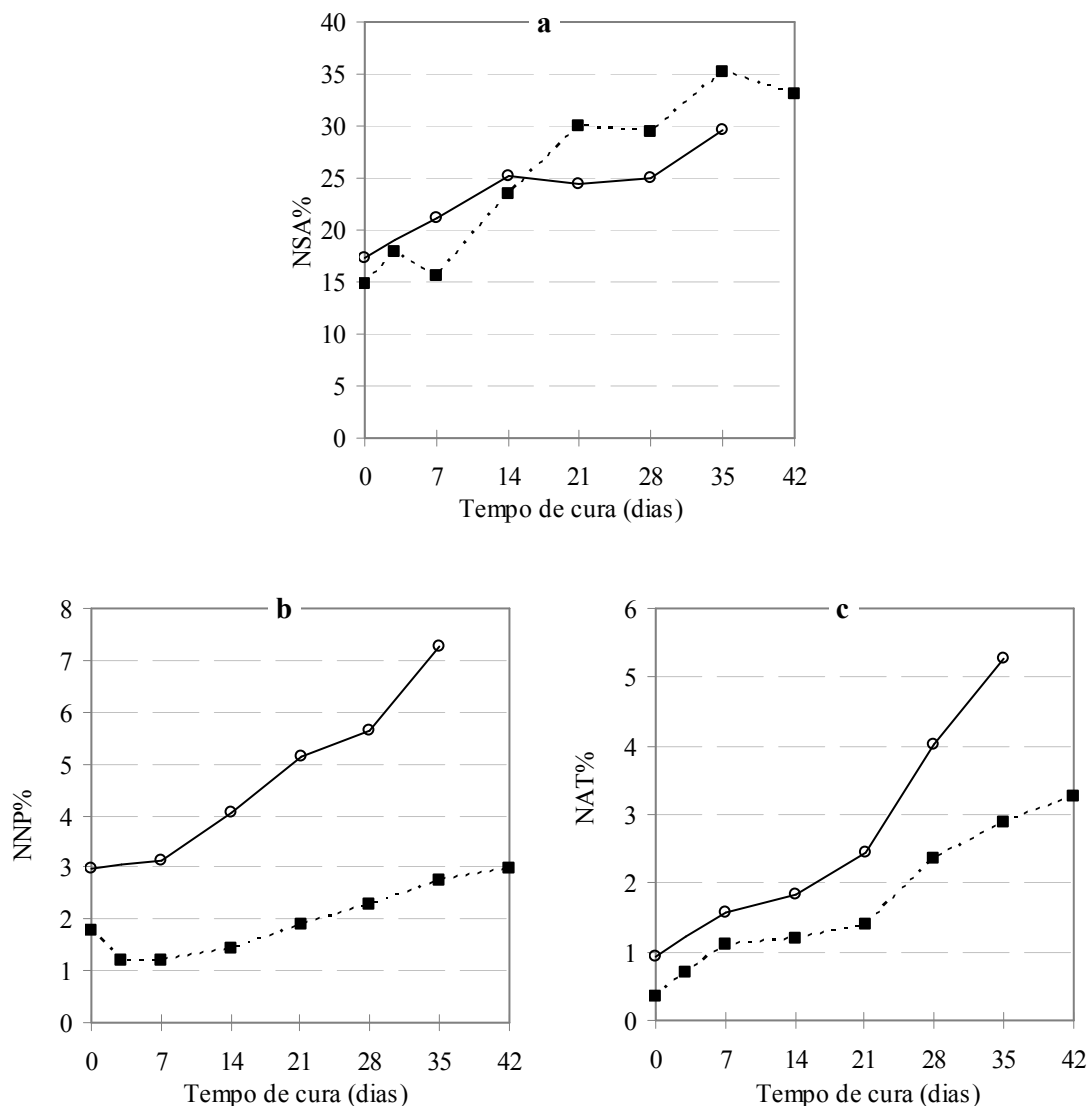


Figura 13 – Evolução dos valores médios das fracções NSA% (a) NNP% (b) e NA% (c) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (----■----) durante a cura.

Como já foi referido, a fracção não proteica e aminoacídica representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto estão, as proteínas e os péptidos, a ser degradados. As amostras do produtor A eram mais hidrolisadas, à partida, do que as do produtor B, pois apresentavam grau de profundidade da proteólise superior. Para além disso, a evolução do processo de proteólise também foi mais acelerada no produtor A do que no produtor B. Estas diferenças experimentais, observadas nas amostras dos diferentes produtores, revelaram-se importantes para entender as diferenças na evolução do processo de amolecimento dos queijos, quando são conjugadas com a evolução dos parâmetros estruturais.

De referir que o fabrico de queijo, sendo um processo predominantemente bioquímico, não se pode dividir em fases completamente estanques, existindo alguma continuidade e sobreposição nos processos. Com a observação das diferenças entre as taxas de amolecimento e de proteólise, pôde-se deduzir que os queijos obtidos no produtor A já se encontravam em processo de proteólise no início da cura, ao contrário dos queijos provenientes do produtor B, em que se notou uma fase latente, nítida nos resultados de azoto não proteico (Figura 13b). Esta fase latente também se observou no perfil de acidez para o produtor B (Figura 14a) e pode ser uma das justificações para o facto da pasta das amostras do produtor B ter um atraso no processo de amolecimento (Tabela 4, Figura 9, Figura 10 e Figura 11).

No início do estudo (0 dias), as amostras de queijo provenientes de ambos os produtores apresentavam indicadores estruturais semelhantes (Figura 11). No entanto, é evidente um atraso no processo de maturação das amostras do produtor B. Este atraso pode ser explicado pelos valores elevados de taxa de secagem apresentados nas amostras deste produtor (Figura 12a: -0,51% de humidade por dia no produtor B, contra -0,31% de humidade por dia no produtor A). Este atraso foi ainda apoiado, durante a primeira semana de cura, pelo decréscimo inicial no indicador de proteólise, NNP%, evidente na Figura 13b para o produtor B.

Roseiro *et al.* (2003a), que estudaram queijos de ovelha de pasta semi-mole, encontraram uma dependência da proteólise em relação ao processo de produção. Esta diferença pode também ser explicada pelo facto de as dinâmicas de maturação dos queijos de ovelha, obtidos a partir de leite cru, dependerem da qualidade do leite, nomeadamente da qualidade e quantidade de microrganismos e enzimas nativas (Tavaria *et al.*, 2006).

Na Figura 14 pode-se observar a evolução dos valores médios de acidez e pH ao longo da cura. A acidez aumentou desde o 1º dia de cura até ao 14º dia (produtor A), e até ao 21º dia (produtor B), seguida de um ligeiro decréscimo até ao final da cura, na maioria dos casos com diferenças significativas. A subida da acidez foi muito evidente entre o 7º e o 14º dia, o que se pode explicar pelo desenvolvimento intenso de bactérias acidificantes nesta fase e pela conversão da lactose residual em ácido láctico (Lawrence *et al.*, 1987).

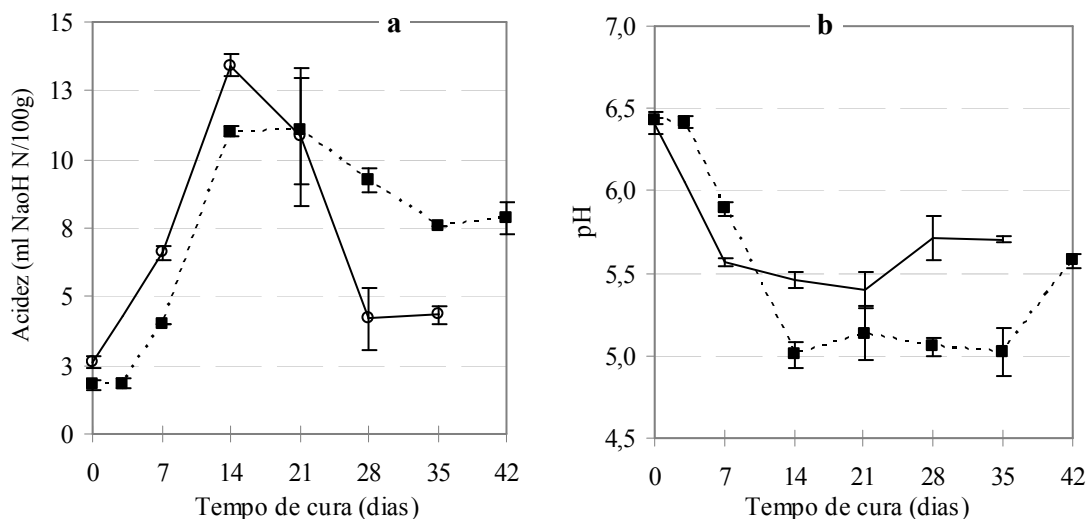


Figura 14 – Evolução dos valores médios da acidez (a) e do pH (b) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (----■----) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

No final da cura observou-se um decréscimo da acidez, também com diferenças significativas, que pode ser atribuída à utilização do ácido láctico, com formação de produtos neutros ou alcalinos (McSweeney e Fox, 1993; Watkinson *et al.*, 2001).

Como era de esperar, os valores de pH evoluíram de forma idêntica, mas oposta. No final da cura o pH médio, registado, foi de 5,6 no produtor A e 5,7 para o produtor B, e estes dados estão de acordo com os obtidos noutros estudos sobre queijo Serpa (Alvarenga, 2000; Canada, 2001). O decréscimo inicial dos valores de pH deveu-se à fermentação da lactose do queijo, com formação de ácido láctico e foi importante para prevenir o crescimento de bactérias patogénicas. O valor mínimo de pH médio observado nas amostras de ambos os produtores (Figura 14b) foi diferente. O valor mínimo de pH foi superior em amostras de queijo provenientes do produtor A (pH 5,4), do que nas amostras de queijo provenientes do produtor B (pH 5,1). Apesar disso, os valores de pH observados nas amostras de ambos os produtores, no final da cura, foram semelhantes. Com o abaixamento dos valores iniciais de pH, observou-se uma redução significativa do comportamento elástico da estrutura do material, observando-se uma subida no módulo conservativo e na dureza. Repare-se que o perfil de evolução de pH (Figura 14b) foi o que mais se assemelhou ao perfil da evolução das propriedades estruturais (Figura 11). A partir destes resultados, não se pode dissociar o amaciamento ocorrido na pasta ao longo da cura, do abaixamento de pH. Deve-se lembrar que, com o abaixamento de pH, há uma perda de fosfato de cálcio coloidal, conhecida como

desmineralização das sub-micelas, causando um enfraquecimento das ligações da rede proteica e a progressiva dissociação das sub-micelas, em agregados de caseína mais pequenos (Ramkumar *et al.*, 1998; Boutrou *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2004)

A partir da informação obtida nas figuras acima referidas, podemos reforçar a hipótese que o amolecimento destes queijos se deve aos efeitos simultâneos da actividade proteolítica, associada a uma desmineralização das micelas causada pelo abaixamento de pH. Para apoiar esta hipótese, determinaram-se as correlações e o nível de significância entre os indicadores estruturais (dureza e módulo conservativo), os indicadores de proteólise (NNP% e NA%), o pH, a humidade e a acidez (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados das correlações (*r*) e valores de significância (*P*) entre o módulo conservativo e a dureza em relação à humidade, ao pH, à acidez, e aos indicadores de proteólise (NNP% e NA%).

	Módulo conservativo (Pa)		Dureza (N)	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Humidade % (m/m)	0,724	0,042	0,682	0,063
NNP%	-0,836	0,010	-0,921	0,001
NA%	-0,788	0,020	-0,878	0,004
Acidez (ml NaOHN/100g)	-0,759	0,029	-0,639	0,088
pH	0,767	0,026	0,654	0,079

Nota: para a determinação das correlações usaram-se as amostras do produtor B, pois foi neste que se utilizaram maior número de pontos de amostragem, valorizando o ensaio de correlações.

O módulo conservativo apresentou valores de correlações significativas com todos os parâmetros estudados ($P < 0,05$). No entanto, o parâmetro que apresentou correlação mais significativa com o módulo conservativo foi a percentagem de azoto não proteico: $r = -0,84$ e $P = 0,01$. A dureza apresentou correlações significativas apenas com os indicadores de proteólise. As correlações observadas entre os indicadores de proteólise e os indicadores estruturais apresentaram, como seria de esperar, valores negativos. A correlação mais elevada e mais significativa, menor valor de *P*, observou-se entre a dureza e o valor de NNP% (-0,92; 0,001).

A correlação entre a humidade e o módulo conservativo foi significativa ($P < 0,05$). No entanto, o sinal desta é contrário ao que seria espectável se houvesse influência do processo de secagem nas propriedades estudadas. Ou seja, se as alterações estruturais

fossem influenciadas pelo processo de secagem, seria espectável uma correlação significativa e negativa entre a humidade e o módulo elástico, e entre a humidade e a dureza. Isto significa que o efeito endurecedor da secagem, na estrutura do queijo, foi mascarado pelo efeito amaciador da proteólise e do pH. Como veremos, estes resultados serão apoiados pela análise em componentes principais.

Os resultados médios da avaliação da cor da pasta das amostras de queijo podem ser observados na Figura 15.

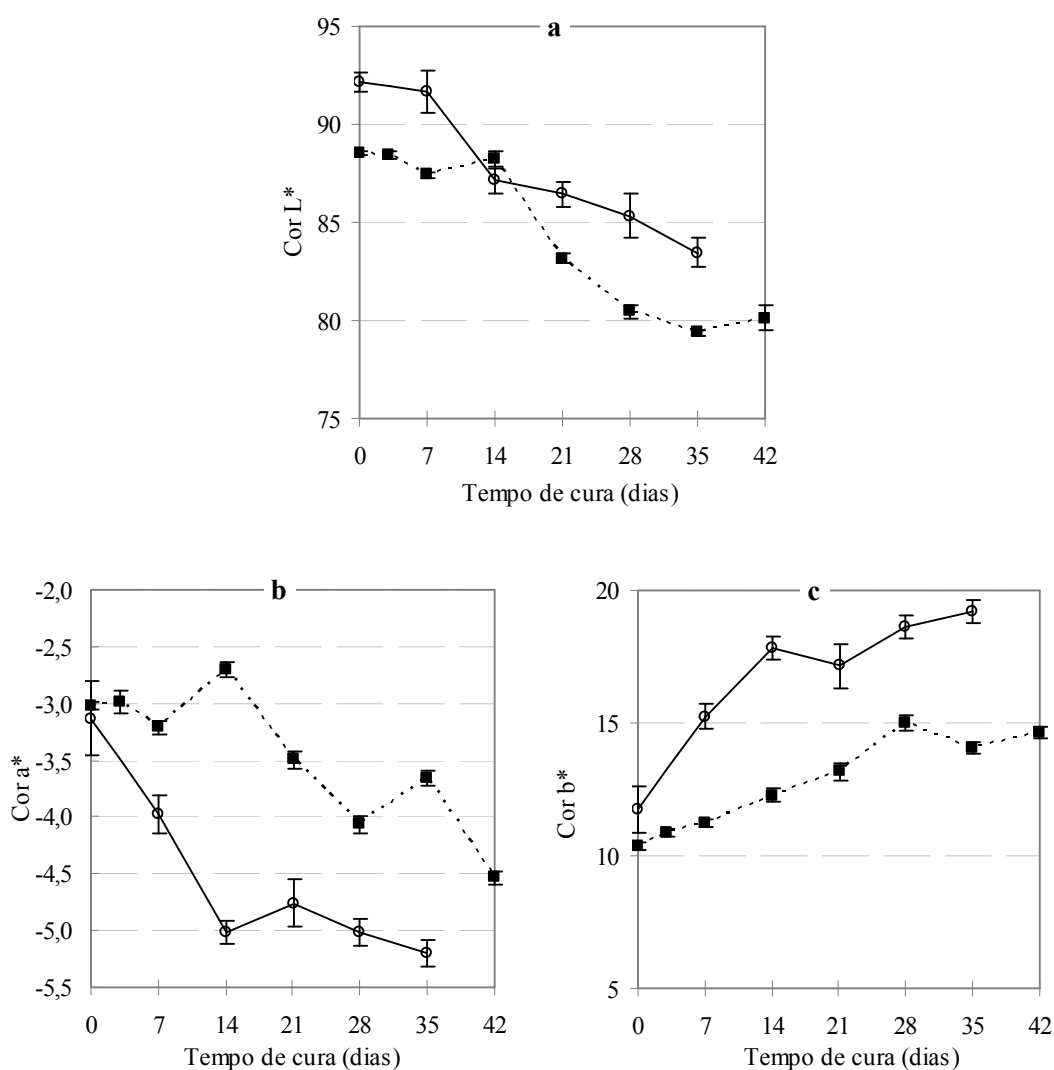


Figura 15 – Evolução dos valores médios dos parâmetros de cor L* (a), a* (b) e b* (c) nas amostras do produtor A (—○—) e do produtor B (----■----) durante a cura. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Nos parâmetros de cor, os valores de L* e de a* diminuíram, enquanto que os valores de b* aumentaram, tendo-se observado diferenças significativas ($P < 0,05$) para a

generalidade dos valores. A luminosidade variou de valores à volta dos 90 para valores próximos de 80 (dependendo do produtor), o valor de a^* decresceu de cerca de -3 para cerca de -5 (dependendo do produtor) e os valores médios de b^* aumentaram de 12 para 19 no produtor A e de 10 para 15 no produtor B. Assim, ao longo da cura, as amostras tornaram-se mais escuras, mais amarelas e ligeiramente mais esverdeadas. Em termos gerais, os resultados médios de cor estão de acordo com os resultados encontrados noutros queijos portugueses (Pinho *et al.*, 2004).

4.3.2 – Análise em componentes principais

Para avaliar a evolução das propriedades das amostras ao longo da cura foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados de amostras de ambos os produtores, referentes a 13 atributos, nomeadamente: a humidade, o azoto total, o azoto solúvel em água, a gordura, o pH, os parâmetros de cor L^* a^* e b^* , a dureza, a adesividade, a coesividade, o G'_{1Hz} e a $\tan \delta_{1Hz}$. Na Tabela 6 apresentam-se os valores próprios e a extracção dos componentes principais.

Tabela 6 – Valores próprios e extracção dos componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	8,37	64,41	8,37	64,41
2	1,88	14,46	10,25	78,87
3	0,93	7,17	11,19	86,05
4	0,78	5,98	11,96	92,03
5	0,38	2,96	12,35	94,99
6	0,23	1,77	12,58	96,76
7	0,14	1,07	12,72	97,83
8	0,09	0,69	12,81	98,52
9	0,08	0,60	12,89	99,12
10	0,06	0,48	12,95	99,60
11	0,02	0,19	12,97	99,79
12	0,02	0,13	12,99	99,92
13	0,01	0,08	13,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 78,9% da variância: 64,4% para o primeiro componente e 14,5% para o segundo. Só estes componentes foram

significativos, uma vez que são os que apresentaram valor próprio superior a 1. Estando em análise 13 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 13 atributos são transformados em 13 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por terem valor próprio superior a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 8,4 e o segundo valor próprio 1,9.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 7).

Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Humidade % (m/m)	-0,866*	-0,284
Azoto total % (m/m)	0,831*	0,342
Azoto solúvel em água % (m/m)	0,916*	-0,316
Gordura % (m/m)	0,903*	0,143
pH	-0,646	0,321
Cor L*	-0,635	0,701*
Cor a*	-0,840*	-0,350
Cor b*	0,893*	0,395
Dureza (N)	-0,907*	-0,189
Adesividade (-N.mm)	0,414	-0,731*
Coesividade	0,585	-0,345
Módulo conservativo _{1Hz} (Pa)	-0,909*	0,006
Tangente dissipativa _{1Hz}	0,889*	-0,029

* correlações significativas ($r > 0,7$).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso, pela humidade, cor a*, dureza e módulo conservativo _{1Hz} (com valores de correlação negativos) e pelo azoto total, azoto solúvel em água, gordura cor b* e tangente dissipativa _{1Hz} (com valores de correlação positivos). O 2º componente principal, CP2, é explicado pela cor L* (com valor de correlação positivo) e pela

adesividade (com valor de correlação negativo). Assim, na Figura 16 pode-se observar a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes. Repare-se que a humidade foi o parâmetro que se apresentou mais próximo dos parâmetros estruturais (dureza e módulo conservativo). À primeira vista poderia significar que a humidade teve influência na evolução da estrutura da pasta. No entanto, para isto ter acontecido, a humidade teria que se encontrar no lado oposto à dureza e ao módulo conservativo no eixo CP1, uma vez que a água tem propriedades plastificantes (Oliveira *et al.*, 1999) e, a diminuição de humidade por secagem, provocaria um aumento das propriedades elásticas, mantendo os outros factores.

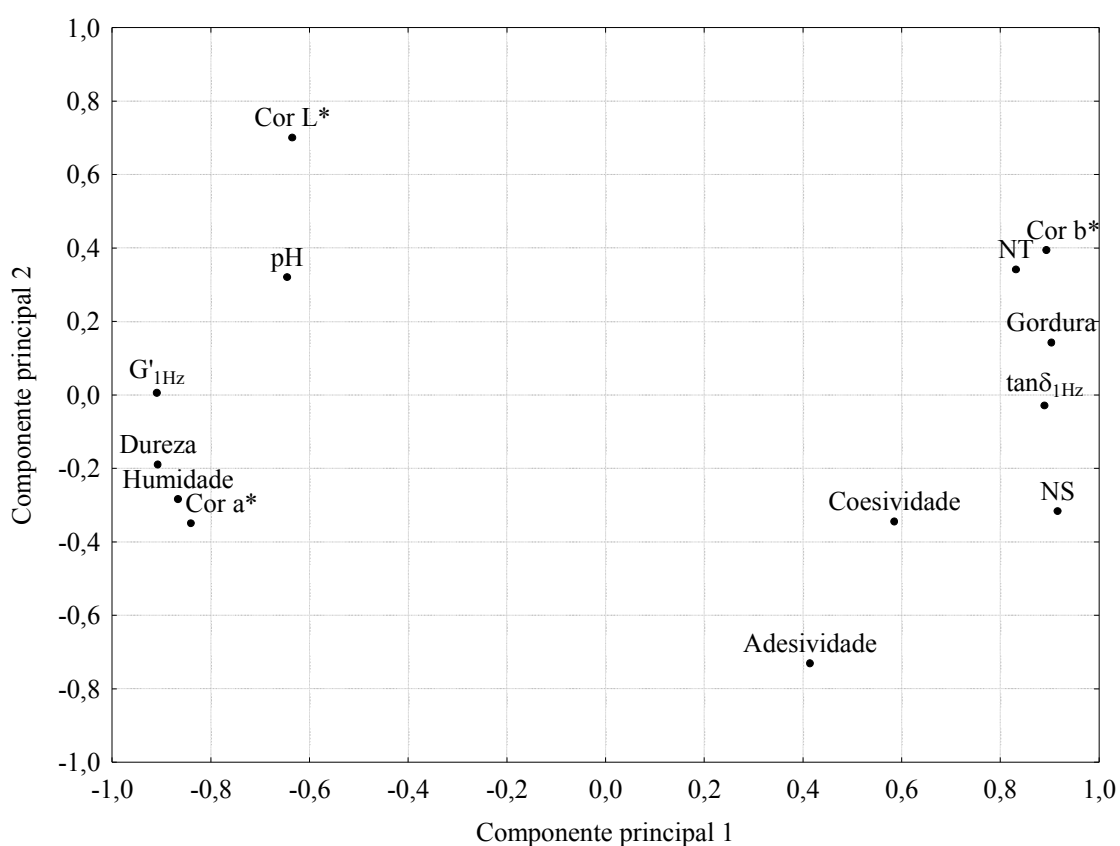


Figura 16 – Distribuição dos atributos no plano principal.

O facto da humidade ser explicada pelo mesmo eixo que a dureza e o módulo conservativo e se encontrar do mesmo lado do eixo significa que, durante o período de cura, o efeito da humidade nas propriedades estruturais não se fez sentir. A apoiar estes resultados, encontram-se correlações com sinal positivo entre a humidade e os parâmetros estruturais, exibidos na Tabela 5, conforme discutido anteriormente. Ambos os resultados observados nestas duas análises não poderiam ocorrer, caso o efeito da

humidade, nas propriedades estruturais, prevalecesse aos efeitos simultâneos da proteólise e da descida do pH. Se tal ocorresse, a humidade teria de estar do lado oposto à dureza e ao módulo conservativo e a correlação entre a humidade e o módulo conservativo teria que ser negativa.

Pelo contrário, o facto do azoto solúvel se encontrar próximo da tangente dissipativa e do pH se encontrar próximo do módulo conservativo, quer dizer que estes dois parâmetros influenciam as propriedades estruturais. Ao contrário do que sucede com a humidade, a localização do pH e do azoto solúvel, no plano principal, é a esperada pelos efeitos do pH e da proteólise já discutidos anteriormente.

Na Figura 17 podemos observar a projecção das amostras dos dois produtores (A e B) no Plano principal.

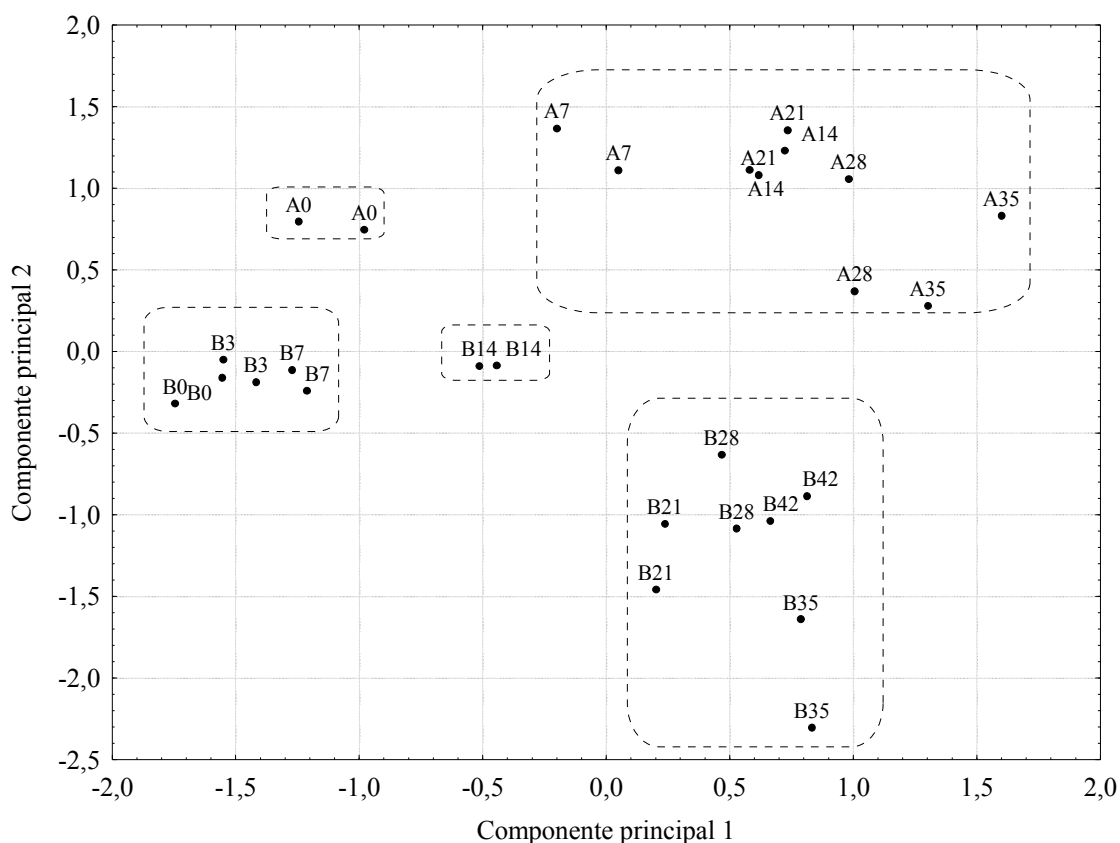


Figura 17 – Projecção das amostras no plano principal (0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura; produtores A e B).

Para o agrupamento das amostras, foi usado o método de classificação aglomerativa hierárquica, "Cluster Analysis", com uma distância de ligação entre amostras de 0,7, como se pode observar na Figura 18.

A partir dos resultados obtidos na projecção das amostras no plano principal (Figura 17), constatou-se que o componente principal 2 (explicado pela cor L* e pela adesividade) separou as amostras dos dois produtores. Assim, estes foram os principais parâmetros que permitiram fazer a diferenciação entre os produtores. Pode-se referir que as amostras provenientes do produtor A são, em termos gerais, mais luminosas e menos adesivas, quando comparadas com as do produtor B.

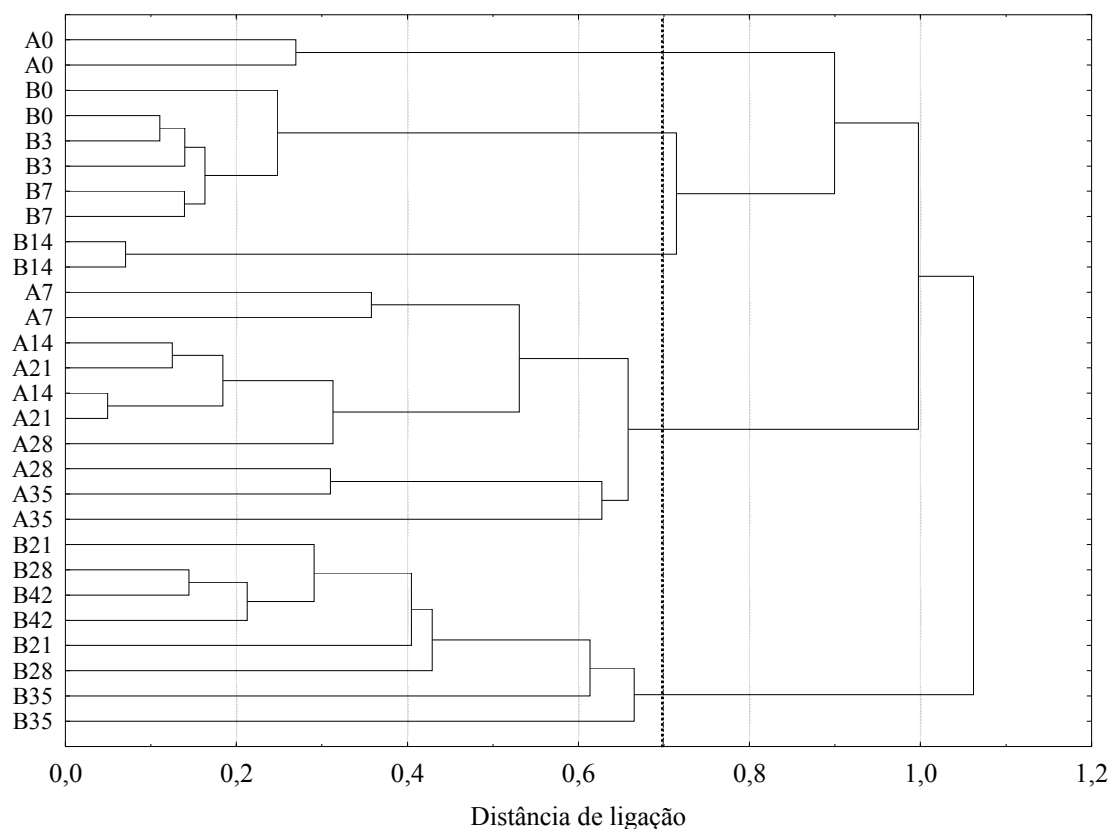


Figura 18 – Dendrograma das amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cura; produtores A e B).

O componente principal 1, justificado pelos parâmetros estruturais, parâmetros cromáticos a* e b*, pH e proteólise, teve capacidade de separar as amostras com diferentes tempos de cura. Ao longo da cura, as amostras passaram do lado negativo deste eixo para o lado positivo, significando que se foram tornando menos elásticas e duras, mais amarelas e mais esverdeadas. Como esperado, as amostras perderam humidade e concentraram os componentes estruturais (a proteína e a gordura). Estas observações são concordantes com a análise de variância que foi apresentada no subcapítulo anterior.

As principais alterações observadas nas amostras tiveram lugar durante a primeira fase da cura: nos primeiros 14 dias para o produtor A e nos primeiros 21 dias para produtor B. Esta dinâmica de maturação abrandou progressivamente até ao final da cura. Isto pode ser deduzido a partir das distâncias observadas entre as amostras (Figura 17), em que se observaram distâncias elevadas entre estas na primeira fase da cura: dos 0 aos 14 dias para o produtor A e dos 0 ao 21 dias no produtor B, e distâncias pequenas no final da cura. Esta elevada dinâmica de actividade bioquímica, observada na fase inicial de cura, pode ser explicada pelo facto deste queijo ser produzido a partir de leite cru, como referido anteriormente por outros autores (Rosenberg *et al.*, 1995; Awad, 2006) e por a flora microbiana não necessitar de uma fase tão prolongada de adaptação ao meio, quando comparada com queijos fabricados com auxílio de culturas de arranque.

4.3.3 – Estimativa do tempo de cura do queijo Serpa

Foi realizada uma análise de regressão linear múltipla (MLR), usando parâmetros químicos, de cor e reológicos, no sentido de se obter um modelo que possa ser usado na estimativa do tempo de cura do queijo Serpa (idade do queijo). Os dados demonstraram que o tempo de cura pode ser estimado com 8 variáveis: NSA%, NA%, pH, cor a*, cor b*, $\tan \delta_{1Hz}$, $\log \alpha$ e b. No sentido de avaliar a qualidade do ajuste, obteve-se uma representação gráfica do tempo de cura observado vs tempo de cura previsto (Figura 19).

A estimativa do tempo de cura, a partir de regressão linear múltipla, foi usada para outros queijos de ovelha, baseando-se noutros parâmetros, como a quantificação das fracções proteicas, nomeadamente α_{S1} -caseína e α_{S1} -I péptido. Este modelo de determinação do tempo de cura apresentou um erro estimado de 2,5 dias (Ferreira *et al.*, 2006) e foi o menor erro estimado encontrado. Quando se usaram parâmetros físicos, como a determinação instrumental da textura e da cor, obteve-se um modelo com erro estimado um pouco superior, de 4,2 dias (Pinho *et al.*, 2004). No entanto, quando se usaram apenas parâmetros físico-químicos, como a humidade, o a_w e o pH, o erro estimado foi ainda superior (11,9 dias) (Poveda *et al.*, 2004b). No presente ensaio, a combinação das propriedades químicas, de cor e propriedades reológicas, permitiu um modelo com erro estimado de 1,7 dias e um valor de coeficiente de correlação ajustado (R^2) de 0,98 ($P < 0,0001$):

$$Rt = 218,9 + 0,92NSA\% + 8,1NA\% - 8,9pH - 11,4a^* - 4,7b^* - 7,8\log \alpha - 123,9b - 130,5\tan \delta_{1Hz}$$

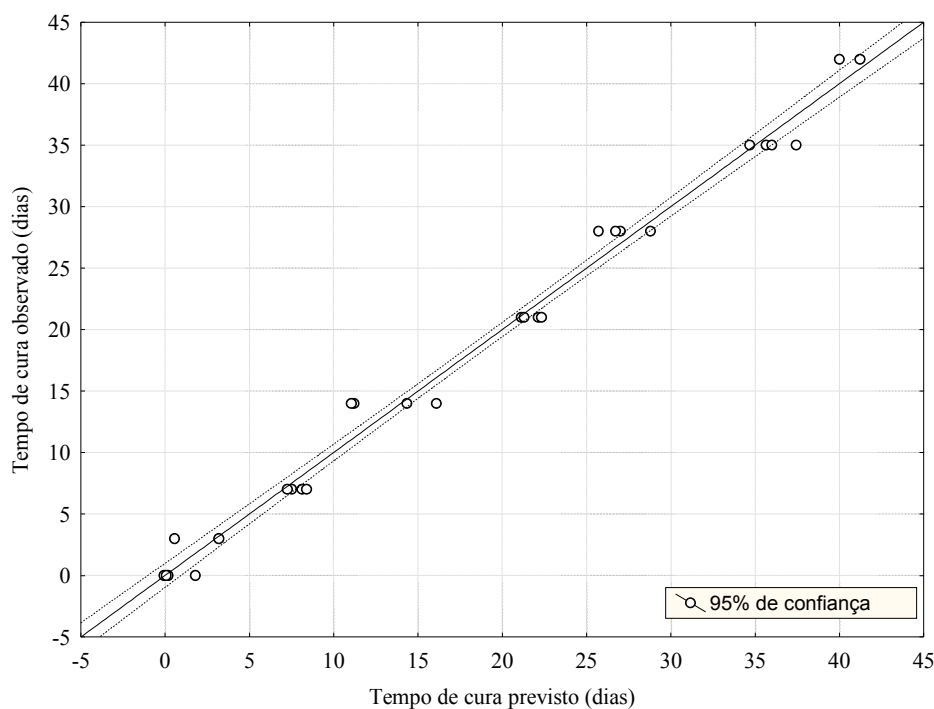


Figura 19 – Valores de tempo de cura observados vs valores previstos (MLR).

É importante referir que diferentes metodologias de selecção de variáveis podem conduzir a diferentes resultados (Draper e Smith, 1998). Para além disso, na produção de queijos de ovelha de pasta semi-mole, existem algumas diferenças em termos de metodologias e qualidade do leite, pelo que este modelo deve ser restrito apenas ao queijo Serpa e deve ser ajustado, se se desejar a sua aplicação a outros queijos de ovelha de pasta semi-mole. Esta equação deve ser aplicada apenas em amostras em que o tempo de cura previsto não exceda um mês e meio, não só porque não está validada a partir dos 42 dias, mas também porque a sua verdadeira utilidade está em saber se amostras desconhecidas têm um tempo de cura superior a 30 dias. Como se sabe, estes 30 dias são o mínimo exigido por lei e garantem a segurança deste alimento, como foi explicado anteriormente (2.3.2 – Queijos de ovelha e segurança alimentar)

4.4 – Conclusões

Com os resultados deste ensaio foram possíveis as seguintes conclusões:

- Na evolução dos espectros mecânicos ao longo do tempo de cura, observou-se a transformação das propriedades estruturais do queijo de ovelha de pasta semi-mole

ao longo desse processo: no início da cura observou-se uma estrutura relativamente forte comparável com um gel e um comportamento predominantemente elástico. No final da cura, a estrutura da pasta assemelhou-se a uma solução concentrada de macromoléculas com uma componente viscosa bastante acentuada.

- A dureza e o módulo conservativo à frequência de 1 Hz evidenciaram-se como ferramentas poderosas na monitorização da cura de queijos de ovelha de pasta semi-mole, por terem elevada capacidade de resposta à evolução das propriedades da pasta do queijo. Estas ferramentas não devem ser desprezadas em estudos de monitorização de cura, devendo acompanhar as outras ferramentas mais difundidas, como a evolução da fracção proteica.
- A partir da análise em componentes principais, observou-se que o efeito endurecedor, devido à secagem ao longo da cura, não se fez sentir, i.e., a secagem não teve influência na evolução das propriedades estruturais do queijo ao longo da cura. Pelo contrário, observou-se uma importância fundamental do efeito amaciador da proteólise e do abaixamento de pH. Durante as 2-3 primeiras semanas de cura ocorreu uma forte evolução das propriedades dos queijos e, a partir da terceira semana, as amostras começaram a estabilizar e a apresentar propriedades semelhantes às propriedades finais.
- A evolução da dureza e do módulo conservativo que, como se viu, são parâmetros altamente correlacionados entre si ($r = 0,961$, $P < 0,0001$), mostraram 3 fases distintas ao longo do processo de cura.

No início, durante um período muito curto, há um ligeiro aumento da dureza de 15 para 20 N (facto que só foi detectado nos queijos de um dos produtores), devido à desidratação da pasta. Em seguida, assiste-se uma redução mais prolongada para 5 N, devido aos efeitos da proteólise e da redução do pH, estabilizando durante um determinado período de tempo, dependente do queijo. Em estudos anteriores, verificou-se que, se prolongarmos muito esta fase subjacente à estabilização da dureza, começa a observar-se um ligeiro endurecimento devido à desidratação (Alvarenga, 2000). Interessa por isso evitar este processo de desidratação para que não haja perda das características de macieza da pasta e de valor comercial pela perda de peso.

- Como estes queijos são muito apreciados pela macieza da pasta, logo que as propriedades físicas, químicas e de “flavour” dos queijos estejam estabilizadas, estes devem ser conservados, para evitar que se observe um endurecimento da pasta com implicações negativas no respectivo valor económico. Existem duas estratégias possíveis no que se refere à conservação: a refrigeração e a congelação. A refrigeração apresenta inconvenientes de desidratação, endurecimento e aparecimento de bolores. Portanto, para períodos de tempo mais dilatados, que permitem a regularização da oferta no mercado, aconselha-se a congelação. Como o impacto da congelação nas propriedades deste produto, bem como a optimização deste processo, não estão devidamente estudados, foram fixados como objectivos para os ensaios seguintes deste trabalho.
- Quanto à cor dos queijos, observou-se que ao longo da cura, as amostras tornaram-se mais escuras, mais amarelas e ligeiramente mais esverdeadas.
- Foi estabelecido um modelo para estimar o tempo de cura do queijo Serpa a partir de três parâmetros químicos, dois parâmetros de cor e três parâmetros reológicos, com um erro estimado de 1,74 dias, o valor de $R^2 = 0,99$, o valor ajustado de R^2 é 0,98 ($P < 0,0001$):

$$R_t = 218,9 + 0,92NSA\% + 8,1NA\% - 8,9pH - 11,4a^* - 4,7b^* - 7,8\log \alpha - 123,9b \\ - 130,5\tan \delta_{1Hz}$$

Este modelo poderá ser um importante contributo a nível de segurança alimentar e deve-se aplicar em queijos que, por qualquer motivo, se pense não terem completado os 30 dias de cura.

CAPÍTULO 5 – “OPTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS DE CONGELAÇÃO DE QUEIJO DE OVELHA DE PASTA SEMI-MOLE” (ENSAIO 2)

Resumo

Neste ensaio foi efectuado o estudo da optimização do processo de congelação de queijo de ovelha de pasta semi-mole, obtido a partir de leite cru, tendo sido efectuado em queijo Serpa. Pretendeu-se fixar as condições de congelação de modo a que este processo cause o menor dano nas propriedades físicas e químicas do queijo. As variáveis estudadas foram: (a) fase da cura em que deve ser aplicado o processo de congelação, nomeadamente aos 28 dias, aos 35 e aos 42 dias; (b) tipo de congelação, sendo estudadas dois tipos: câmara de congelação e túnel de congelação e (c) temperatura de conservação, tendo-se estudado a temperatura de -10 °C ou de -20 °C. Em relação às propriedades químicas, com excepção dos indicadores de proteólise, não se registaram alterações significativas devidas à congelação. Quanto às propriedades físicas, estas alteraram-se de forma bastante significativa com a congelação. Na análise em componentes principais relativa aos atributos físicos, observou-se uma separação entre a amostra testemunha e as restantes amostras, que sofreram o processo de congelação, pelo segundo componente principal (CP2), o qual é explicado pelos parâmetros de cor. Isto significa que os danos causados pela congelação nas propriedades físicas do queijo são reflectidas, em grande parte, por alterações observadas na cor das amostras. Com este ensaio, pôde-se concluir que o processo de congelação foi mais eficaz quando se fez no final da cura (42 dias de cura) e quando as amostras se mantiveram conservadas a temperatura mais baixa (-20 °C). No que se refere à velocidade de congelação, não se observaram vantagens no processo de congelação mais rápido. A partir dos resultados deste estudo, recomenda-se que o processo de congelação seja aplicado no final da cura e que a temperatura de conservação seja de, pelo menos, -20 °C.

Palavras-chave: queijo, ovelha, congelação, reologia, textura, proteólise.

5.1 – Introdução

O processo de congelação é hoje prática corrente por parte de alguns produtores de queijo mas, na generalidade, aplica-se empiricamente, sem conhecimento dos respectivos efeitos, negativos ou positivos. A comercialização de queijos de ovelha, cabra e mistura, está muito afectada pela forte sazonalidade da produção de leite. Os mercados, interno e externo, ressentem-se muito deste tipo de descontinuidade, principalmente porque existe uma concorrência muito forte dos queijos de vaca industrializados que, devido à sincronização da produção de leite, não têm este problema.

A congelação é um procedimento aceitável para prolongar o tempo de vida útil comercial dos queijos, embora Fennema (1972) tenha referido que não há consenso em relação à extensão dos danos causados pela congelação. Os danos podem depender do tipo de queijo (composição e tecnologia de produção), condições de congelação/descongelação e mesmo dos parâmetros usados para os avaliar.

A congelação de queijos tem sido alvo de estudos desde o início do século XX. No entanto, esses trabalhos encontram-se dispersos, são em pequeno número e dedicados a um grupo muito restrito de queijos (Fennema, 1972). Este facto, combinado com o desenvolvimento de novas técnicas de congelação e de análise, levou à intensificação dos trabalhos de investigação nesta área nos últimos 15 anos, como já foi referido no capítulo 2.4.3 – Congelação de queijo.

Como na generalidade dos materiais, quando se arrefecem alimentos complexos a uma temperatura suficientemente baixa, estes sofrem uma transição física de segunda ordem conhecida por temperatura de transição vítrea (T_g) (Blanshard e Lillford, 1993). As moléculas são mantidas a níveis muito baixos de mobilidade, no estado amorfo, sem a ordem cristalina das substâncias puras. Manter um alimento neste estado tem muitas vantagens, sendo a principal o aumento da sua vida útil, devido ao retardamento das reacções químicas e biológicas, como resultado da imobilização das moléculas constituintes (Slade e Levine, 1991). A temperatura de transição vítrea é função da composição da matriz. A presença de pequenas moléculas, como água, aminoácidos e ácidos orgânicos, promove a mobilidade dos sistemas e diminui este valor. A temperatura de transição vítrea pode ser determinada por diferentes métodos, sendo a calorimetria de varrimento diferencial (DSC) um dos mais usados. O armazenamento de

queijos a temperatura inferiores à T_g garante mudanças mínimas a nível biológico, químico e estrutural, reflectindo-se na preservação dos atributos sensoriais de textura e “flavour” (Oliveira *et al.*, 1999).

Em Espanha, Canet *et al.* (1995) estudaram o impacto da congelação em queijos de ovelha Manchego, em condições muito controladas como, por exemplo, o uso de azoto líquido, e verificaram que não houve efeitos significativos nas propriedades texturais do queijo. No entanto, com o passar do tempo de conservação, as amostras foram apresentando alterações com diferenças significativas nas propriedades texturais. O tempo que as amostras estão armazenadas no estado congelado pode ser um factor decisivo no impacto deste processo relativamente à qualidade do produto. Prados *et al.* (2006), estudaram a influência da duração do processo de congelação de queijo Manchego (3, 6 e 9 meses) na sua composição, fracção azotada e análise sensorial, concluindo que as diferenças começaram a ser notórias ao fim de 9 meses de congelação. Por este motivo, julgou-se importante o estudo da influência do tempo de congelação nas propriedades físicas, químicas e sensoriais, que será objecto de estudo no próximo ensaio.

Neste ensaio, pretendeu-se otimizar o processo de congelação do queijo de ovelha de pasta semi-mole obtido a partir de leite de ovelha cru. Assim, pretendeu-se encontrar as condições de congelação de modo a que este processo cause o menor dano possível nas propriedades físicas e químicas do queijo. As variáveis do processo em estudo foram: (a) fase da cura a aplicar ao processo de congelação, nomeadamente aos 28 dias, aos 35 e aos 42 dias; (b) tipo de congelação, sendo estudadas dois tipos: câmara de congelação (-20 °C) e túnel de congelação (-30 °C, ventilação forçada) e (c) temperatura de conservação, tendo sido usadas as temperaturas de -10 °C e -20 °C.

5.2 – Material e métodos

5.2.1 – Delineamento experimental

Neste ensaio, foram usadas 33 amostras de queijo com cerca de 0,8 kg, provenientes do mesmo lote de fabrico, tendo-se optado por seleccionar o produtor B do ensaio anterior. Existiram dois motivos fundamentais para a escolha deste produtor para os ensaios de congelação: por um lado, os desvios padrão das amostras (final da cura) observados neste produtor foram inferiores, indicando que teve maior capacidade de produzir lotes

homogéneos. Por outro lado, o facto de a evolução dos processos de cura, neste produtor, ter sido mais lenta e equilibrada, como é característica de um processo em que as variáveis estão mais controladas.

O método de produção de queijo foi igual ao descrito no ensaio anterior (4.2.1 – Delineamento experimental).

Os processos de congelação (câmara de congelação e túnel de congelação) foram aplicados às amostras com diferentes tempos de cura: 28, 35 e 42 dias. Foram feitos ensaios preliminares quanto ao momento da cura a aplicar a congelação, e chegou-se à conclusão que esta não poderia ser feita no início da cura, uma vez que os queijos abriam fendas irreparáveis na estrutura. Assim, com a análise dos resultados do ensaio anterior, aplicou-se a congelação nas amostras com tempo de maturação igual ou superior a 28 dias, ou seja, o facto de as características estruturais da pasta estabilizarem a partir deste momento (Figura 11), reforçou a opção da congelação de amostras com 28, 35 e 42 dias de cura. Quanto ao tipo de congelação, foram usados dois processos diferentes, designados por câmara de congelação (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e por túnel de congelação (a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ventilação forçada). Quanto à temperatura de congelação (conservação) foram usadas duas temperaturas de congelação: a temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pois é uma temperatura muito usada em circuitos comerciais e a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por ser mais favorável à manutenção da qualidade do produto final.

Na Tabela 8 encontra-se o desenho experimental do ensaio 2, em que as amostras foram obtidas em triplicado, totalizando 33 amostras: o primeiro grupo de 3 amostras foi constituído por amostras consideradas testemunho (T), porque não foram sujeitas ao processo de congelação. Quanto às amostras que sofreram congelação ao fim de 28 dias de cura, foi obtido um grupo de 12 amostras, que foram sujeitas aos processos de câmara de congelação (-20°C) (L) e túnel de congelação ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, ventilação forçada) (R) e às temperaturas de conservação de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10) e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20). Assim, os grupos de amostras obtidas aos 28 dias codificaram-se do seguinte modo: 10R28, 20R28, 10L28 e 20L28. Quando as amostras completaram 35 dias de cura foi recolhido um grupo de 12 amostras e sujeitas aos processos de congelação descritos anteriormente, que se codificaram do seguinte modo: 10R35, 20R35, 10L35 e 20L35. Aos 42 dias de cura foi recolhido um grupo de 12 amostras, congeladas, e conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em grupos de 3, que se codificaram do seguinte modo: 10R42, 20R42, 10L42 e 20L42. De notar que,

devido a uma falha de energia, as amostras deste grupo congeladas a -10 °C foram excluídas do ensaio.

Tabela 8 – Plano de amostragem do ensaio 2.

Amostra	Tipo de Congelação	Temperatura de Congelação (°C)	Tempo de cura no momento da congelação	Código
1	na	na	na	T
2	na	na	na	T
3	na	na	na	T
4	Câmara	-20	42	20L42
5	Câmara	-20	42	20L42
6	Câmara	-20	42	20L42
7	Túnel	-20	42	20R42
8	Túnel	-20	42	20R42
9	Túnel	-20	42	20R42
10	Túnel	-10	35	10R35
11	Túnel	-10	35	10R35
12	Túnel	-10	35	10R35
13	Túnel	-20	35	20R35
14	Túnel	-20	35	20R35
15	Túnel	-20	35	20R35
16	Câmara	-10	35	10L35
17	Câmara	-10	35	10L35
18	Câmara	-10	35	10L35
19	Câmara	-20	35	20L35
20	Câmara	-20	35	20L35
21	Câmara	-20	35	20L35
22	Túnel	-10	28	10R28
23	Túnel	-10	28	10R28
24	Túnel	-10	28	10R28
25	Túnel	-20	28	20R28
26	Túnel	-20	28	20R28
27	Túnel	-20	28	20R28
28	Câmara	-10	28	10L28
29	Câmara	-10	28	10L28
30	Câmara	-10	28	10L28
31	Câmara	-20	28	20L28
32	Câmara	-20	28	20L28
33	Câmara	-20	28	20L28

na – Não aplicável, pois as amostras não foram congeladas para servirem de testemunho.

Neste ensaio não esteve em causa o tempo de congelação, mas sim entender quais as condições de congelação que levariam à optimização do processo de congelação. Neste sentido, foi definido um tempo de congelação suficientemente longo, cerca de 12 meses, para revelar eventuais defeitos nas propriedades das amostras sujeitas a processos de congelação mais desfavoráveis. Assim, as amostras foram produzidas durante o mês de

Abril, foram congeladas durante o mês de Maio e só em Abril do ano seguinte, foram descongeladas e analisadas.

Depois do período de congelação, as amostras foram descongeladas numa câmara de refrigeração, a 0 °C, durante 3 dias e, de seguida, lavadas com água. As amostras em que a cura tinha sido interrompida aos 28 e 35 dias de cura foram colocadas numa câmara, a 12 °C e humidade relativa de 85%, até perfazerem os 42 dias de cura (ou seja curaram mais 14 e 7 dias, respectivamente). As amostras que foram congeladas aos 42 dias de cura, foram descongeladas como se referiu anteriormente e, em seguida, analisadas.

As amostras foram transportadas para o laboratório em malas térmicas e as análises laboratoriais iniciaram-se no mesmo dia. A preparação da amostra consistiu na remoção de uma camada de queijo com 1 cm de altura, para expor uma superfície de pasta, permitindo a análise da cor, do pH e das determinações reológicas (ver Capítulo 3).

5.2.2 – Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos relativos às técnicas laboratoriais usadas neste ensaio encontram-se descritos no Capítulo 3. Para a caracterização química das amostras foram utilizados os seguintes parâmetros: pH, acidez titulável, azoto total, azoto solúvel em água, azoto não proteico, azoto aminoacídico, bem como parâmetros obtidos por cálculo indirecto, nomeadamente, resíduo seco, humidade referida ao queijo isento de gordura, azoto total no resíduo seco, percentagem de azoto solúvel em água ou coeficiente de maturação, percentagem de azoto não proteico, percentagem de azoto aminoacídico e gordura no resíduo seco. Na caracterização física determinaram-se os parâmetros de cor da pasta (L^* , a^* , e b^*), os parâmetros de textura (dureza, adesividade e coesividade) e os parâmetros viscoelásticos (módulo conservativo $G'_{1\text{Hz}}$, tangente dissipativa $\tan \delta_{1\text{Hz}}$, $\log \alpha$ e b).

5.2.3 – Análise estatística

Os parâmetros químicos e viscoelásticos foram realizados em triplicado, nos parâmetros de textura utilizaram-se 5 réplicas, enquanto que para a cor foram utilizadas 10 réplicas.

Para avaliar a qualidade dos resultados laboratoriais obtidos para cada um dos parâmetros foi usada estatística descritiva, ou seja, foi feita a determinação da média, do

desvio padrão, do erro padrão da média e do intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. Para comparar as amostras testemunho com as amostras que sofreram os diferentes processos de congelação foi utilizada a análise de variância a um factor (teste de Scheffé de comparação de médias) e análise em componentes principais. No caso da análise em componentes principais optou-se por fazer duas análises em separado: a primeira reunindo os parâmetros químicos e a segunda reunindo os parâmetros físicos. Para avaliar a proximidade entre as amostras testemunho e as amostras congeladas, no plano principal, foi usada a classificação aglomerativa hierárquica (“hierarquic clustering”). Na análise dos dados usou-se o “software” STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001).

5.3 – Resultados e discussão

5.3.1 – Impacto da congelação nas propriedades químicas do queijo

Os valores médios e desvios padrão, bem como os resultados da análise de variância referentes às propriedades químicas, para cada tipo de amostra, encontram-se na Tabela 9. Algumas das amostras congeladas apresentaram diferenças significativas nas suas propriedades químicas relativamente às amostras testemunho. No entanto, não se pôde observar qualquer tendência, à excepção das amostras congeladas aos 35 dias de cura, que apresentaram diferenças significativas na maioria dos parâmetros.

Essas diferenças foram encontradas, principalmente, nas amostras com 35 dias de cura, congelação rápida, conservadas a -10 °C e -20 °C. Nestas amostras, encontraram-se diferenças na humidade, no teor de azoto total, na gordura e nas fracções azotadas.

Tabela 9 – Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

	Amostras										
	T	20L28	10L28	20R28	10R28	20L35	10L35	20R35	10R35	20R42	20L42
Humidade % (m/m)	52,26 ^{bcd} (0,30)	53,08 ^{abc} (0,26)	51,99 ^{bcde} (0,77)	53,73 ^{ab} (0,69)	51,85 ^{bcde} (0,67)	53,08 ^{abc} (0,22)	51,41 ^{cde} (0,94)	54,43 ^a (1,92)	54,49 ^a (1,60)	50,85 ^{de} (0,40)	50,00 ^e (1,12)
Gordura % (m/m)	22,5 ^{ab} (0,35)	22,4 ^{ab} (0,99)	22,3 ^{ab} (0,43)	23,7 ^a (0,75)	22,3 ^{ab} (0,43)	22,4 ^{ab} (0,58)	22,1 ^{ab} (0,39)	22,8 ^{ab} (1,06)	22,9 ^{ab} (1,41)	22,3 ^{ab} (1,00)	21,3 ^b (1,66)
Azoto total % (m/m)	3,47 ^{bc} (0,124)	3,39 ^{bcd} (0,153)	3,52 ^b (0,058)	3,15 ^d (0,058)	3,26 ^{cd} (0,041)	3,21 ^d (0,026)	3,33 ^{bcd} (0,061)	3,51 ^b (0,117)	3,91 ^a (0,196)	3,56 ^b (0,190)	3,58 ^b (0,142)
Fracção NSA%	34,4 ^a (2,5)	34,2 ^a (3,8)	31,9 ^a (2,4)	29,9 ^{abc} (1,6)	34,4 ^a (2,0)	29,1 ^{abc} (2,1)	30,9 ^{ab} (2,8)	25,1 ^c (2,6)	25,8 ^{bc} (2,9)	30,5 ^{abc} (2,8)	32,7 ^a (4,2)
Fracção NNP%	2,25 ^g (0,107)	7,03 ^b (0,541)	8,30 ^a (0,566)	4,50 ^e (0,704)	5,96 ^{cd} (0,399)	5,15 ^{de} (0,534)	6,76 ^{bc} (0,590)	3,42 ^f (0,429)	4,32 ^{ef} (0,238)	5,06 ^{de} (0,430)	5,04 ^{de} (0,256)
Fracção NA%	3,73 ^{bcdef} (0,268)	3,29 ^{def} (0,340)	4,52 ^{abc} (0,127)	4,17 ^{abcd} (1,072)	3,79 ^{bcde} (0,890)	3,43 ^{cdef} (0,102)	4,98 ^a (0,164)	2,88 ^{ef} (0,640)	2,56 ^f (0,442)	4,90 ^{ab} (0,838)	4,37 ^{abcd} (0,298)
Acidez ml NaOH N /100g	7,5 ^a (0,66)	1,5 ^{bc} (0,18)	1,5 ^{bc} (0,27)	1,5 ^{bc} (0,20)	1,4 ^{bc} (0,21)	1,5 ^{bc} (0,15)	1,6 ^{bc} (0,22)	1,6 ^{bc} (0,24)	1,2 ^c (0,24)	1,9 ^b (0,27)	2,0 ^b (0,20)
pH	5,7 ^{abc} (0,065)	5,2 ^f (0,065)	5,4 ^e (0,053)	5,4 ^{de} (0,094)	5,5 ^{cde} (0,049)	5,6 ^{bcd} (0,140)	5,7 ^{abc} (0,052)	5,6 ^{bcd} (0,144)	5,7 ^{ab} (0,078)	5,8 ^a (0,035)	5,8 ^{ab} (0,092)

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 9$ (teste de Scheffé).

A comparação das amostras, no que se refere aos componentes maiores do queijo, humidade, gordura e azoto total, encontra-se na Figura 20. Da observação desta figura e da análise da Tabela 9, verifica-se que a maior parte das amostras congeladas não apresentaram diferenças significativas nestes parâmetros em relação às amostras testemunho.

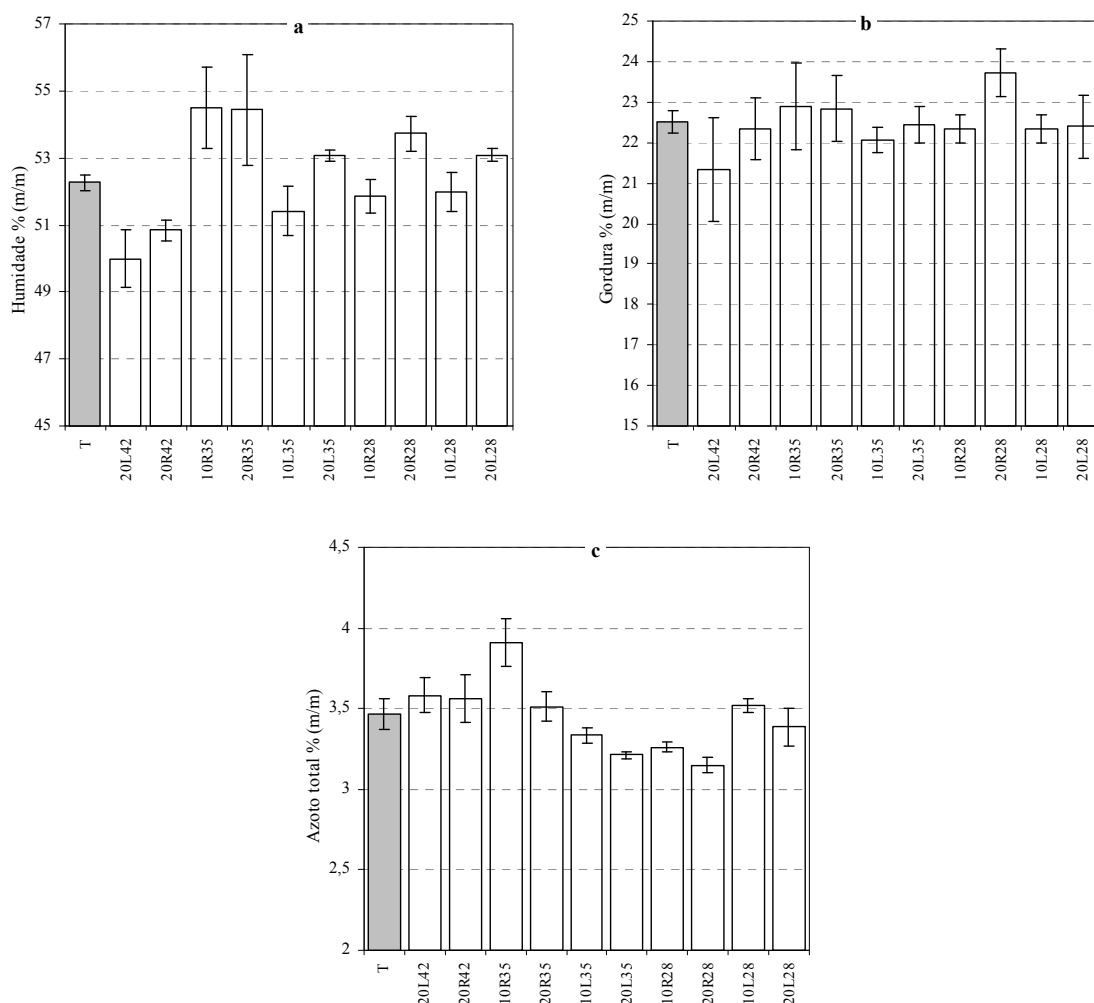


Figura 20 – Valores médios da humidade (a), gordura (b) e azoto total (c) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Em termos gerais, pode-se referir que, no que se refere aos componentes maiores do queijo, os queijos não foram afectados pela congelação. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos autores que estudaram o impacto da congelação nos componentes maiores do queijo (Ramos *et al.*, 1987; Verdini e Rubiolo, 2002a; Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005). Relativamente a estes três parâmetros, ao contrário do que seria de esperar, foi nas amostras submetidas ao processo de túnel de congelação que se

encontraram maiores diferenças. Nesta fase, não deve ser esquecido que se está na presença de amostras biológicas e que há uma variabilidade intrínseca muito grande, apesar de pertencerem ao mesmo lote de produção.

O pH das amostras congeladas não apresentou diferenças significativas em relação às amostras testemunho, à excepção das amostras congeladas aos 28 dias em câmara de congelação, que apresentaram um pH inferior à amostra testemunho. Estes dados poderão significar que a subida do pH, inerente à fase final da cura, pode ter sido dificultada nestas amostras em que a congelação foi efectuada numa fase mais prematura da cura.

Os valores médios das diferentes fracções azotadas para as amostras testemunho e para as amostras congeladas encontram-se na Figura 21.

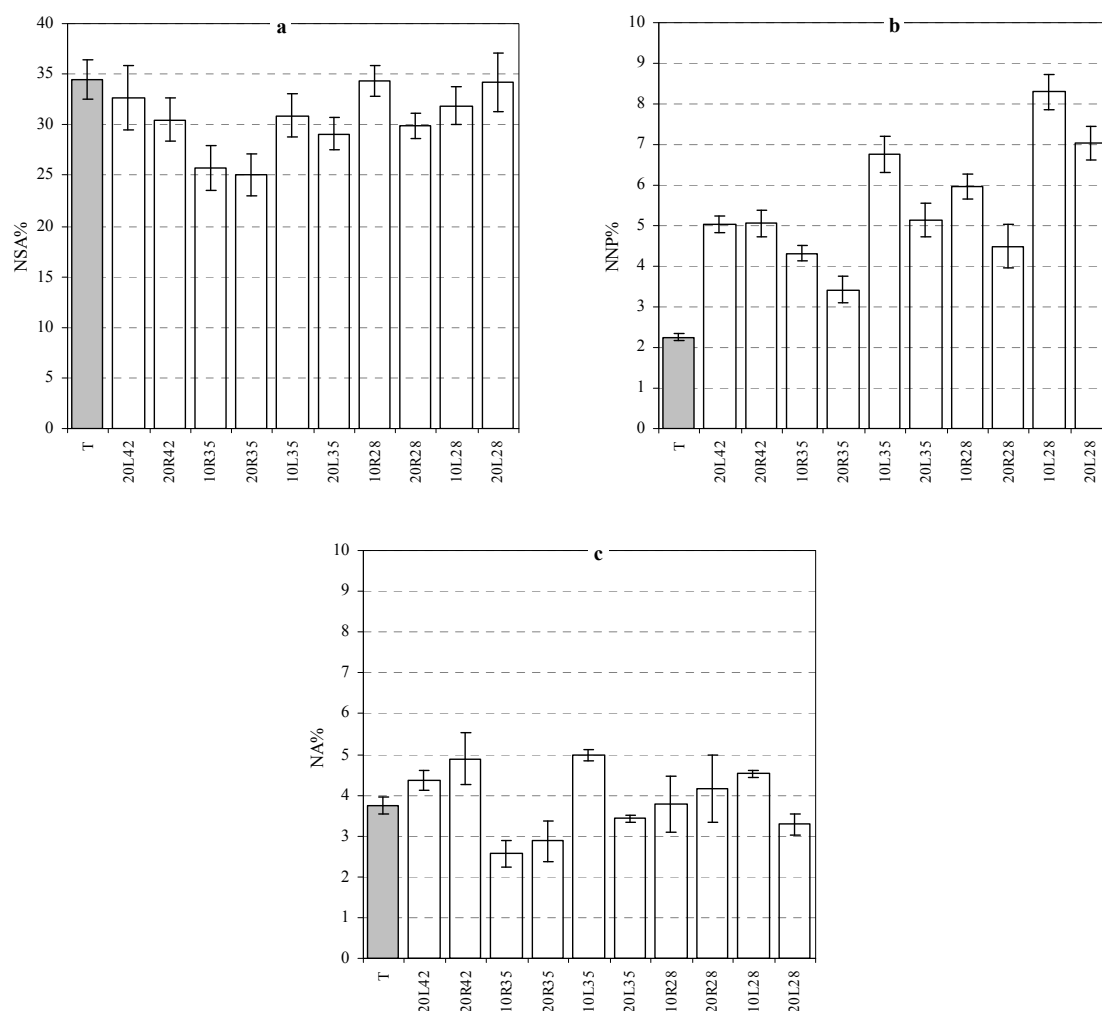


Figura 21 – Valores médios das fracções azotadas NSA% (a) NNP% (b) e NA% (c) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Com a análise das diferentes fracções azotadas, pretendeu-se verificar se as amostras mantiveram actividade enzimática durante a congelação, e que tipo de enzimas estiveram mais activas durante este período. Deve-se referir não ser linear que o facto de existir actividade enzimática se deva exclusivamente ao período em que as amostras estiveram congeladas, uma vez que o processo de congelação levou algumas horas (dependendo do tipo) e o processo de descongelação demorou 3 dias. Apesar de ser esperada actividade enzimática superior nestes períodos, também é evidente que se espera que esta actividade seja semelhante para todas as amostras.

Como já foi referido, a fracção NSA% representa a extensão da proteólise ou seja, apenas tem capacidade de medir a hidrólise de péptidos solúveis em água, independentemente da dimensão destes (Verdini *et al.*, 2005). As fracções NNP% e NA% representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto estão, as proteínas e os péptidos, a ser degradados.

Na Tabela 9 e na Figura 21a podemos observar que, na maior parte das amostras, não se verificaram diferenças significativa ($P > 0,05$) no que se refere à fracção de azoto solúvel em água, à semelhança dos resultados obtidos noutros estudos de congelação de queijo de ovelha (Tejada *et al.*, 2002).

No que se refere ao grau de profundidade da proteólise, observaram-se comportamentos diferentes em relação ao azoto não proteico (Figura 21b), quando comparado com o azoto aminoacídico (Figura 21c). Em termos gerais, todas as amostras congeladas apresentaram valores superiores, com diferenças significativas ($P < 0,05$), de azoto não proteico, quando comparadas com as amostras testemunho. Isto significa que, durante o processo que inclui congelação, armazenamento e descongelação, observou-se uma grande actividade proteolítica no que se refere à produção de péptidos. No entanto, no que se refere à produção de aminoácidos, as amostras congeladas apresentaram maior semelhança com as amostras não congeladas pois, em termos gerais, não apresentam diferenças significativas ($P > 0,05$).

O aumento do grau de profundidade da proteólise com a congelação indica que este processo não conseguiu impedir os mecanismos da proteólise. Estes continuam a acontecer, lentamente, à semelhança do que foi relatado na maior parte dos estudos que determinam o impacto da congelação na proteólise de queijos (Ramos *et al.*, 1987; Bertola *et al.*, 1996b; Tejada *et al.*, 2002; Verdini e Rubiolo, 2002a; Verdini *et al.*,

2003; Graiver *et al.*, 2004; Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2007). Este aumento nos valores das fracções azotadas pode ser explicado a partir dos danos provocados pelo aumento das dimensões de cristais de gelo durante a congelação, por um lado na rede proteica, por outro lado nas bactérias, promovendo a libertação de enzimas para o meio (Graiver *et al.*, 2004), ficando estas mais disponíveis para a actividade enzimática. Os resultados obtidos sugerem que as peptidases bacterianas e as aminopeptidases bacterianas continuaram activas, embora com uma actividade mais reduzida, durante o tempo de armazenagem no estado congelado, provocando um aumento gradual de oligo-péptidos, aminoácidos, aminas e amónia (Tejada *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2006). Este aumento está também relacionado com o facto de, durante a congelação, não haver crescimento microbiano e, conseqüentemente, estas substâncias não serem usadas como metabolitos (Prados *et al.*, 2006).

Para avaliar o impacto da congelação nas propriedades químicas das diferentes amostras foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP). Por haver uma quantidade de amostras muito elevada, optou-se pelo uso dos resultados médios de cada tipo de amostra, no sentido de ser mais fácil a análise visual dos gráficos das projecções. Nesta análise foram usados 7 atributos: a humidade, o azoto total, as fracções proteicas NSA%, NNP% e NA%, a gordura e o pH. Na Tabela 10 apresentam-se os valores próprios e a extracção dos componentes principais resultantes da análise efectuada.

Tabela 10 – Valores próprios e extracção dos componentes principais, obtida na ACP aos atributos químicos.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	3,03	43,28	3,03	43,28
2	1,92	27,37	4,95	70,65
3	0,97	13,87	5,92	84,52
4	0,68	9,70	6,60	94,22
5	0,32	4,51	6,91	98,72
6	0,07	1,02	6,98	99,75
7	0,02	0,25	7,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 70,7% da variância: 43,3% para o primeiro componente e 27,4% para o segundo. Só foram significativos os dois primeiros componentes, uma vez que só estes apresentaram valor próprio superior a 1. Estando em

análise 7 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 7 atributos são transformados em 7 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por terem valor próprio superior a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro tem valor próprio de 3,03 e o segundo com valor próprio 1,92. Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 11).

Tabela 11 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos químicos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Humidade % (m/m)	-0,94*	0,31
Azoto total % (m/m)	-0,25	-0,68*
NSA%	0,75*	0,32
NNP%	0,54	0,48
NA%	0,82*	-0,03
Gordura % (m/m)	-0,74*	0,42
pH	0,04	-0,92*

* - correlações significativas ($r > 0,7$).

Na Figura 22 pode-se observar a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

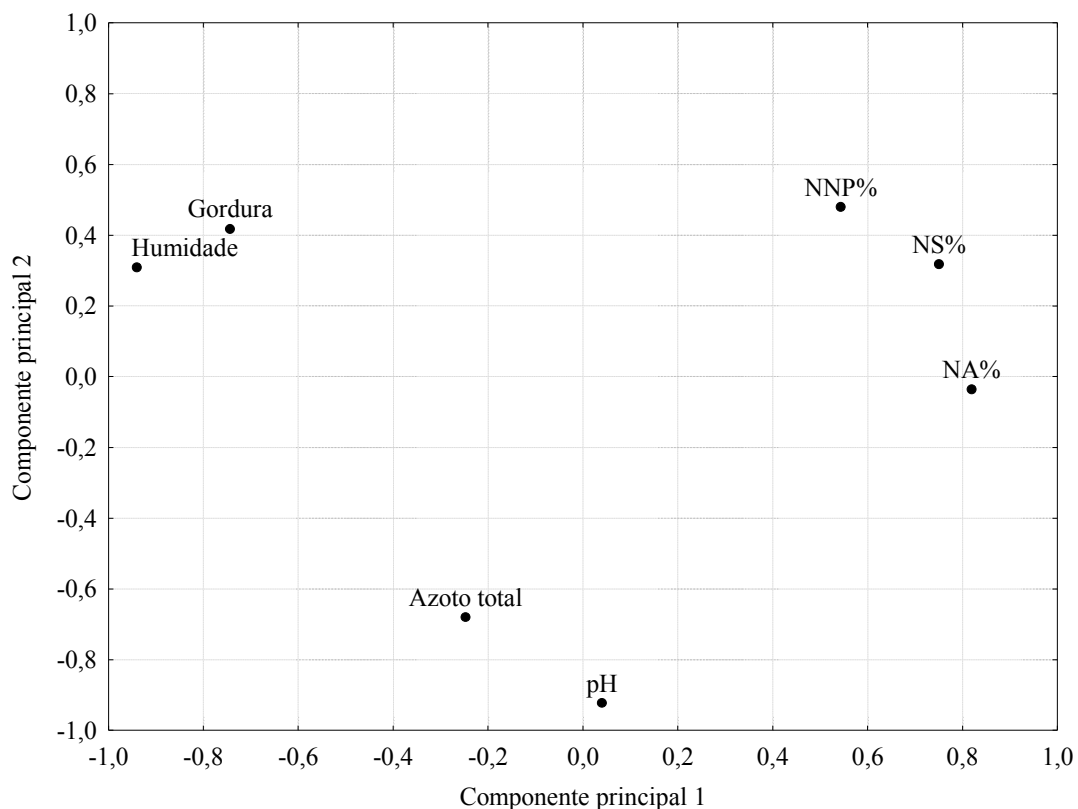


Figura 22 – Distribuição dos atributos químicos no plano principal.

O CP1 foi explicado, principalmente, pela humidade e a gordura (com valores de correlação negativos) e pelas fracções azotadas NSA% e NA% (com valores de correlação positivos). O componente principal CP2 é explicado pelo azoto total e pelo pH (com valores negativos).

Na Figura 23, podemos observar a projecção dos valores médios dos atributos no plano principal, constituído pelas duas primeiras componentes principais.

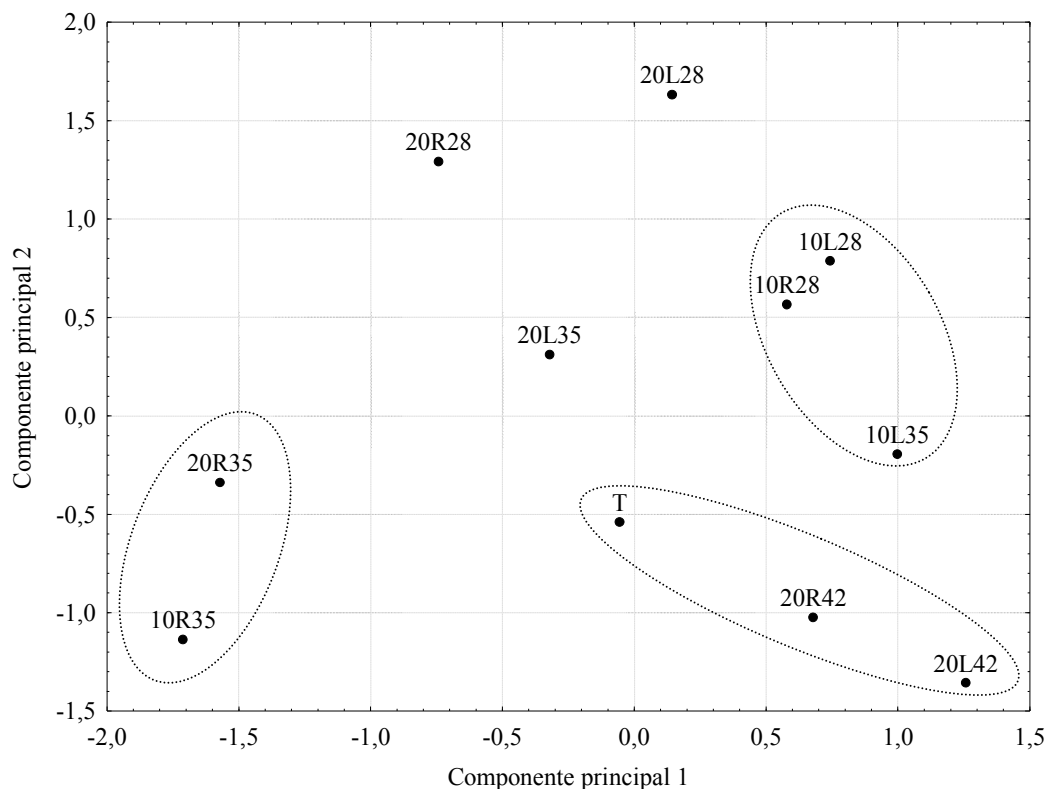


Figura 23 – Projecção das médias no plano principal (CP1 vs CP2)

Para o agrupamento das amostras, foi usado o método de classificação aglomerativa hierárquica "Cluster Analysis", com uma distância de ligação entre amostras de cerca de 0,9 como se pode observar na Figura 24.

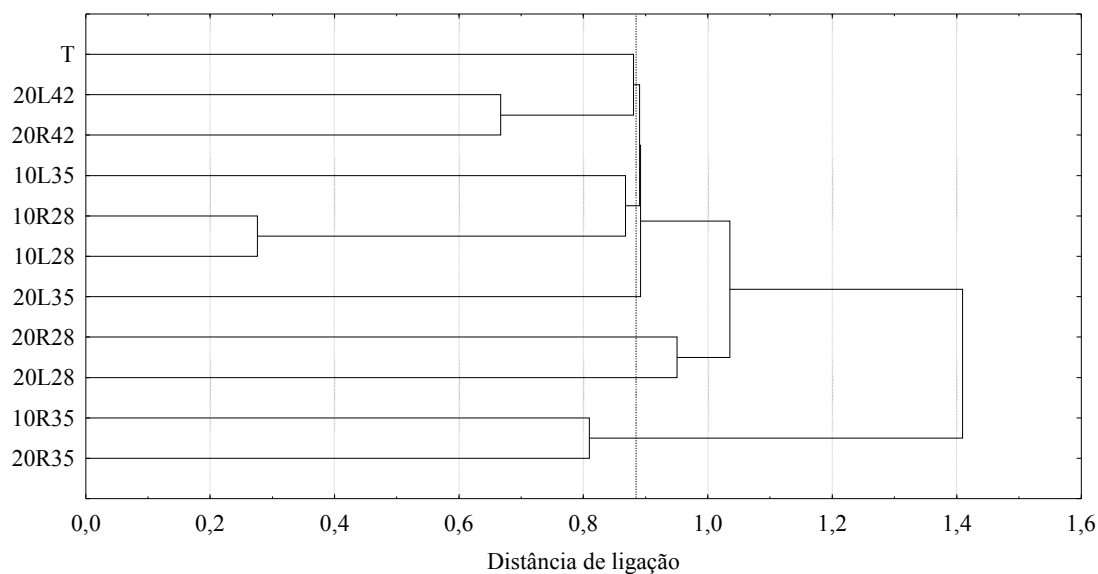


Figura 24 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos químicos).

Como podemos observar, a amostra testemunho posicionou-se mais ao menos ao centro do plano principal, relativamente equidistante da maioria das amostras. Isto poderá querer dizer que, em termos gerais, não se observou um impacto nítido da congelação nas propriedades químicas do queijo.

Paralelamente, foram determinadas as distâncias euclidianas entre as amostras (duas a duas) que sofreram congelação e a amostra testemunho, e verificou-se que as amostras que se aproximaram da amostra testemunho foram a amostra 20R42 e 20L35, com distâncias euclidianas de 0,88 e 0,89 respectivamente. Pelo contrário, as amostras que mais se afastaram da amostra testemunho foram as amostras 20R28 e 20L28, com distâncias euclidianas de 2,0 e 2,2 respectivamente. Isto significa que, apesar de ter havido pouco impacto da congelação nas propriedades químicas, as amostras que mais impacto sofreram foram as amostras 20R28 e 20L28 e as amostras que, em termos químicos, menos se modificaram com o processo de congelação, foram as amostras 20R42 e 20L35, considerando estes 7 atributos químicos.

5.3.2 – Impacto da congelação nas propriedades físicas do queijo

Os valores médios e desvios padrão, bem como os resultados da análise de variância referentes às propriedades físicas de cada tipo de amostra encontram-se na Tabela 12. No que se refere às propriedades reológicas observou-se que, em termos gerais, a congelação provocou um endurecimento na estrutura, detectável através do aumento da dureza, com diferenças significativas ($P < 0,05$), e do valor de G'_{1Hz} , mas sem diferenças significativas ($P > 0,05$).

Tabela 12 – Caracterização física: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

	Amostras										
	T	20L28	10L28	20R28	10R28	20L35	10L35	20R35	10R35	20R42	20L42
Dureza (N)	7,05 ^c (2,54)	13,38 ^{ab} (3,36)	13,88 ^{ab} (2,54)	12,05 ^b (2,02)	12,20 ^b (2,58)	15,91 ^{ab} (2,41)	16,58 ^a (2,83)	13,75 ^{ab} (2,06)	13,31 ^{ab} (1,94)	12,9 ^{ab} (3,69)	15,82 ^{ab} (2,82)
Adesividade (-N.s)	16,4 ^f (3,9)	28,8 ^c (7,1)	33,2 ^{de} (5,2)	35,7 ^{de} (6,0)	36,1 ^{cde} (6,3)	48,2 ^{ab} (7,7)	54,1 ^a (9,4)	43,2 ^{abcd} (7,0)	39,4 ^{bcde} (5,3)	39,2 ^{bcde} (8,5)	46,9 ^{abc} (8,0)
Coesividade	0,63 ^b (0,048)	0,62 ^b (0,044)	0,63 ^b (0,045)	0,64 ^b (0,036)	0,71 ^a (0,034)	0,63 ^b (0,026)	0,66 ^{ab} (0,034)	0,63 ^b (0,027)	0,67 ^{ab} (0,027)	0,62 ^b (0,021)	0,62 ^b (0,031)
Módulo conservativo a 1 Hz (kPa)	7,81 ^{ab} (2,65)	10,33 ^{ab} (2,95)	7,09 ^b (3,09)	9,23 ^{ab} (1,50)	7,76 ^{ab} (1,55)	10,86 ^{ab} (1,23)	7,63 ^{ab} (1,82)	11,74 ^a (1,65)	9,90 ^{ab} (2,30)	9,58 ^{ab} (1,68)	11,23 ^{ab} (1,03)
Tangente de dissipação a 1 Hz	0,53 ^{ab} (0,071)	0,49 ^{ab} (0,046)	0,56 ^a (0,063)	0,52 ^{ab} (0,027)	0,55 ^{ab} (0,047)	0,47 ^{ab} (0,029)	0,55 ^{ab} (0,046)	0,47 ^b (0,026)	0,53 ^{ab} (0,044)	0,50 ^{ab} (0,045)	0,47 ^{ab} (0,011)
log α	3,16 ^{ab} (0,136)	3,27 ^{ab} (0,118)	3,11 ^b (0,166)	3,24 ^{ab} (0,066)	3,17 ^{ab} (0,069)	3,30 ^{ab} (0,054)	3,16 ^{ab} (0,086)	3,34 ^a (0,053)	3,27 ^{ab} (0,097)	3,25 ^{ab} (0,063)	3,32 ^a (0,038)
b	0,58 ^{ab} (0,057)	0,62 ^{ab} (0,045)	0,54 ^b (0,055)	0,58 ^{ab} (0,025)	0,56 ^{ab} (0,032)	0,63 ^a (0,032)	0,56 ^{ab} (0,034)	0,62 ^a (0,026)	0,59 ^{ab} (0,046)	0,60 ^{ab} (0,049)	0,62 ^{ab} (0,015)
Cor-L*	77,7 ^e (1,228)	79,5 ^{abc} (0,770)	78,7 ^{bcde} (0,736)	80,1 ^a (1,364)	79,9 ^{ab} (1,065)	79,7 ^{ab} (1,207)	78,3 ^{cde} (1,403)	79,9 ^{ab} (1,723)	79,1 ^{abcd} (1,450)	78,3 ^{cde} (0,391)	78,1 ^{de} (0,449)
Cor-a*	-3,88 ^a (0,323)	-4,25 ^b (0,198)	-4,69 ^{cd} (0,155)	-4,41 ^b (0,165)	-4,40 ^b (0,203)	-4,44 ^{bc} (0,191)	-4,44 ^{bc} (0,335)	-4,76 ^d (0,182)	-4,88 ^d (0,279)	-4,37 ^b (0,129)	-4,32 ^b (0,194)
Cor-b*	13,07 ^e (2,072)	14,9 ^d (0,542)	16,82 ^{ab} (0,798)	15,37 ^{cd} (0,492)	15,95 ^{bc} (0,713)	15,36 ^{cd} (0,563)	17,05 ^a (0,547)	16,02 ^{bc} (0,581)	17,14 ^a (0,679)	15,31 ^{cd} (0,537)	14,98 ^d (0,790)

a,b,c, ... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 9$, para a textura $n = 15$, para a cor $n = 30$ (teste de Scheffé).

Como já foi referido, em relação à textura, observou-se um endurecimento da pasta em todas as amostras congeladas, ou seja, podemos referir que a dureza e a adesividade foram os parâmetros mais alterados pelo processo de congelação. As amostras congeladas apresentaram-se todas mais duras e adesivas, de uma forma bastante evidente, mas nem sempre com diferenças significativas. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 25.

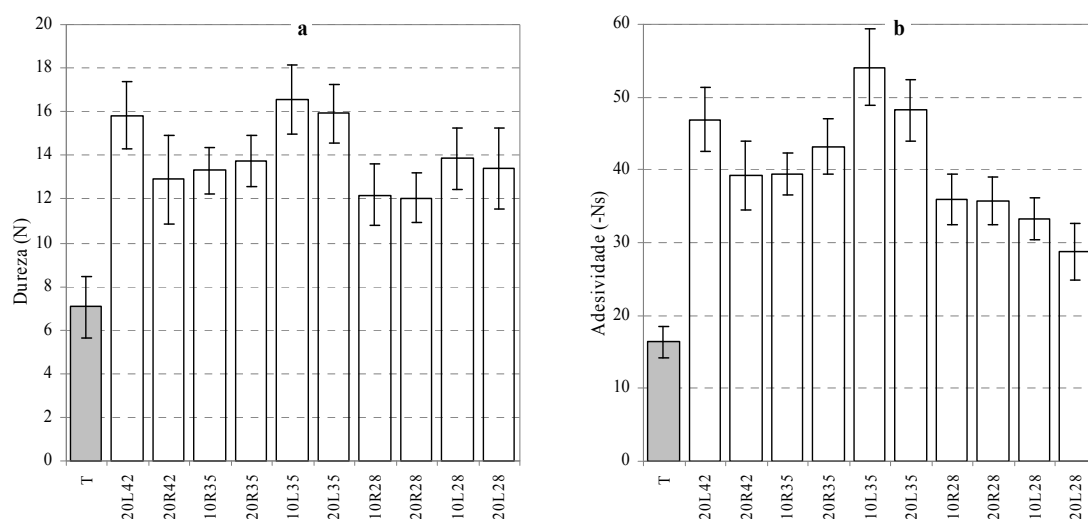


Figura 25 – Valores médios dos parâmetros de dureza (a) e adesividade (b) nas diferentes amostras. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

O endurecimento do queijo, quando submetido à congelação, foi observado por outros autores e explicado pela desidratação local das proteínas, por separação das fases que ocorre durante o processo de congelação, o que provoca uma alteração da estrutura proteica, permitindo o contacto entre os pequenos glóbulos de gordura e a formação de grânulos. As proteínas vão-se tornando mais compactas, ou interagem para formarem pontes de enxofre que rodeiam os novos grânulos de gordura. Estes processos são, na sua maioria, irreversíveis porque, durante o armazenamento em congelado, o aumento das dimensões dos cristais de gelo, devido às recristalizações, dificulta a recolocação da água na interface proteína-gordura, diminuindo o efeito lubrificante, reflectindo-se numa estrutura mais elástica após descongelação (Diefes *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 1996b). Estes autores também observaram um aumento na adesividade de amostras sujeitas ao processo de congelação.

Para quantificar as propriedades viscoelásticas, foram realizados testes SAOS “small amplitude oscillatory stress”. Como foi referido anteriormente, antes de se efectuarem

os varrimentos de frequência (espectros mecânicos), foi necessário realizar varrimentos de tensão para determinar o limite da viscoelasticidade linear, ou seja, a tensão a aplicar no varrimento de frequência, com garantias do teste ser não-destrutivo. Na Figura 26 podem-se observar os varrimentos de tensão obtidos para os diferentes tipos de amostras.

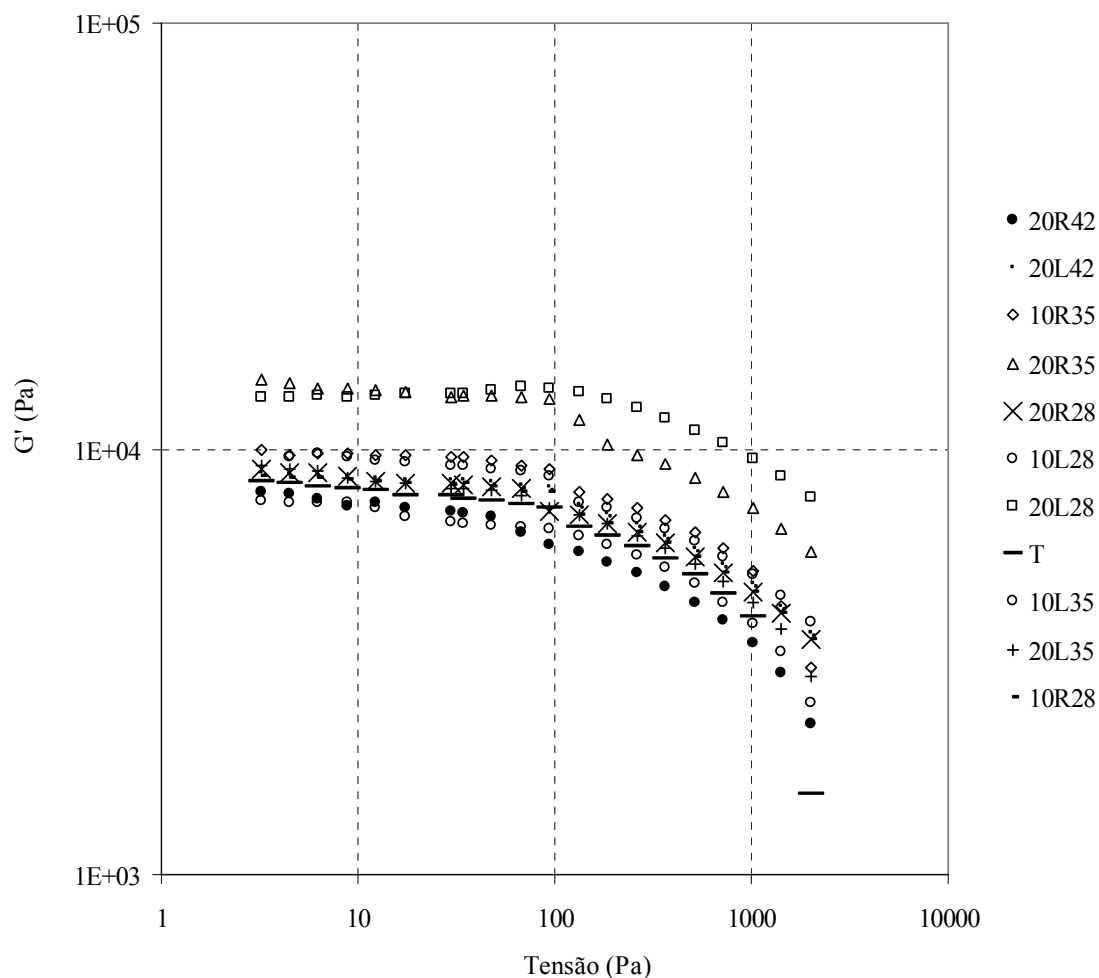


Figura 26 – Varrimentos de tensões médias para cada tipo de amostra ($\omega = 1\text{Hz}$).

Com base nos resultados de varrimento de tensões, usou-se uma tensão de 50 Pa para obter os espectros mecânicos, de todas as amostras, à semelhanças do que tinha sido prática no primeiro ensaio para as amostras com um tempo de cura superior a 21 dias. Para uma análise do impacto dos processos de congelamento nas propriedades estruturais, elaboraram-se os espectros mecânicos médios das amostras testemunho e congeladas. Estes foram agrupados em dois conjuntos: o primeiro conjunto em que se apresentam todos os espectros de amostras submetidas à câmara de congelamento (Figura 27) e um segundo conjunto, onde se apresentaram as amostras submetidas ao túnel de congelamento

(Figura 28). Em cada uma destas figuras, tomou-se a opção de repetir o espectro mecânico médio das amostras testemunho, para uma análise comparativa mais fácil dos dados.

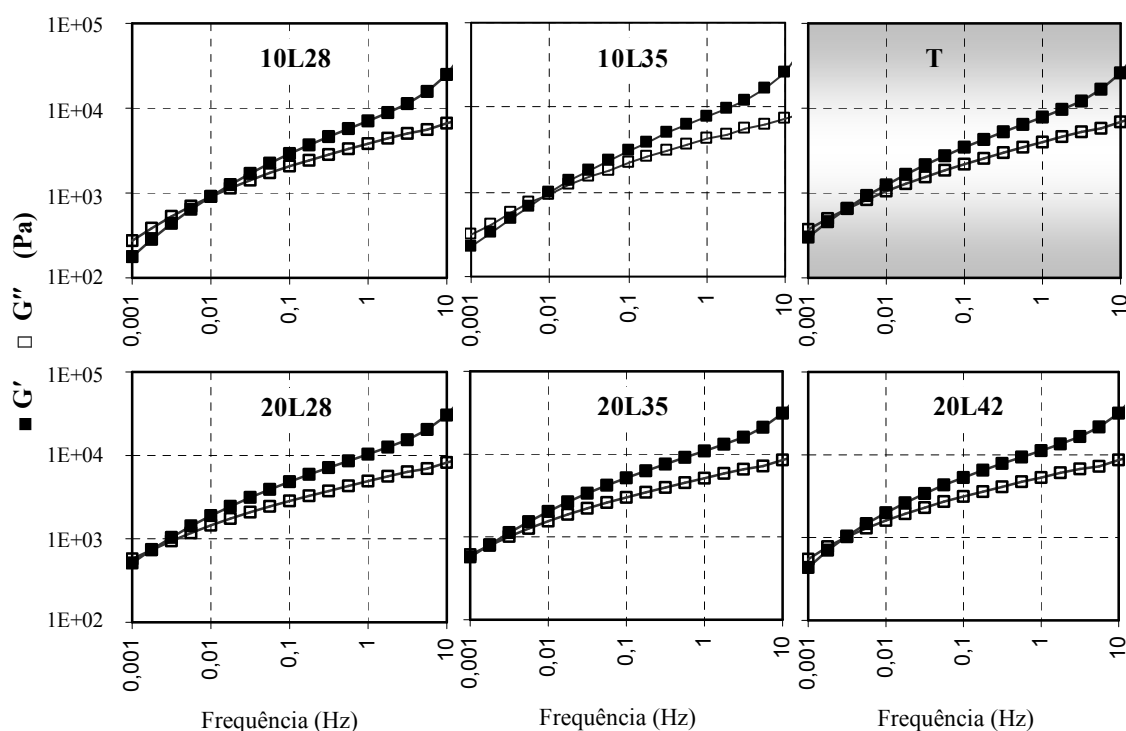


Figura 27 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho e amostras submetidas à câmara de congelação. Destacado, a cinzento, o espectro mecânico da amostra testemunho.

Tomando o espectro mecânico médio da amostra testemunho como termo de comparação, podemos observar que as duas linhas do espectro mecânico ($\blacksquare G'$ e $\square G''$) se encontravam muito próximas e tinham um ponto de cruzamento ($G' = G''$) para valores de frequência na ordem dos 0,003 Hz. Este tipo de estrutura, é característico de uma solução concentrada de macromoléculas com uma componente viscosa bastante acentuada.

Comparando a estrutura da amostra testemunho com as restantes, verificaram-se três situações distintas. A primeira situação diz respeito às amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aos 28 e 35 dias de cura (20L28 e 20L35). Estas apresentaram uma estrutura um pouco mais forte do que a amostra testemunho, não só porque a intercepção das linhas se deu para valores de frequência inferiores (na ordem dos 0,002 Hz), mas também porque ambas as linhas do espectro se encontram um pouco acima das linhas da amostra testemunho, revelando que, durante a congelação, poderá ter ocorrido desidratação das proteínas com efeitos evidentes no reforço da estrutura. A segunda situação reúne as

amostras congeladas a -10 °C, aos 28 e 35 dias de cura (10L28 e 10L35), que apresentaram estruturas mais débeis que a amostra testemunho, com pontos de intercepção para valores relativamente altos de frequência (da ordem dos 0,010 Hz). Este tipo de comportamento é indicativo de um material menos estruturado, sugerindo que estas amostras se caracterizaram por uma actividade proteolítica assinalável, o que está de acordo com o que se tinha observado através da análise de variância às fracções azotadas, bem como na análise em componentes principais referentes às propriedades químicas, onde se observou um posicionamento destas amostras no plano principal, em zonas muito explicadas pelas fracções azotadas (Figura 22 e Figura 23).

Por fim, a amostra congelada ao 42º dia, foi a que manifestou uma estrutura mais próxima da amostra testemunho, apresentando um ponto de intercepção das duas linhas ($G' = G''$) exactamente igual ao da amostra testemunho (0,003 Hz) e, mesmo sendo um processo de congelação lenta, verificou-se que foi nesta amostra que as propriedades estruturais se mantiveram mais inalteradas em relação à amostra testemunho.

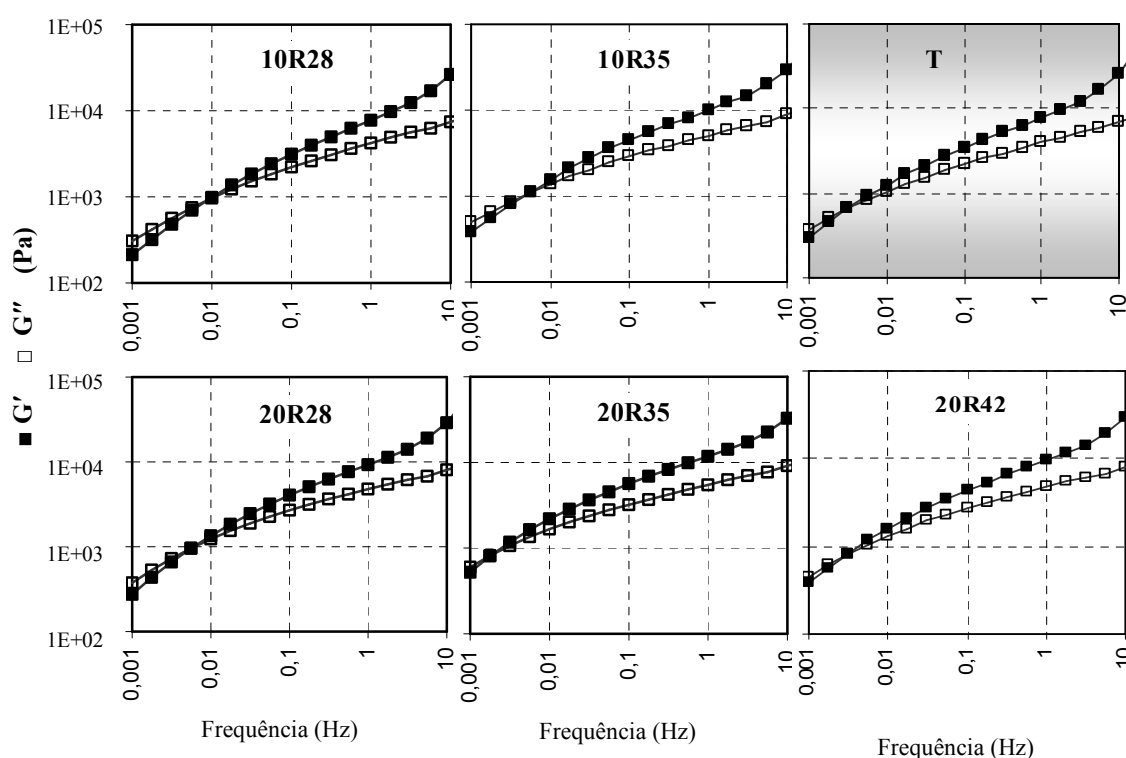


Figura 28 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho e amostras submetidas ao túnel de congelação. Destacado, a cinzento, o espectro mecânico da amostra testemunho.

No caso das amostras congeladas em túnel (Figura 28), ambas as amostras congeladas aos 28 dias de cura (10R28 e 20R28) e a amostra congelada aos 35 dias de cura e

conservada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10R35) apresentaram estruturas mais débeis que a amostra testemunho, ou seja, o ponto de intercepção das duas linhas ($G' = G''$) ocorreu para frequências superiores a $0,03\text{Hz}$. No entanto, as amostras congeladas aos 35 e 42 dias de cura e conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20R35 e 20R42) apresentam uma estrutura muito semelhante à estrutura apresentada pela amostra testemunho, onde estas linhas se cruzaram em frequências da ordem dos $0,003\text{Hz}$.

Resumindo, as amostras que apresentaram maior semelhança, em termos de espectros mecânicos, com a amostra testemunho foram todas conservadas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo uma delas congelada aos 35 dias de cura com congelamento rápida (20R35), e as outras congeladas aos 42 dias de cura (20R42 e 20L42). Os resultados sugeriram que a temperatura de conservação das amostras mais adequada foi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para além disso, quanto mais rápido foi o processo de congelamento e mais perto do final da cura este foi aplicado, menor impacto teve nas propriedades estruturais das amostras.

Em relação aos parâmetros de cor da pasta, como já fora observado na Tabela 12, a amostra testemunho apresentou-se com um valor de luminosidade significativamente menor que o das amostras congeladas ($P < 0,05$). Em relação aos restantes parâmetros de cor, a congelamento também levou ao aparecimento de diferenças significativas em qualquer deles ($P < 0,05$). Assim, a congelamento tornou a pasta do queijo mais luminosa, mais esverdeada e mais amarelada. Para poder avaliar quais os processos em estudo que menor impacto causaram na cor da pasta, elaboraram-se gráficos com os valores médios dos parâmetros de cor para a amostra testemunho e para as amostras submetidas aos processos de congelamento (Figura 29).

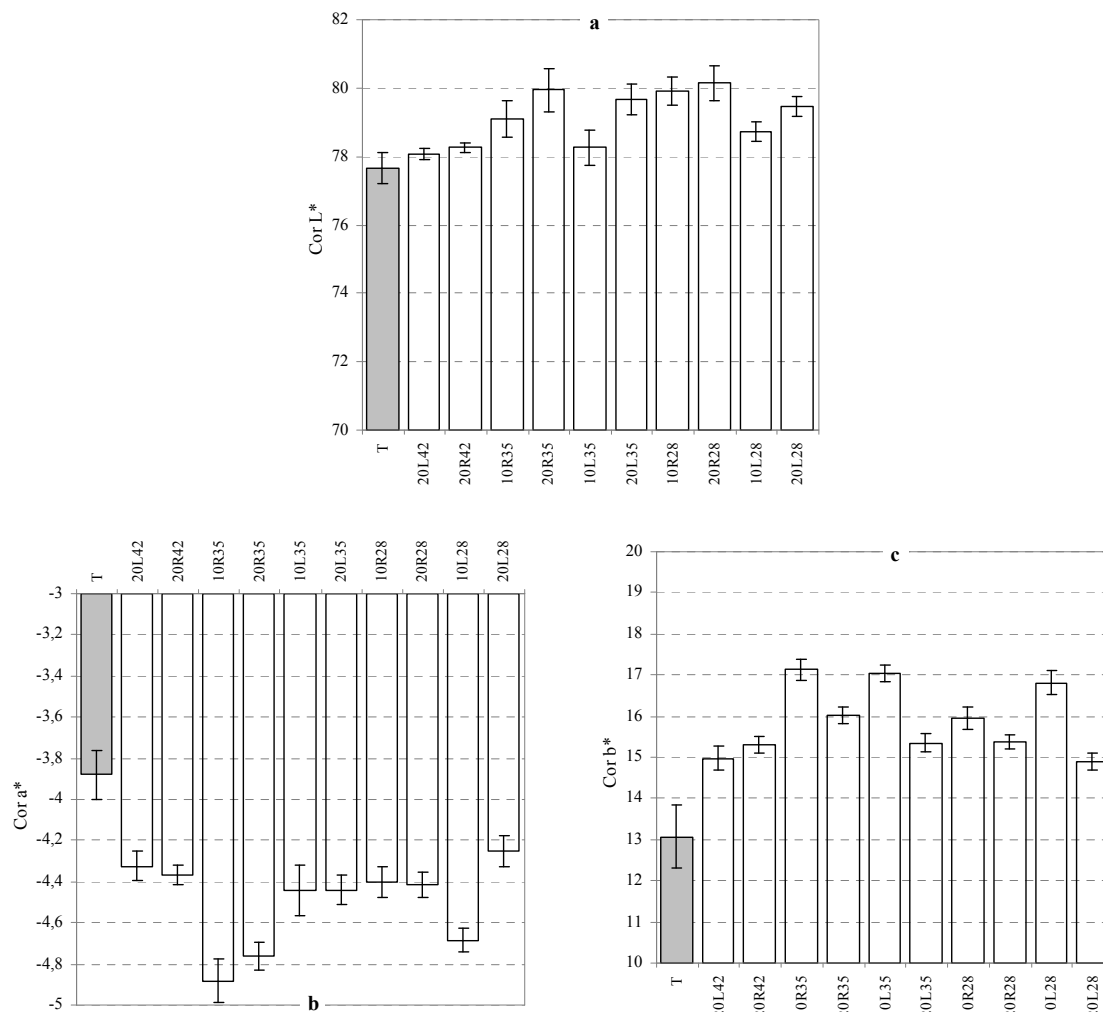


Figura 29 – Valores médios dos parâmetros de cor L* (a) a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. Destacado, a cinzento, o valor médio para a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Apesar de se ter notado diferenças nos parâmetros de cor em todas as amostras congeladas, quando comparadas com as amostras testemunho, é notório que as amostras congeladas aos 42 dias de cura são as que mostraram um perfil de cor com maiores semelhanças ao das amostras testemunho, uma vez que nestas amostras o impacto da congelação nos três parâmetros de cor foi menor. Nas amostras congeladas aos 28 e 35 dias de cura, observou-se que, apesar de alguns parâmetros do perfil de cor terem sofrido pouco com a congelação, existiu sempre um parâmetro de cor com danos bastante notórios causados pela congelação.

Para avaliar o impacto da congelação nas propriedades físicas em termos globais, foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP). Nesta análise foram usados os resultados médios de cada tipo de amostra, por ser mais fácil a análise visual

dos gráficos finais. Na análise foram usados 7 atributos físicos: os parâmetros de cor L^* , a^* , e b^* e os parâmetros viscoelásticos módulo conservativo G'_{1Hz} , tangente dissipativa $\tan \delta_{1Hz}$, $\log \alpha$ e b . Na Tabela 13 apresentam-se os valores próprios e a extracção dos componentes principais obtidos na análise efectuada.

Tabela 13 – Valores próprios e extracção dos componentes principais dos valores médios dos atributos químicos.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	4,02	57,48	4,02	57,48
2	2,17	31,00	6,19	88,49
3	0,68	9,65	6,87	98,13
4	0,07	1,04	6,94	99,18
5	0,03	0,46	6,97	99,63
6	0,02	0,34	7,00	99,97
7	0,00	0,03	7,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 88,5% da variância: 57,5% para o primeiro componente e 31,0% para o segundo. Só foram significativos os dois primeiros componentes, uma vez que só estes apresentaram valor próprio superior a 1. Estando em análise 7 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 7 atributos foram transformados em 7 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por terem valor próprio superior a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro tem valor próprio de 4,02 e o segundo com valor próprio 2,17.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e as componentes principais (Tabela 14).

Tabela 14 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos físicos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
$G'_{1\text{Hz}}$ (Pa)	-0,99*	0,11
$\tan \delta_{1\text{Hz}}$	0,98*	0,13
$\log \alpha$	-0,98*	0,11
b	-0,98*	-0,14
Cor-L*	-0,32	0,60
Cor-a*	0,09	-0,96*
Cor-b*	0,25	0,92*

* - correlações significativas ($r > 0,7$).

Os resultados da análise mostraram que o componente principal CP1 foi explicado, com maior peso, pelo módulo conservativo, $\log \alpha$ e b (com valores de correlação negativos) e pela tangente dissipativa (com valor de correlação positivo). O componente principal CP2 foi explicado pelo parâmetro de cor a* (com valor de correlação negativo), e pelos parâmetros de cor L* e b* (com valores de correlação positivos) (Figura 30).

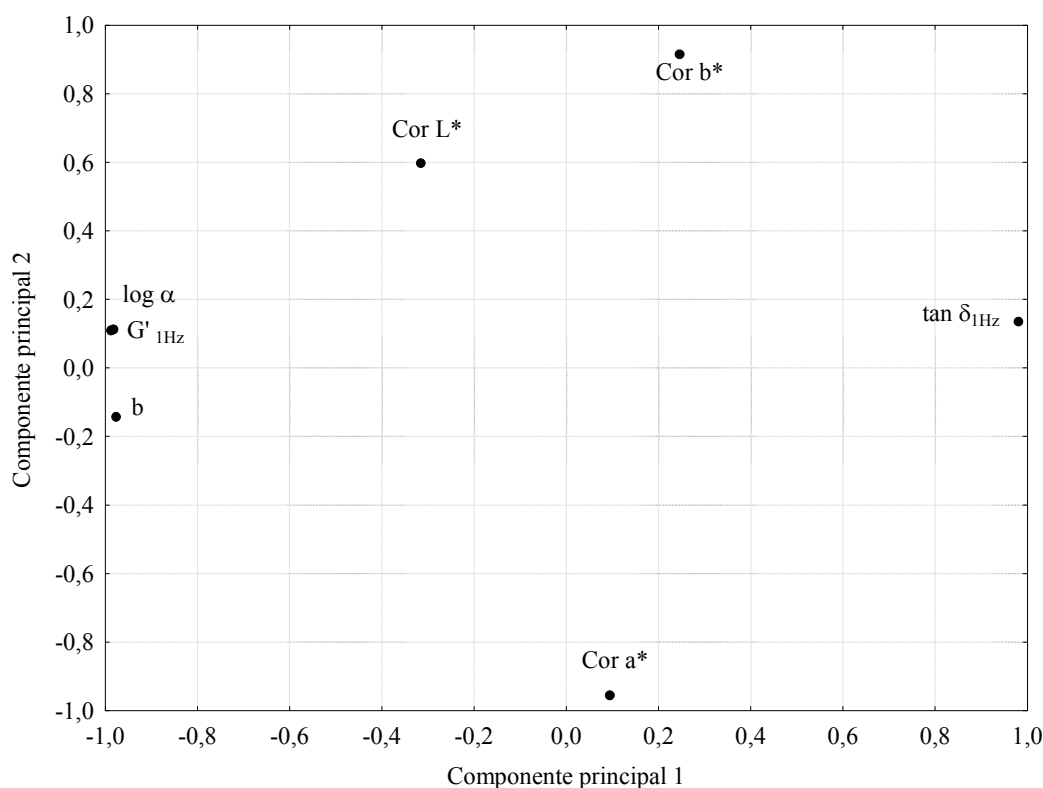


Figura 30 – Distribuição dos atributos físicos no plano principal.

Destaca-se que o CP1 foi justificado pelos parâmetros reológicos e o CP2 pelos parâmetros de cor. Na Figura 31 podemos observar a projecção das amostras congeladas e das amostras testemunho no plano principal, constituído pelos dois primeiros componentes principais.

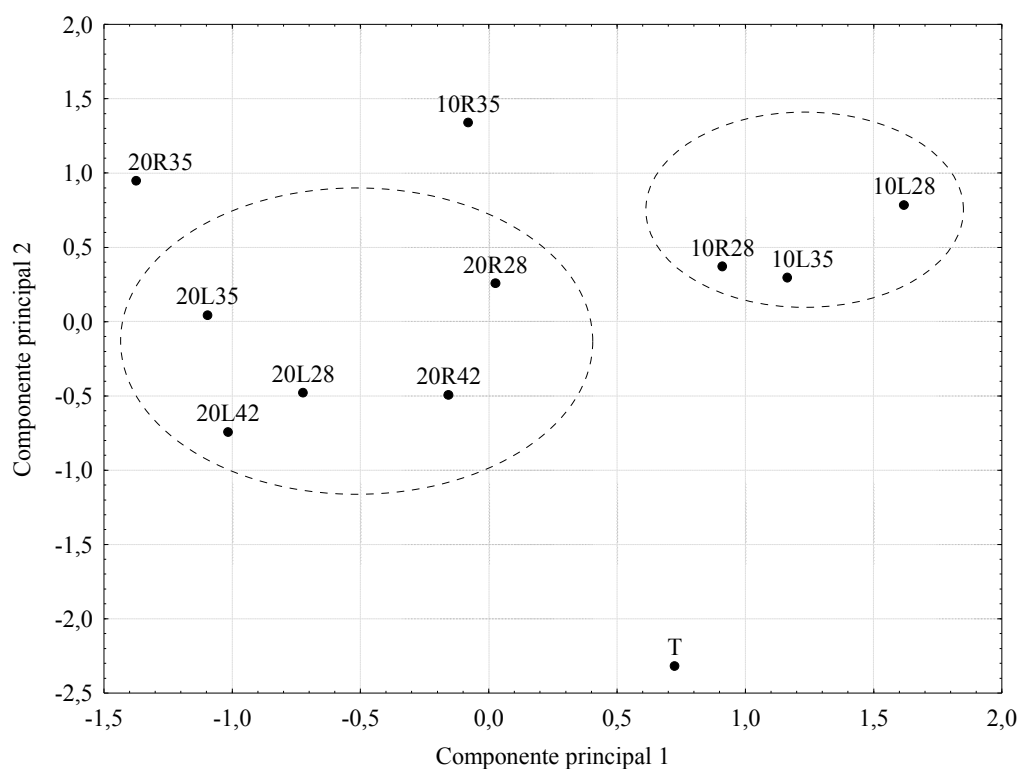


Figura 31 – Projecção das amostras no plano principal (atributos físicos).

Para o agrupamento das amostras, foi usado o método de classificação aglomerativa hierárquica, "Cluster Analysis" com uma distância de ligação, entre amostras de cerca de 0,8 (Figura 32).

Analisando, em simultâneo, as projecções das amostras nos planos principais, obtidas nas análises em componentes principais aos atributos químicos (Figura 23) e aos atributos físicos (Figura 31), pode-se constatar que a congelação têm um efeito mais pronunciado nos atributos físicos do que nos atributos químicos estudados. No caso da ACP – atributos químicos, a amostra testemunho encontrava-se no centro do plano principal, isto significava que a congelação não influenciava especialmente um atributo em relação aos outros. No caso da ACP – atributos físicos, isto já não se observou: as amostras congeladas separaram-se da amostra testemunho essencialmente no componente principal 2, ou seja, o componente explicado em particular pelo perfil de cor. Isto significa que houve um impacto assinalável da congelação nos parâmetros

físicos devido, essencialmente, às diferenças encontradas na cor das amostras, que não é um atributo tão importante em termos de aceitabilidade deste queijo como os seus atributos estruturais.

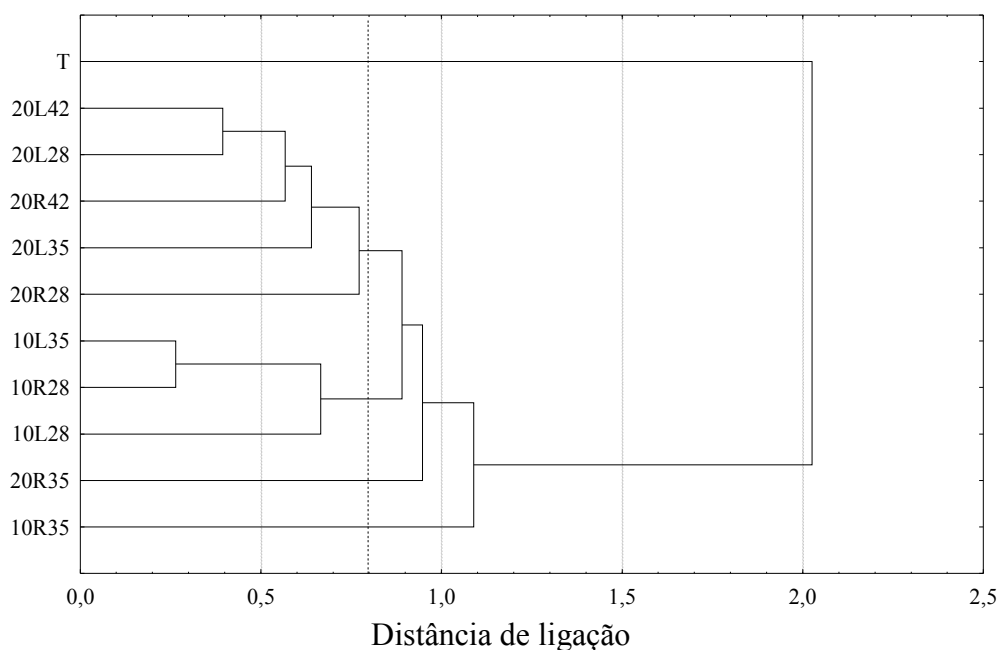


Figura 32 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos físicos).

As figuras anteriores mostraram um grupo de amostras com uma estrutura muito débil: as amostras 10L28, 10R28 e 10L35. Esta estrutura débil observou-se a partir da análise dos espectros mecânicos destas amostras (Figura 27 e Figura 28,) e na ACP – atributos físicos, uma vez que, estas se localizaram na zona do plano explicada pela $\tan\alpha_{1\text{Hz}}$ e contrária ao $G'_{1\text{Hz}}$ (Figura 31 e Figura 32). Curiosamente, estas amostras formaram o mesmo grupo na ACP – atributos químicos (Figura 23 e Figura 24), e localizaram-se na zona direita do plano, muito justificada pelas fracções de azoto solúvel. Estes resultados foram concordantes com trabalhos realizados em microscopia electrónica, em que se observaram alterações na estrutura da rede proteica de queijos congelados lentamente, provavelmente como consequência da formação de cristais de gelo de dimensões superiores (Graiver *et al.*, 2004). As proteínas de amostras congeladas apresentam uma superfície pregueada, com maiores distâncias entre elas, e a força de ligação diminui (Filchakova *et al.*, 1983). Como consequência disto, a resistência à deformação das amostras congeladas vai ser menor (Canet *et al.*, 1995). Estes autores referem ainda que

amostras de queijo congeladas em condições ideais (por exemplo com azoto líquido), apresentam valores de módulo de elasticidade (estático) e de dureza semelhantes ao testemunho ao fim de 3 meses de congelação. No entanto, ao fim de seis meses de congelação, os valores destes parâmetros estruturais começam a modificar-se.

Paralelamente, procedeu-se ao cálculo individual das distâncias euclidianas entre as amostras (duas a duas) que sofreram congelação e a amostra testemunho, e verificou-se que as amostras que se aproximaram da amostra testemunho foram a amostra 20R42 e 20L42, com distâncias euclidianas de 2,0 e 2,3 respectivamente. Pelo contrário, as amostras que mais se afastaram da amostra testemunho foram as amostras 10R35 e 20R35, com distâncias euclidianas de 3,7 e 3,9 respectivamente.

5.4 – Conclusões

Neste ensaio, pretendeu-se que as amostras estivessem congeladas tempo suficiente para causar alterações, usando-se um tempo de congelação total de cerca de um ano. Assim, foi possível observar as modificações devidas à congelação e à conservação em estado congelado nas propriedades químicas (essencialmente componentes maiores e fracção proteica) e físicas (propriedades estruturais e parâmetros de cor) de queijos de ovelha de pasta semi-mole. As conclusões retiradas foram as seguintes:

- Em termos estruturais, pôde-se observar alguma semelhança entre as amostras congeladas e a amostra testemunho, podendo-se destacar a amostra congelada aos 35 dias com congelação rápida (20R35), e ambas as outras congeladas aos 42 dias de cura (20R42 e 20L42), como as que apresentaram espectros mecânicos com maior semelhança relativamente à amostra testemunho.
- A partir da evolução das fracções azotadas nas amostras congeladas, verificou-se que as amostras submetidas ao processo de congelação apresentaram, em termos gerais, valores médios de fracções azotadas superiores, quando comparadas com as amostras testemunho, significando que o ciclo de congelação não conseguiu impedir a actividade enzimática.
- Os valores médios de pH das amostras congeladas aos 28 dias (20L28, 10L28 e 20R28) são inferiores aos valores médios do pH das amostras testemunho ($P < 0,05$), ou seja, o pH destas amostras, não subiu para os valores esperados. Estes

elementos indicam que a cura foi, de certo modo, interrompida pela congelação, não tendo sido retomada, o que desaconselha a congelação nesta fase da cura.

- Em relação às propriedades químicas, à excepção dos indicadores de proteólise, não se registaram alterações inequívocas devidas à congelação. Na ACP – atributos químicos, a amostra testemunho localizou-se no centro do mapa e as diferentes amostras congeladas localizaram-se em redor daquela, significando que as amostras congeladas se apresentaram mais ou menos equidistantes das restantes amostras.
- Quanto às propriedades físicas, estas alteraram-se de forma significativa com a congelação. Na ACP – atributos físicos observou-se que a amostra testemunho se encontrou separada pelo segundo componente (explicado pelos parâmetros de cor) das restantes amostras que sofreram o processo de congelação, significando que os danos da congelação nas propriedades físicas foram pouco evidentes nos atributos estruturais e mais evidentes nos atributos de cor.
- Também foi observado um endurecimento do queijo, quando submetido à congelação, explicado pela compactação das proteínas a partir das pontes de enxofre formadas e pela formação de grânulos de gordura.
- Com este ensaio pôde-se concluir que o processo de congelação foi mais eficaz quando se fez no final da cura (42 dias de cura) e quando as amostras se mantiveram conservadas a temperatura mais baixa (-20 °C). No que se refere à velocidade de congelação, não se observaram vantagens em relação ao processo de congelação ser mais rápido. A partir dos resultados deste estudo, recomenda-se que o processo de congelação seja aplicado no final da cura e que a temperatura de conservação seja de, pelo menos, -20 °C.
- A partir do cálculo das distâncias euclidianas entre as amostras quando projectadas nos planos principais da ACP – atributos químicos e da ACP – atributos físicos, a amostra que mais se assemelhou à amostra testemunho foi a amostra 20R42.

Fica por estudar a dinâmica das alterações ao longo do tempo, para definir um tempo ideal para o produto estar congelado. Este é o objectivo do terceiro ensaio que se apresenta nesta tese.

CAPÍTULO 6 – “INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONGELAÇÃO NAS PROPRIEDADES DO QUEIJO DE OVELHA DE PASTA SEMI-MOLE” (ENSAIO 3)

Resumo

Apesar do impacto da congelamento nas propriedades dos queijos ser um tema bastante controverso, existem vários motivos essenciais para que este tema se estude: em primeiro lugar, nunca foi aplicado de uma forma sistemática em nenhum queijo Português com Denominação de Origem Protegida. Em segundo lugar, é aplicado empiricamente por alguns produtores sem terem dados técnicos de suporte. Por último, o tecido produtivo de leite dos pequenos ruminantes apresenta, no nosso país, uma grande sazonalidade. Assim, os objectivos para este ensaio foram estudar a influência do tempo de armazenamento no estado congelado (até 12 meses) nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do queijo. As variáveis estudadas foram a temperatura (-10 °C e -20 °C) e o tempo de conservação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses). Os parâmetros reológicos mostraram uma tendência para o endurecimento dos queijos ao fim de algum tempo de congelamento: seis meses para amostras congeladas a -10 °C e oito meses para amostras congeladas a -20 °C. Na cor, observaram-se ligeiras lesões na crosta das amostras de queijo congelado, com maior incidência nos parâmetros L* e a* e com menor incidência no parâmetro b*. Concluindo, a congelamento de queijos de ovelha de pasta semi-mole, à temperatura de -20 °C, por períodos não superiores a 6 meses preserva, na globalidade, as características das amostras. Para queijos de ovelha de pasta semi-mole, com Denominação de Origem Protegida, a congelamento à temperatura -20 °C, por períodos superiores a 6 meses, deve ser desencorajada e, à temperatura de -10 °C, deve ser totalmente interdita.

Palavras-chave: queijo, ovelha, congelamento, reologia, proteólise, análise sensorial.

6.1 – Introdução

Na última década, a congelamento de queijo têm sido alvo de estudo por parte de alguns grupos de investigadores, particularmente em Espanha, sendo possível encontrar trabalhos publicados para os queijos de ovelha Los Pedroches (Tejada *et al.*, 2000; Tejada *et al.*, 2002) e Manchego (Prados *et al.*, 2006) e para queijo de cabra (Castillo *et al.*, 2007), na Argentina, essencialmente com queijos de vaca Porto Salut (Verdini e Rubiolo, 2002a; Verdini *et al.*, 2003; Verdini *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2007) e Mozzarella (Graiver *et al.*, 2004; Ribero *et al.*, 2007a; Ribero *et al.*, 2007b) e nos Estados Unidos da América, onde se encontram estudos de congelamento a nível de queijo de cabra (Park e Drake, 2005; Van-Hekken *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Park e Lee, 2006). Uma grande parte dos estudos usa temperaturas de congelamento de -20 °C, podendo-se entender esta como uma temperatura de referência para congelar o queijo. Apesar desta temperatura não ser inferior aos valores de temperatura de transição vítrea encontrados para queijo, -20 °C (Alvarenga *et al.*, 2004) e -22 °C (Oliveira *et al.*, 1997), julga-se que os investigadores têm optado por esta ser fácil de implementar numa unidade de produção de queijo, sem representar custos de instalação e manutenção muito elevados.

Recentemente, têm sido apontadas novas técnicas de congelamento de queijo, como a imersão em solução de cloreto de sódio, combinando o processo de congelamento com o processo de salga, com resultados positivos, uma vez que, em relação aos processos convencionais, reduz a desidratação das amostras e, apesar de se terem encontrado diferenças significativas nalguns parâmetros reológicos, estas não impediram o aconselhamento técnico do processo (Ribero *et al.*, 2007a).

As propriedades que têm sido usadas para avaliar os danos causados pela congelamento têm sido diferentes, podendo-se destacar a caracterização reológica, textural, sensorial físico-química e bioquímica (monitorização dos mecanismos enzimáticos da proteólise e lipólise).

Em estudos de congelamento de queijo apoiados na análise sensorial, as conclusões também não têm sido unânimes: nalguns estudos, a congelamento afectou as propriedades sensoriais (Tejada *et al.*, 2000; Park e Drake, 2005), noutros estas propriedades praticamente não foram afectadas pelo processo de congelamento (Park *et al.*, 2006).

Em estudos envolvendo queijo de ovelha também não há unanimidade. No queijo Manchego, Prados *et al.* (2006) observaram que a quase totalidade dos atributos analisados (químicos, fracção proteica, microbiológicos e sensoriais) não foram afectadas pelo processo de congelação. No entanto, em queijo Los Pedroches, a congelação teve influência significativa nos atributos sensoriais (Tejada *et al.*, 2000), na fracção azotada e nos atributos microbiológicos (Tejada *et al.*, 2002).

Apesar de não haver consenso em relação aos danos causados pela congelação nas propriedades do queijo no que se refere à proteólise, na quase totalidade dos estudos foi relatado um aumento nos níveis das fracções azotadas (Ramos *et al.*, 1987; Bertola *et al.*, 1996b; Tejada *et al.*, 2002; Verdini e Rubiolo, 2002a; Verdini *et al.*, 2003; Graiver *et al.*, 2004; Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2007).

Em queijos de pasta dura, o impacto da congelação nas propriedades reológicas também está longe de ser unânime: uns relatam uma quebra na estrutura e explicam-na com a quebra de ligações peptídicas ocorrida devido à proteólise (Graiver *et al.*, 2004), enquanto que outros não encontram diferenças devidas ao processo de congelação (Ribero *et al.*, 2007a).

Prados *et al.* (2006) estudaram a influência do processo de congelação na composição, na fracção azotada e nos atributos sensoriais de amostras de queijo Manchego congeladas durante 3, 6 e 9 meses, concluindo que as diferenças começaram a ser notórias ao fim de 9 meses de congelação.

Apesar do impacto da congelação nas propriedades dos queijos ser um tema em que há bastante controvérsia e de ser unânime que a actividade proteolítica não cessa, existem vários motivos essenciais para que este tema se estude: em primeiro lugar, nunca foi aplicado de uma forma sistemática aos queijos Portugueses com Denominação de Origem Protegida, em segundo lugar, é aplicado empiricamente por alguns produtores sem terem dados técnicos de suporte, em terceiro o tecido produtivo de leite dos pequenos ruminantes apresenta, no nosso país, uma grande sazonalidade. Assim, os objectivos para este ensaio foram estudar a influência do tempo de armazenamento no estado congelado (até 12 meses) nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do queijo cru de ovelha de pasta semi-mole, neste caso queijo Serpa.

6.2 – Material e métodos

6.2.1 – Delineamento experimental

Neste ensaio, usaram-se 40 amostras de queijo com 42 dias de cura, com cerca de 0,8 kg, optando-se por manter o mesmo produtor do ensaio anterior pelos motivos já referidos. O método de produção de queijo foi referido em 5.2.1 (Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Roseiro *et al.*, 2003c). Das 40 amostras usadas, 4 não sofreram qualquer processo de congelação e designaram-se por amostras testemunho, as restantes 36 foram arrefecidas a 4 °C e, de seguida, foram congeladas numa câmara a -20 °C. Estas foram posteriormente divididas em 2 lotes de 18 amostras. Um destes lotes foi conservado a -20 °C e o outro a -10 °C. As amostras testemunho (T) foram imediatamente analisadas após a produção, enquanto que as restantes amostras foram congeladas durante diferentes períodos (2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses). Depois do período de congelação, as amostras foram descongeladas, numa câmara de refrigeração a 0 °C durante 3 dias e, de seguida, prepararam-se para análise. Na Tabela 16, encontra-se o desenho experimental do ensaio 3, onde se pode observar que as amostras testemunho se encontram em quadruplicado, enquanto que as amostras congeladas se encontram em triplicado.

Tabela 15 – Plano de amostragem do ensaio 3.

Amostra	Temperatura de Congelamento (°C)	Tempo de Congelamento (meses)	Código
1	na	na	T
2	na	na	T
3	na	na	T
4	na	na	T
5	-10	2	-10C/2M
6	-10	2	-10C/2M
7	-10	2	-10C/2M
8	-10	4	-10C/4M
9	-10	4	-10C/4M
10	-10	4	-10C/4M
11	-10	6	-10C/6M
12	-10	6	-10C/6M
13	-10	6	-10C/6M
14	-10	8	-10C/8M
15	-10	8	-10C/8M
16	-10	8	-10C/8M
17	-10	10	-10C/10M
18	-10	10	-10C/10M
19	-10	10	-10C/10M
20	-10	12	-10C/12M
21	-10	12	-10C/12M
22	-10	12	-10C/12M
23	-20	2	-20C/2M
24	-20	2	-20C/2M
25	-20	2	-20C/2M
26	-20	4	-20C/4M
27	-20	4	-20C/4M
28	-20	4	-20C/4M
29	-20	6	-20C/6M
30	-20	6	-20C/6M
31	-20	6	-20C/6M
32	-20	8	-20C/8M
33	-20	8	-20C/8M
34	-20	8	-20C/8M
35	-20	10	-20C/10M
36	-20	10	-20C/10M
37	-20	10	-20C/10M
38	-20	12	-20C/12M
39	-20	12	-20C/12M
40	-20	12	-20C/12M

na – Não aplicável, pois as amostras não foram congeladas para servirem de testemunho.

Depois de descongeladas, as amostras foram transportadas para o laboratório, em malas térmicas e as análises laboratoriais tiveram início nesse dia. A preparação da amostra consistiu na remoção de uma camada de queijo com 1 cm de altura, para expor uma

superfície de pasta homogénea permitindo as determinações da cor, do pH e análise do perfil de textura.

6.2.2 – Procedimentos laboratoriais

O resumo dos procedimentos das técnicas laboratoriais usadas neste ensaio encontra-se no Capítulo 3. Para a caracterização química das amostras foram utilizados os seguintes parâmetros: pH, acidez titulável, azoto total, azoto solúvel em água, azoto não proteico, azoto aminoacídico, bem como parâmetros obtidos por cálculo indirecto, nomeadamente, resíduo seco, humidade referida ao queijo isento de gordura, NSA%, NNP%, NA% e gordura no resíduo seco. Para a caracterização física analisaram-se os parâmetros de cor (L^* , a^* , e b^*), os parâmetros de textura (dureza, adesividade e coesividade) e os parâmetros viscoelásticos (módulo conservativo G'_{1Hz} , tangente dissipativa $\tan \delta_{1Hz}$, $\log \alpha$ e b). Neste ensaio foi ainda realizada a caracterização sensorial das amostras pela análise descritiva quantitativa.

6.2.3 – Análise estatística

As determinações químicas e reológicas foram efectuadas em triplicado, enquanto que para a cor foram utilizadas 10 réplicas. Para avaliar a qualidade dos resultados laboratoriais obtidos para cada um dos parâmetros usou-se a estatística descritiva, calculando-se, para cada amostra, a média, o desvio padrão, o erro padrão da média e o intervalo de confiança da média a 95%.

Os elementos do painel de provadores ($n = 16$, 8 mulheres e 8 homens) usaram as fichas de prova já descritas anteriormente (Figura 7), para apreciar as amostras. Posteriormente, usou-se uma transparência com grelha numerada de 1 a 9 para transformar as respostas de cada provador em escala numérica. Com esta classificação, obteve-se um perfil sensorial de cada provador para cada amostra. Os perfis sensoriais de cada provador foram submetidos à classificação aglomerativa hierárquica para eventual exclusão de provadores desalinados (Figura 33). No exemplo representado o provador 1 foi excluído com uma distância euclidiana de 8,5, uma vez que a sua resposta se afastou muito das dos restantes membros do painel, que apresentam respostas mais homogéneas. Esta metodologia foi utilizada em todas as amostras. Posteriormente fez-se a média para cada atributo, usando os resultados do painel de provadores aceites para cada amostra.

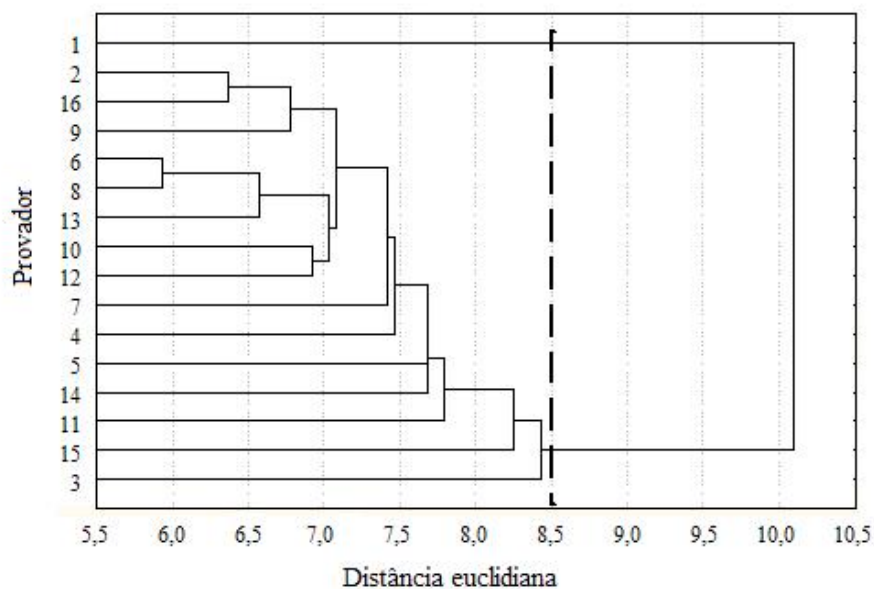


Figura 33 – Dendrograma exemplificativo (exclusão do provador 1).

Para comparar as amostras testemunho com as amostras congeladas, no que se refere aos parâmetros físicos e químicos foram efectuadas análises de variância a um factor (teste de Scheffé para comparação de médias) e, no que se refere aos parâmetros sensoriais, foi efectuada uma análise em componentes principais. Na análise dos dados usou-se o STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001).

6.3 – Resultados e discussão

6.3.1 – Impacto da congelação nas propriedades químicas do queijo

Os valores médios, desvios padrão, bem como os resultados da análise de variância referentes à humidade, gordura, azoto total, acidez, pH e às fracções azotadas (NSA%, NNP% e NA%) obtidas nas amostras testemunho, nas amostras congeladas a -10 °C e a -20 °C para os diferentes períodos de congelação (entre 2 e 12 meses) encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

		Amostras (temperatura de congelamento / tempo de congelamento em meses)											
T		-10 °C /2M	-10 °C /4M	-10 °C /6M	-10 °C /8M	-10 °C /10M	-10 °C /12M	-20 °C /2M	-20 °C /4M	-20 °C /6M	-20 °C /8M	-20 °C /10M	-20 °C /12M
Humidade % (m/m)	47,13 ^{abc} (0,66)	47,06 ^{abc} (1,66)	45,75 ^{bc} (0,61)	45,40 ^c (1,16)	46,03 ^{bc} (0,46)	46,66 ^{abc} (0,75)	46,35 ^{bc} (0,45)	47,58 ^{abc} (1,02)	47,78 ^{ab} (0,35)	47,04 ^{abc} (1,58)	47,44 ^{abc} (1,62)	47,64 ^{abc} (1,05)	48,77 ^a (1,21)
Gordura % (m/m)	24,6 ^a (0,8)	24,8 ^a (1,1)	24,1 ^a (0,5)	23,3 ^a (0,2)	25,0 ^a (0,9)	24,7 ^a (0,9)	24,8 ^a (1,1)	24,3 ^a (0,6)	24,5 ^a (0,7)	24,8 ^a (1,1)	24,6 ^a (0,4)	24,6 ^a (0,4)	24,5 ^a (0,4)
Azoto total % (m/m)	3,62 ^{ab} (0,26)	3,33 ^b (0,20)	3,66 ^{ab} (0,10)	3,68 ^{ab} (0,06)	3,70 ^{ab} (0,14)	3,51 ^{ab} (0,23)	3,60 ^{ab} (0,14)	3,60 ^{ab} (0,21)	3,56 ^{ab} (0,06)	3,46 ^{ab} (0,32)	3,75 ^a (0,14)	3,61 ^{ab} (0,17)	3,68 ^{ab} (0,10)
Fracção NSA%	29,8 ^{abc} (3,0)	35,4 ^a (3,1)	24,2 ^c (1,1)	35,8 ^a (2,4)	32,7 ^{ab} (3,7)	24,8 ^c (4,3)	29,1 ^{abc} (1,9)	29,9 ^{abc} (1,8)	25,6 ^c (0,4)	35,3 ^a (5,8)	26,1 ^{bc} (1,8)	25,1 ^c (1,5)	25,2 ^c (4,5)
Fracção NNP%	5,29 ^b (0,61)	5,22 ^b (1,24)	5,26 ^b (0,41)	5,78 ^{ab} (0,24)	6,26 ^{ab} (1,13)	6,85 ^a (0,74)	6,87 ^a (0,43)	5,77 ^{ab} (0,45)	5,24 ^b (0,30)	6,19 ^{ab} (0,81)	5,82 ^{ab} (0,29)	6,22 ^{ab} (0,53)	5,71 ^{ab} (0,68)
Fracção NA%	3,53 ^d (0,39)	3,95 ^{cd} (0,74)	4,08 ^{cd} (0,26)	4,42 ^{cd} (1,06)	4,35 ^{cd} (1,14)	6,61 ^b (1,00)	8,44 ^a (1,12)	3,55 ^d (0,69)	4,00 ^{cd} (0,61)	4,15 ^{cd} (0,21)	3,87 ^{cd} (0,41)	5,46 ^{bc} (0,38)	6,75 ^b (0,49)
Acidez ml NaOH N /100g	4,5 ^a (0,4)	4,5 ^a (0,3)	3,5 ^c (0,2)	4,1 ^{abc} (0,4)	4,0 ^{abc} (0,3)	3,8 ^{abc} (0,3)	3,9 ^{abc} (0,3)	3,8 ^{bc} (0,5)	3,8 ^{bc} (0,4)	4,3 ^{ab} (0,2)	4,1 ^{abc} (0,2)	3,9 ^{abc} (0,3)	4,0 ^{abc} (0,2)
pH	5,44 ^f (0,11)	5,84 ^{ab} (0,06)	5,66 ^{bcd} (0,16)	5,56 ^{cdef} (0,08)	5,46 ^{ef} (0,05)	5,74 ^{abc} (0,08)	5,60 ^{cdef} (0,05)	5,88 ^a (0,05)	5,70 ^{abcd} (0,11)	5,53 ^{def} (0,07)	5,49 ^{def} (0,08)	5,45 ^f (0,14)	5,47 ^{ef} (0,11)

a,b,c, ... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 9$ (teste de Scheffé).

No que se refere aos componentes maiores do queijo, as amostras congeladas não apresentaram diferenças significativas em relação ao testemunho ($P > 0,05$) à semelhança do que já fora relatado noutros estudos (Ramos *et al.*, 1987; Verdini e Rubiolo, 2002a; Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005). Quando comparadas com os outros ensaios, as amostras deste ensaio apresentaram, em termos gerais, valores de humidade inferiores e valores de gordura e proteína superiores. Os valores são semelhantes aos encontrados por outros autores (Dias, 1998; Alvarenga, 2000; Canada, 2001; Águas, 2002).

Os valores médios do pH e das fracções azotadas, das amostras testemunho e das amostras congeladas, foram agrupados em gráficos que podem ser observados na Figura 34. Os valores médios de pH das amostras (Figura 34a), sofreram um ligeiro aumento nos primeiros meses de congelação, com diferenças significativas ($P < 0,05$), tendo voltado a estabilizar no final do período de congelação. Esta tendência foi relatada por outros autores, embora com menor amplitude de variação observada (Tejada *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2006; Ribero *et al.*, 2007a). O ligeiro aumento nos valores de pH das amostras congeladas pode ser explicado pelo incremento das fracções azotadas devido à permanência da actividade das peptidases e amino-peptidases bacterianas, embora lenta, durante o tempo de armazenamento no estado congelado, produzindo um aumento nos oligo-peptídeos, péptidos, aminoácidos, aminas e amónia (Tejada *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2006).

Na Tabela 16 e na Figura 34b podemos observar que não se verificaram diferenças no que se refere à fracção NSA%, à semelhança dos resultados obtidos noutros estudos de congelação de queijo de ovelha (Tejada *et al.*, 2002). É importante referir que este indicador mede a extensão da proteólise e é independente da dimensão dos péptidos (Verdini *et al.*, 2005). Quanto às restantes fracções azotadas (NNP% e NA%), que representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto estão, as proteínas e os péptidos, a ser degradados em péptidos mais pequenos, observou-se que a congelação não conseguiu impedir os mecanismos da proteólise que conduzem à sua formação (Figura 34c e 34d). Estes continuam a processar-se, lentamente, à semelhança do que foi relatado na maior parte dos estudos que determinam o impacto da congelação nos processos proteolíticos (Ramos *et al.*, 1987; Bertola *et al.*, 1996b; Tejada *et al.*, 2002; Verdini e Rubiolo, 2002a; Verdini *et al.*, 2003; Graiver *et al.*, 2004; Van-Hekken *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2005; Verdini *et al.*, 2007). Este aumento nos valores das

fracções azotadas é, provavelmente, explicado pelos danos provocados pelos cristais de gelo, formados durante a congelação e recrystalizações, na rede proteica e pelas bactérias, através da lise e da libertação de enzimas para o meio (Graiver *et al.*, 2004).

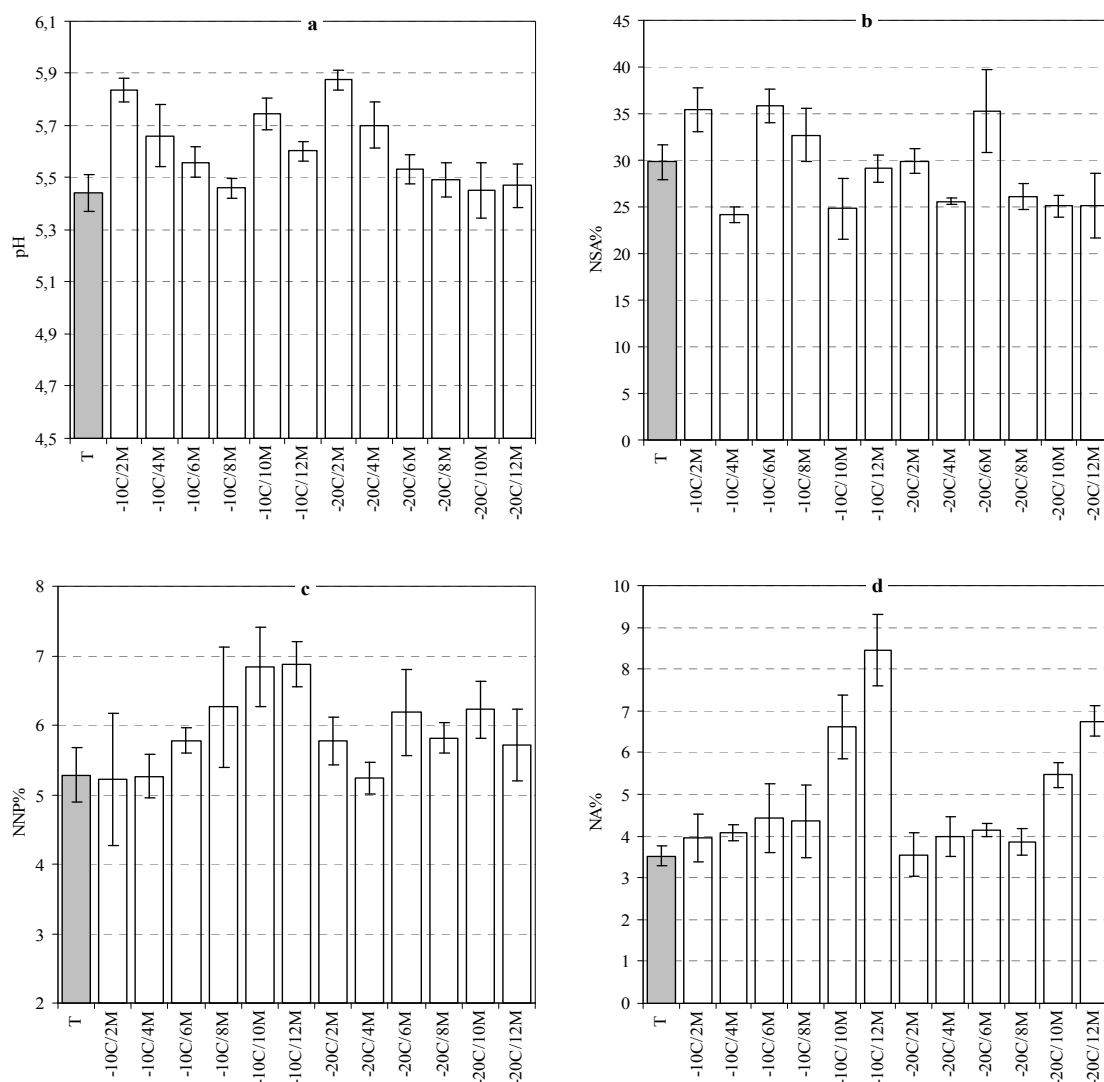


Figura 34 – Valores médios do pH (a), bem como das fracções NSA% (b) NNP% (c) e NA% (d) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

No caso do NNP%, observou-se um aumento gradual ao longo do tempo (a partir do quarto mês de congelação) nas amostras congeladas a -10 °C, levando a crer que o processo de proteólise, que envolve a produção de péptidos de menor peso molecular, continua activo à temperatura de -10 °C. O aumento de NNP% foi gradual, mas as diferenças encontradas, entre as amostras congeladas e as amostras testemunho, só foram significativas ao fim de 10 meses de congelação ($P < 0,05$). Pelo contrário,

amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentaram diferenças significativas em relação ao testemunho não congelado ($P > 0,05$).

No que se refere aos valores da fracção de NA%, estiveram estáveis até ao oitavo mês de congelação. A partir desse momento começaram a aumentar de uma forma bastante acentuada, com diferenças significativas ($P < 0,05$), de tal forma que, nos últimos quatro meses de conservação, os valores de azoto aminoacídico praticamente triplicaram em relação ao testemunho, no caso das amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e duplicaram nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes dados sugerem que, durante os primeiros 8 meses de congelação, as enzimas responsáveis pela produção de azoto aminoacídico apresentaram uma actividade quase nula, para ambas as temperaturas. A partir do 8º mês terá ocorrido um fenómeno que levou à activação destas enzimas. Tejada *et al.* (2002) também relataram um aumento das fracções azotadas, com diferenças significativas, a partir do 9º mês de congelação de queijos de ovelha. É sabido que os cristais de gelo continuam a crescer quando um alimento se encontra congelado a temperaturas superiores à temperatura de transição vítrea (Oliveira *et al.*, 1999), principalmente porque os equipamentos frigoríficos estão sujeitos a variações de temperatura. Neste caso, a explicação dos resultados pode estar no aumento dos cristais de gelo até dimensões tais que provoquem “stress” microbiano, levando à lise das células, conforme relatado por Choisy *et al.* (1987) como motivo para degradações profundas dos aminoácidos. Os resultados obtidos sugerem que as peptidases bacterianas e as aminopeptidases bacterianas continuaram activas, embora mais lentas, durante o tempo de armazenagem no estado congelado, provocando um aumento gradual de oligo-péptidos, aminoácidos, aminas e amónia (Tejada *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2006). Este aumento também pode estar relacionado com o facto de, durante a congelação, não haver crescimento microbiano e, conseqüentemente, estas substâncias não serem usadas como metabolitos (Prados *et al.*, 2006).

6.3.2 – Impacto da congelação nas propriedades físicas do queijo

Os valores médios, os desvios padrão, bem como os resultados da análise de variância referentes às propriedades físicas de cada tipo de amostra encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Caracterização física: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

Amostras (temperatura de congelação / tempo de congelação em meses)

	T	-10 °C /2M	-10 °C /4M	-10 °C /6M	-10 °C /8M	-10 °C /10M	-10 °C /12M	-20 °C /2M	-20 °C /4M	-20 °C /6M	-20 °C /8M	-20 °C /10M	-20 °C /12M
Dureza (N)	4,83 ^c (0,93)	4,93 ^c (1,72)	4,83 ^c (0,71)	8,16 ^b (0,89)	8,75 ^{ab} (0,48)	9,91 ^{ab} (1,80)	10,68 ^a (0,33)	4,85 ^c (0,45)	4,74 ^c (0,91)	5,65 ^c (0,43)	8,63 ^{ab} (0,62)	8,99 ^{ab} (0,97)	8,99 ^{ab} (0,56)
Adesividade (-N.s)	17,32 ^d (4,68)	19,83 ^{cd} (4,94)	24,94 ^{cd} (5,27)	34,65 ^{ab} (3,23)	33,37 ^{ab} (4,39)	34,96 ^{ab} (4,32)	34,32 ^{ab} (2,08)	17,78 ^d (1,52)	24,68 ^{cd} (4,19)	26,93 ^{bc} (3,12)	35,82 ^a (2,07)	34,78 ^{ab} (3,74)	35,30 ^a (2,11)
Coesividade	0,64 ^c (0,04)	0,69 ^{abc} (0,02)	0,70 ^{abc} (0,03)	0,66 ^{abc} (0,03)	0,65 ^{bc} (0,04)	0,69 ^{abc} (0,04)	0,67 ^{abc} (0,02)	0,70 ^{abc} (0,05)	0,73 ^a (0,04)	0,72 ^{ab} (0,03)	0,69 ^{abc} (0,04)	0,67 ^{abc} (0,02)	0,68 ^{abc} (0,02)
Módulo conservativo a 1 Hz (kPa)	12,49 ^c (0,63)	11,25 ^c (0,75)	11,92 ^c (2,61)	10,91 ^c (2,49)	19,50 ^a (2,84)	13,89 ^{bc} (1,05)	16,70 ^{ab} (1,43)	10,84 ^c (0,79)	12,04 ^c (1,11)	11,95 ^c (0,88)	11,79 ^c (0,96)	11,62 ^c (1,83)	11,71 ^c (1,22)
Tangente de dissipação a 1 Hz	0,39 ^{ab} (0,01)	0,43 ^{ab} (0,03)	0,44 ^a (0,04)	0,45 ^a (0,07)	0,35 ^b (0,01)	0,40 ^{ab} (0,01)	0,38 ^{ab} (0,01)	0,45 ^a (0,03)	0,39 ^{ab} (0,05)	0,42 ^{ab} (0,05)	0,40 ^{ab} (0,04)	0,38 ^{ab} (0,03)	0,39 ^{ab} (0,02)
logα	3,35 ^c (0,02)	3,31 ^c (0,03)	3,32 ^c (0,08)	3,29 ^c (0,09)	3,53 ^a (0,06)	3,40 ^{bc} (0,03)	3,46 ^{ab} (0,03)	3,30 ^c (0,03)	3,32 ^c (0,06)	3,33 ^c (0,03)	3,33 ^c (0,04)	3,32 ^c (0,07)	3,32 ^c (0,04)
b	0,70 ^{abc} (0,01)	0,68 ^{bc} (0,03)	0,66 ^c (0,04)	0,66 ^c (0,05)	0,74 ^a (0,01)	0,71 ^{abc} (0,01)	0,73 ^{ab} (0,01)	0,67 ^{bc} (0,02)	0,71 ^{abc} (0,04)	0,68 ^{bc} (0,03)	0,71 ^{abc} (0,03)	0,70 ^{abc} (0,03)	0,70 ^{abc} (0,02)
Cor da crosta - L*	58,0 ^e (1,0)	60,5 ^{cd} (1,3)	60,8 ^{bc} (3,8)	62,3 ^{abc} (3,3)	63,1 ^{ab} (1,4)	64,0 ^a (3,6)	64,0 ^a (1,4)	58,2 ^{de} (1,3)	60,0 ^{cd} (1,1)	61,3 ^{bc} (2,3)	61,3 ^{bc} (1,0)	60,2 ^{cde} (1,0)	60,1 ^{cde} (1,2)
Cor da crosta - a*	-2,54 ^{ef} (0,17)	-2,08 ^{abcde} (0,38)	-1,90 ^{abcd} (0,44)	-1,53 ^a (0,91)	-1,47 ^a (0,58)	-1,85 ^{abc} (0,34)	-1,7 ^{ab} (0,36)	-2,44 ^{cd} (0,52)	-2,84 ^f (0,73)	-2,53 ^{def} (0,52)	-2,30 ^{bcd} (0,42)	-2,24 ^{bcd} (0,74)	-2,22 ^{bcd} (0,35)
Cor da crosta - b*	18,64 ^c (1,00)	19,01 ^{bc} (1,50)	21,44 ^a (0,89)	20,99 ^{ab} (1,21)	20,10 ^{abc} (1,99)	19,83 ^{abc} (2,14)	19,97 ^{abc} (2,06)	18,80 ^c (3,21)	19,50 ^{abc} (1,67)	19,72 ^{abc} (1,19)	19,79 ^{abc} (1,91)	19,73 ^{abc} (1,50)	19,47 ^{abc} (1,15)
Cor da pasta - L*	76,0 ^{def} (1,0)	75,7 ^{ef} (0,3)	76,2 ^{cdef} (0,8)	76,4 ^{bcd} (2,7)	77,5 ^{ab} (1,1)	76,4 ^{bcd} (0,8)	75,8 ^{ef} (1,1)	75,3 ^f (0,8)	77,2 ^{bc} (0,7)	78,8 ^a (0,6)	78,5 ^a (0,7)	76,8 ^{bcd} (0,9)	77,2 ^{bcd} (0,5)
Cor da pasta - a*	-4,26 ^{bcd} (0,24)	-3,83 ^a (0,20)	-4,61 ^c (0,26)	-4,57 ^{de} (0,14)	-3,84 ^a (0,42)	-4,33 ^{cde} (0,32)	-4,43 ^{de} (0,32)	-4,00 ^{abc} (0,21)	-4,24 ^{bcd} (0,16)	-3,99 ^{abc} (0,14)	-3,80 ^a (0,49)	-4,01 ^{abc} (0,35)	-3,95 ^{ab} (0,38)
Cor da pasta - b*	14,11 ^b (1,01)	15,40 ^a (0,98)	15,30 ^a (0,98)	15,58 ^a (0,69)	15,97 ^a (1,02)	15,27 ^a (0,89)	15,88 ^a (0,83)	13,57 ^{bc} (0,68)	13,01 ^c (0,37)	13,73 ^{bc} (0,55)	13,73 ^{bc} (1,52)	12,92 ^c (1,35)	13,33 ^{bc} (1,27)

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 9$, para a cor $n = 30$ (teste de Scheffé).

No que se refere às propriedades reológicas, em termos gerais, observou-se um endurecimento na estrutura nas amostras congeladas a -10 °C (a partir do 6º mês), bem como nas amostras congeladas a -20 °C (a partir do 8º mês). Por outro lado, em relação à cor, as amostras congeladas a -10 °C sofreram um forte impacto, ao passo que as amostras congeladas a -20 °C apresentaram apenas algumas alterações pontuais com diferenças significativas.

Os parâmetros de textura (Figura 35a e 35b) mostraram uma tendência para o endurecimento já relatada no ensaio anterior. No entanto, neste ensaio conseguiu-se observar claramente que, só a partir de um determinado momento é que essa tendência de endurecimento das amostras se começa a observar. Quando a temperatura de congelação foi -10 °C o aumento de dureza só começou a apresentar diferenças significativas ($P < 0,05$) ao fim de 6 meses de congelação e, depois do 10º mês de congelação, observou-se um aumento da dureza para valores superiores ao dobro do valor de dureza da amostra não congelada. Nas amostras congeladas a -20 °C, só ao fim de 8 meses é que a dureza apresentou diferenças significativas e nunca se verificou um aumento de dureza duplo quando comparado com a amostra testemunho. O comportamento observado para a variação da adesividade foi semelhante.

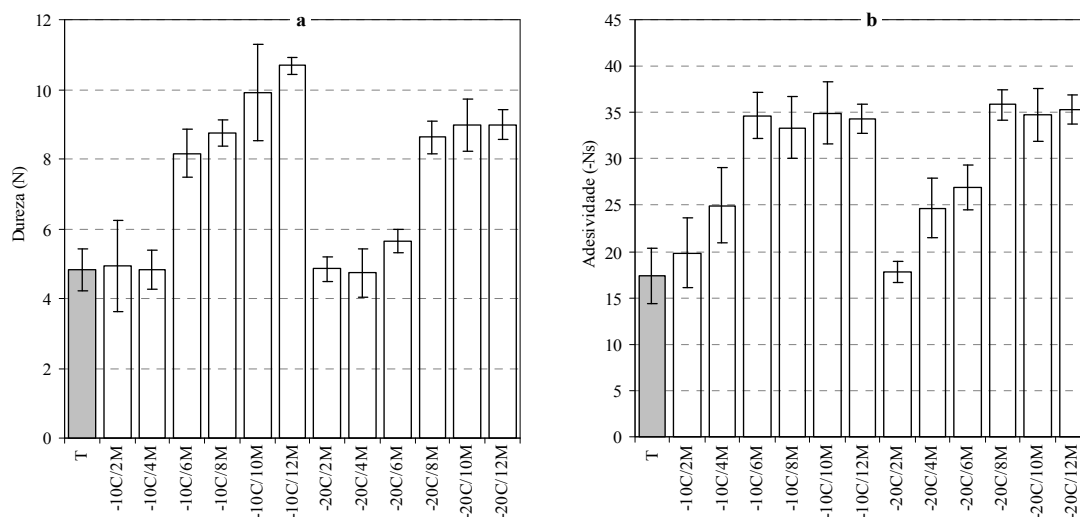


Figura 35 – Valores médios dos parâmetros de dureza (a) e adesividade (b) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Como vimos anteriormente, o endurecimento da estrutura de um queijo submetido à congelação foi observado por outros autores (Diefes *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 1996b) e explicado pela desidratação local das proteínas, com conseqüentes alterações na sua

estrutura, por formação de grânulos de gordura e compactação das proteínas devido às pontes dissulfureto formadas. O aumento das dimensões dos cristais de gelo, provocado pela recristalização (observada em longos períodos de congelação) dificulta a recolocação das moléculas de água na interface lípido-caseína após a descongelação, diminuindo o seu efeito lubrificante e provocando uma estrutura mais dura no queijo.

Para quantificar as propriedades viscoelásticas, foram realizados testes SAOS “small amplitude oscillatory stress”. Como foi referido anteriormente, antes dos varrimentos de frequência, efectuaram-se os varrimentos de tensão para determinar a tensão que garantisse que os espectros mecânicos fossem obtidos na zona viscoelástica linear. Na Figura 36 podem-se observar os varrimentos de tensão realizados às frequências de 0,1, 1 e 10Hz.

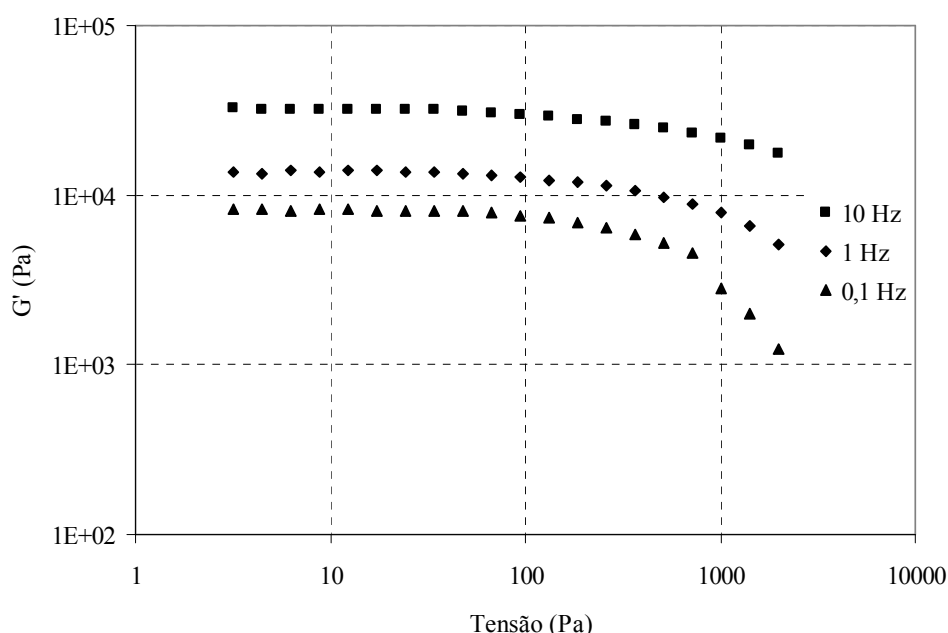


Figura 36 – Varrimento de tensões médios.

Este teste teve uma ligeira diferença em relação aos ensaios anteriores, que residiu no facto de se terem usado três frequências no varrimento de tensão: 0,1, 1 e 10 Hz. É importante referir que foram efectuados varrimentos de tensão antes de ensaiar cada grupo de 3 amostras idênticas, os resultados foram sempre semelhantes e, por esse motivo, para facilitar a apreciação, optou-se por elaborar um gráfico com os valores médios. Apesar dos valores de G' serem superiores quando se usaram frequências mais elevadas, os resultados foram idênticos aos ensaios anteriores, ou seja, a tensão de 50 Pa foi usada para realizar os espectros mecânicos de amostras de queijo curado, garantindo

assim um varrimento de frequências na zona viscoelástica linear. Na Figura 37 podem-se observar os espectros mecânicos obtidos a partir dos varrimentos de frequência das amostras congeladas a -10 °C, ao longo dos diferentes tempos de armazenamento.

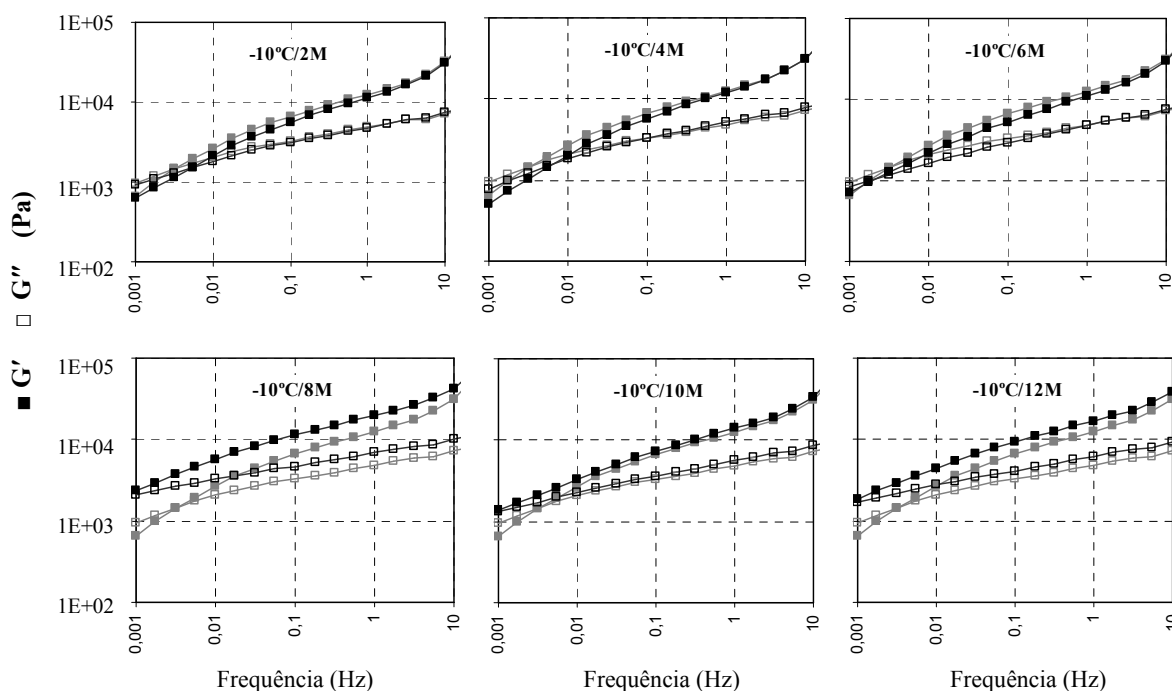


Figura 37 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho (—■—) e das amostras congeladas a -10 °C (—■—) para diferentes períodos de congelação em meses (M).

Tomando o espectro mecânico médio da amostra testemunho como termo de comparação, a cinzento nas figuras, estas caracterizam-se por apresentarem uma estrutura muito débil, com uma forte dependência do G' e G'' em relação à frequência e com um ponto crítico ($G' = G''$) bem pronunciado, frequentemente descrita como uma estrutura típica de suspensões de macromoléculas (Franco *et al.*, 1998). Este ponto crítico, que caracteriza uma estrutura débil referida anteriormente, foi detectado no espectro da amostra testemunho a uma frequência de cerca de 0,003 Hz. Quanto às amostras congeladas a -10 °C, observou-se que, nos primeiros quatro meses, o ponto crítico se manteve em valores de frequência semelhantes, ou seja à volta de 0,003 Hz, no sexto mês de congelação o ponto crítico, desceu para uma frequência de cerca de 0,002 Hz, significando que a estrutura começou a ficar mais elástica.

Ao fim do oitavo mês de congelação deixou de ser detectado o ponto crítico nos espectros mecânicos, significando que a estrutura ficou mais firme e mais própria de um gel fraco. Nas amostras com mais de 8 meses de congelação também se verificou uma diminuição da dependência dos módulos em relação à frequência, que também é

característica de estruturas mais firmes. Os resultados da análise de variância dos valores de $G'_{1\text{Hz}}$ foram semelhantes: nas amostras congeladas até 6 meses (inclusive) não foram encontradas diferenças significativas em relação às amostras testemunho; A partir do oitavo mês, observaram-se valores superiores de módulo elástico (1 Hz) nas amostras congeladas em relação às amostras testemunho, com diferenças significativas ($P < 0,05$) para as amostras -10C/8M e -10C/12M, mas sem diferenças significativas para a amostra -10C/10M.

Na Figura 38, observam-se os espectros mecânicos das amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo dos diferentes tempos de armazenamento.

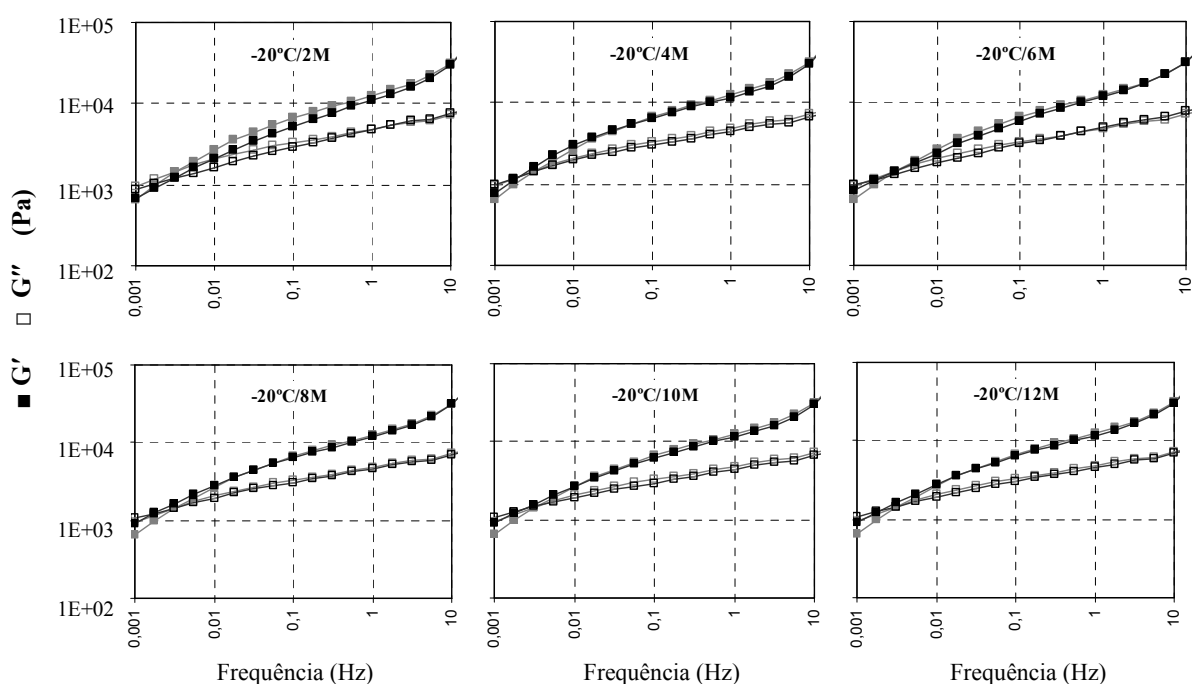


Figura 38 – Espectros mecânicos médios das amostras testemunho (—■—) e das amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (—■—) para diferentes períodos de congelação em meses (M).

Todas as amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram propriedades semelhantes às amostras testemunho, nomeadamente apresentaram uma elevada dependência dos módulos em relação à frequência e um ponto crítico ($G' = G''$) característico de matrizes com uma estrutura débil. Os espectros mecânicos das amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram todos muito semelhantes ao da amostra testemunho, como se pode observar na Figura 38 e, a partir da análise de variância os valores de $G'_{1\text{Hz}}$, verificou-se que as amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentaram diferenças significativas em relação ao testemunho ($P > 0,05$).

Resumindo, os espectros mecânicos de amostras congeladas a -10 °C foram claramente afectados a partir do oitavo mês de congelamento, enquanto que as amostras congeladas a -20 °C mantiveram os espectros mecânicos sem alterações ao longo dos 12 meses de congelamento. Com este ensaio, ficou bem patente que as alterações reológicas sofridas por queijos, durante a congelamento, não foram devidas ao processo de proteólise o qual não é totalmente interrompido durante este período, mas sim devidas à desidratação e compactação da estrutura proteica explicada anteriormente (Diefes *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 1996b). Caso a proteólise fosse um fenómeno importante na explicação das mudanças estruturais durante a congelamento, teria sido relatado um amolecimento dos queijos congelados.

Neste momento, é importante salientar que os processos de endurecimento ocorridos durante a congelamento, foram detectados de uma forma mais eficaz pela determinação da dureza, em relação ao módulo elástico, em ambos os Capítulos 5 e 6. No entanto, quando esteve em causa a monitorização do amolecimento ocorrido durante o processo de cura, devido à proteólise e abaixamento de pH (Capítulo 4), observou-se que as medições reológicas fundamentais foram mais eficazes na discriminação das mudanças ocorridas. Estas observações sugerem que, apesar de estas duas técnicas reológicas poderem ser consideradas um pouco redundantes, complementam-se e, em estudos envolvendo a monitorização reológica de queijo, não devem deixar de ser usadas em conjunto.

Quanto à cor da crosta, a congelamento causou um impacto muito significativo nessa característica nas amostras congeladas a -10 °C, observando-se diferenças significativas entre o testemunho e praticamente todas as amostras congeladas ($P < 0,05$), com maior incidência nos parâmetros de cor da crosta L^* e a^* . No entanto, comparando a cor da crosta das amostras congeladas a -20 °C com as amostras testemunho, praticamente não se encontraram diferenças significativas ($P > 0,05$) (Tabela 17). A evolução dos valores de cor da crosta ao longo do período de congelamento, bem como a sua comparação com a amostra não congelada, pode ser observada na Figura 39.

A luminosidade da crosta das amostras congeladas apresentou valores superiores às amostras testemunho (Figura 39a) e observou-se uma subida gradual da luminosidade com o tempo de congelamento, significando que, as amostras congeladas foram-se tornando cada vez mais esbranquiçadas. Esta lesão foi aumentando com o tempo de congelamento e foi mais evidente a -10 °C. Apesar deste fenómeno ter sido mais acentuado

nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, com diferenças significativas entre os valores médios obtidos ($P < 0,05$), esta tendência, também se observou, embora de uma forma mais ligeira, nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

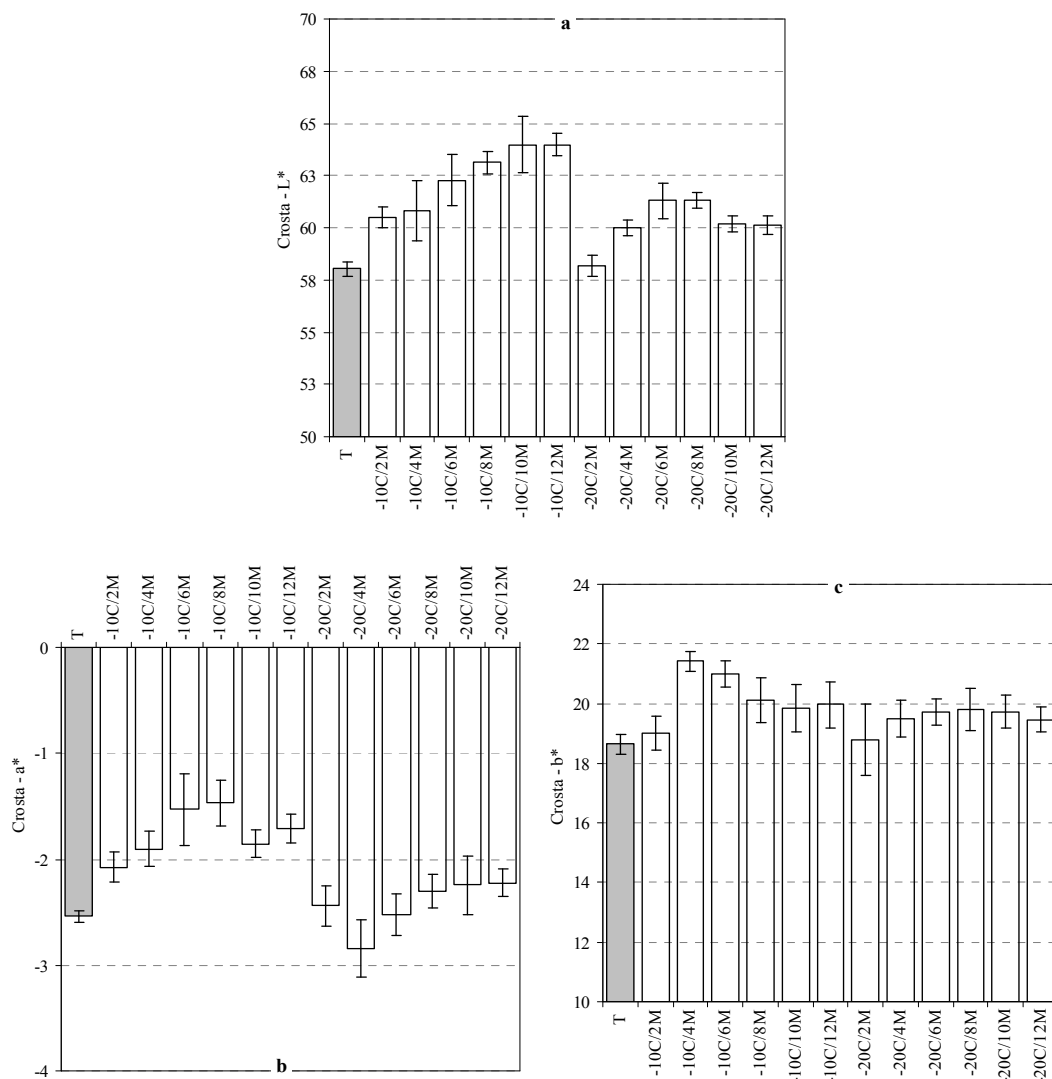


Figura 39 – Valores médios dos parâmetros de cor da crosta L* (a), a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

As lesões, ao nível da cor da crosta, das amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, também se observaram com clareza ao nível do parâmetro a*. Nestas amostras, observou-se um aumento dos valores do parâmetro a*, com diferenças significativas entre os valores médios obtidos ($P < 0,05$), o que significa que a crosta das amostras congeladas se tornou menos esverdeada (e mais avermelhada). Em relação ao parâmetro de cor da crosta b*, observaram-se valores superiores nas amostras congeladas em relação às

amostras testemunho, apesar de só se terem encontrado diferenças significativas ($P < 0,05$) nas amostras congeladas durante 4 e 6 meses a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assim, verificou-se uma ligeira tendência para o amarelecimento da crosta das amostras congeladas.

Na Figura 40 pode-se observar o comportamento das amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, quanto à cor da pasta.

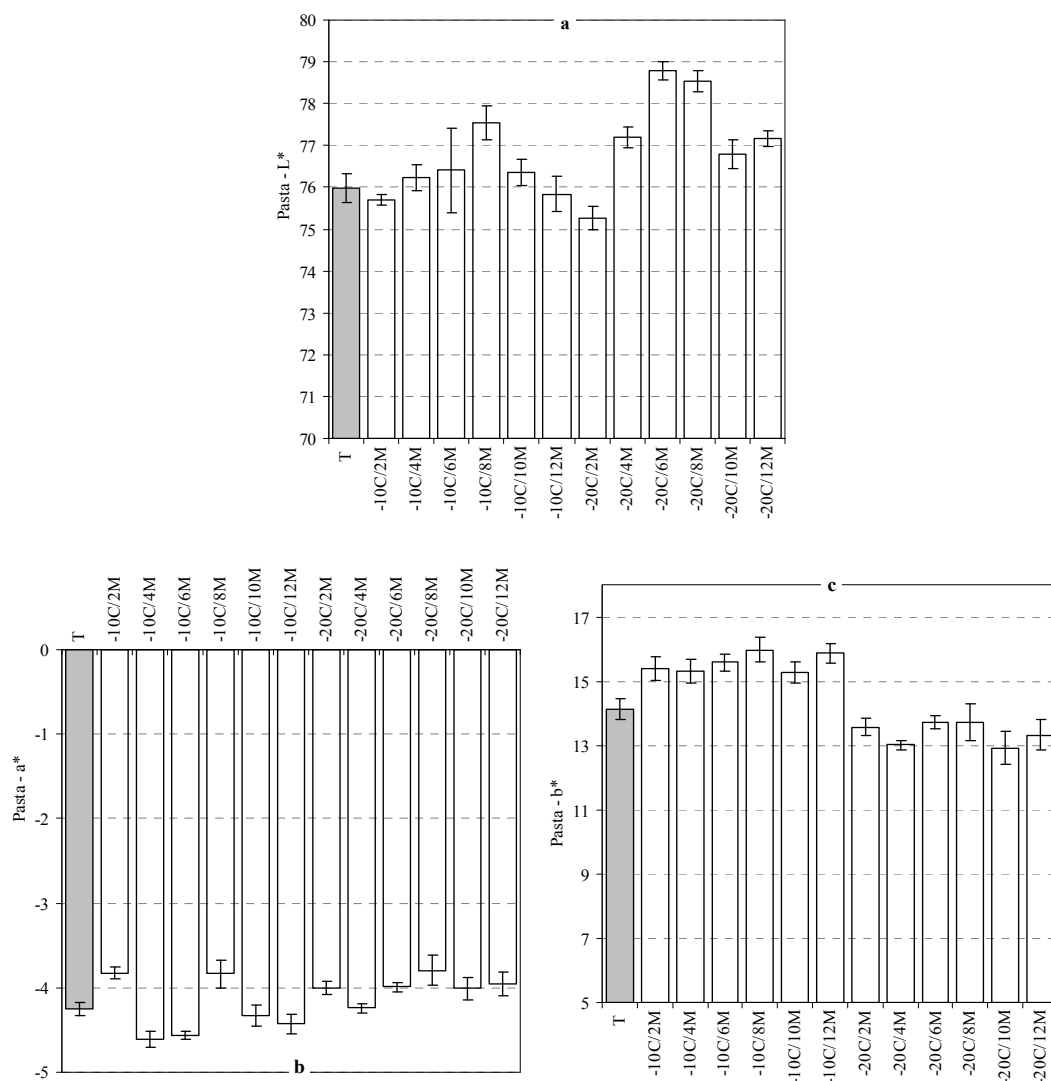


Figura 40 – Valores médios dos parâmetros de cor da pasta L* (a), a* (b) e b* (c) nas diferentes amostras. A cinzento destaca-se a amostra testemunho. Barras de erro em Y representam o intervalo de confiança a 95%.

Comparando os gráficos da Figura 40 com os da Figura 39, pode-se observar que a congelação não causou danos assinaláveis ao nível da cor da pasta. A cor da pasta foi semelhante nas amostras congeladas em relação às amostras testemunho e não apresentou diferenças significativas entre os resultados ($P > 0,05$). Apesar disso, foi

possível detectar um ligeiro aumento do parâmetro de cor da pasta L^* , mais evidente nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um ligeiro aumento do parâmetro de cor da pasta b^* , nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes dados já tinham sido observados no ensaio 2, embora de uma forma mais pronunciada. Assim, podemos dizer que a congelação afectou os parâmetros de cor da pasta do queijo e observou-se que a pasta se tornou mais luminosa e mais amarelada. Estas alterações são bastante ligeiras, indicando que a congelação afecta principalmente a cor da superfície dos queijos.

6.3.3 – Impacto da congelação nas propriedades sensoriais do queijo

Os valores médios e desvios padrão, bem como os resultados da análise de variância relativos às propriedades sensoriais de cada tipo de amostra, encontram-se na Tabela 18. Alguns atributos usados nesta análise carecem de informação adicional para serem percebidos. Assim, a espessura da crosta e a ligação da crosta à pasta estão relacionadas com lesões superficiais provocadas pela secagem superficial durante a congelação. A cor da pasta é a sensação percebida pelo órgão da visão e varia entre branca e ligeiramente amarelada (NP 1922, 1985). Os olhos são a propriedade visual associada a uma contaminação por microrganismos produtores de gás. O cheiro amoniacal é o odor não-característico associado geralmente a alterações do produto e a processos de proteólise bastante profundos. A textura é o conjunto de propriedades, mecânicas, geométricas e de superfície, perceptíveis mediante receptores tácteis e, eventualmente, por receptores visuais e auditivos (ISO 5492, 1992), sendo a textura granulosa relacionada com a percepção do tamanho e da forma de partículas e a textura amanteigada relacionada com queijo que entorna, ou seja, queijo que ao partir ao meio, passado algum tempo, cria uma ligeira barriga (ISO 5492, 1992). Em relação aos sabores elementares e picante, estão definidos na ISO 5492 (1992), sendo o sabor picante associado à sensação gustativa de picadas. O “flavour” é o conjunto completo das sensações olfactivas, gustativas e trigeminais percebidas durante a degustação (ISO 5492, 1992). A persistência é a sensação olfacto-gustativa remanescente semelhante àquela detectada quando o produto estava na boca e cujo tempo de duração pode ser medido, enquanto que o gosto residual é uma sensação olfacto-gustativa que aparece após eliminação do produto, que difere das sensações detectadas quando o produto estava na boca (ISO 5492, 1992).

Tabela 18 – Avaliação sensorial: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

		Amostras (temperatura de congelamento / tempo de congelamento em meses)																									
Aspecto	T	-10°C /2M		-10°C /4M		-10°C /6M		-10°C /8M		-10°C /10M		-10°C /12M		-20°C /2M		-20°C /4M		-20°C /6M		-20°C /8M		-20°C /10M		-20°C /12M			
		Espeçura da casca	4,2 (0,50) ^a	4,1 (0,10) ^a	4,6 (0,31) ^a	4,9 (0,50) ^a	5,3 (0,56) ^a	3,9 (1,31) ^a	4,7 (0,03) ^a	4,2 (0,39) ^a	3,9 (0,43) ^a	4,0 (0,36) ^a	4,5 (0,58) ^a	3,9 (0,38) ^a	4,1 (0,01) ^a	6,7 (0,13) ^a	6,6 (0,56) ^{ab}	5,8 (0,13) ^{ab}	6,1 (0,10) ^{ab}	5,2 (0,54) ^b	5,2 (0,54) ^b	6,1 (0,47) ^{ab}	5,8 (0,03) ^{ab}	6,9 (0,92) ^a	6,2 (0,42) ^{ab}	6,5 (0,36) ^{ab}	6,3 (0,13) ^{ab}
Ligaço crosta/pasta	5,3 (0,41) ^a	4,0 (0,44) ^a	5,0 (0,21) ^a	5,4 (0,75) ^a	4,7 (0,23) ^a	4,5 (0,66) ^a	4,9 (0,06) ^a	4,7 (0,42) ^a	4,3 (0,31) ^a	5,1 (0,51) ^a	4,8 (0,08) ^a	4,6 (0,38) ^a	4,7 (0,01) ^a	4,0 (0,25) ^a	3,3 (1,34) ^a	3,8 (0,20) ^a	4,8 (0,15) ^a	4,0 (0,58) ^a	3,4 (0,94) ^a	4,0 (0,07) ^a	3,7 (0,32) ^a	3,5 (0,78) ^a	4,8 (0,88) ^a	3,7 (0,19) ^a	4,8 (0,88) ^a	3,8 (0,01) ^a	
Olhos	3,1 (0,32) ^b	3,3 (0,49) ^{ab}	3,9 (0,20) ^{ab}	4,3 (0,75) ^{ab}	4,9 (0,18) ^a	3,8 (0,56) ^{ab}	4,2 (0,07) ^{ab}	3,5 (0,62) ^{ab}	3,6 (0,37) ^{ab}	3,3 (0,42) ^{ab}	3,3 (0,40) ^{ab}	3,1 (0,47) ^{ab}	3,3 (0,02) ^{ab}	2,4 (0,39) ^b	2,7 (0,50) ^{ab}	2,7 (0,29) ^{ab}	3,2 (0,11) ^{ab}	3,7 (0,10) ^a	3,1 (0,15) ^{ab}	3,2 (0,06) ^{ab}	2,9 (0,33) ^{ab}	2,7 (0,44) ^{ab}	2,7 (0,44) ^{ab}	2,7 (0,19) ^{ab}	2,7 (0,19) ^{ab}	2,6 (0,01) ^{ab}	
Amoniacal	6,7 (0,29) ^a	6,3 (0,74) ^{abc}	6,1 (0,10) ^{abc}	4,8 (0,14) ^{bc}	4,4 (0,19) ^c	5,2 (0,05) ^{abc}	5,1 (0,08) ^{abc}	5,9 (0,59) ^{abc}	6,5 (0,13) ^{ab}	5,8 (0,53) ^{abc}	6,2 (0,63) ^{abc}	5,5 (1,04) ^{abc}	6,0 (0,02) ^{abc}	4,5 (0,35) ^a	4,6 (0,30) ^a	4,1 (0,19) ^a	3,8 (0,48) ^a	3,6 (0,38) ^a	3,9 (0,03) ^a	3,8 (0,03) ^a	4,4 (0,55) ^a	4,0 (0,20) ^a	4,2 (0,22) ^a	4,1 (0,37) ^a	4,3 (0,02) ^a		
Picante	2,7 (0,22) ^{ab}	2,4 (0,03) ^b	3,0 (0,45) ^{ab}	3,6 (0,19) ^a	3,3 (0,45) ^{ab}	3,2 (0,08) ^{ab}	3,3 (0,05) ^{ab}	3,0 (0,31) ^{ab}	2,7 (0,04) ^{ab}	3,2 (0,44) ^{ab}	2,9 (0,14) ^{ab}	2,9 (0,11) ^{ab}	2,9 (0,01) ^{ab}	5,2 (0,37) ^a	5,5 (0,12) ^a	5,3 (0,31) ^a	4,6 (0,77) ^a	4,9 (0,23) ^a	4,5 (0,66) ^a	4,8 (0,09) ^a	4,7 (0,22) ^a	4,9 (0,10) ^a	5,0 (0,26) ^a	4,9 (0,02) ^a			
Doce	3,5 (0,36) ^b	4,1 (0,32) ^{ab}	3,6 (0,03) ^{ab}	3,9 (0,45) ^{ab}	4,7 (0,22) ^a	4,0 (0,05) ^{ab}	4,1 (0,02) ^{ab}	3,7 (0,33) ^{ab}	3,2 (0,14) ^b	3,9 (0,52) ^{ab}	3,8 (0,25) ^{ab}	3,7 (0,10) ^{ab}	3,7 (0,02) ^{ab}	3,5 (0,36) ^a	3,7 (0,32) ^{ab}	3,2 (0,17) ^{ab}	3,4 (0,43) ^{ab}	4,2 (0,59) ^a	3,9 (0,31) ^b	5,9 (0,67) ^a	6,0 (0,28) ^a	5,7 (0,19) ^a	5,8 (0,68) ^a	5,8 (0,03) ^a			
Salgado	3,1 (0,26) ^b	3,7 (0,32) ^{ab}	3,2 (0,17) ^{ab}	3,4 (0,43) ^{ab}	4,2 (0,59) ^a	3,5 (0,16) ^{ab}	3,6 (0,02) ^{ab}	3,1 (0,38) ^{ab}	3,1 (0,26) ^b	3,3 (0,06) ^{ab}	3,3 (0,21) ^{ab}	3,2 (0,06) ^{ab}	3,2 (0,03) ^{ab}	6,4 (0,34) ^a	5,9 (0,30) ^a	5,5 (0,18) ^{ab}	5,5 (0,75) ^{ab}	3,9 (0,31) ^b	5,2 (0,26) ^{ab}	5,0 (0,06) ^{ab}	5,9 (0,67) ^a	6,0 (0,28) ^a	5,7 (0,19) ^a	5,8 (0,68) ^a	5,8 (0,03) ^a		
Ácido	2,9 (0,17) ^a	3,4 (0,19) ^a	3,2 (0,44) ^a	3,1 (0,36) ^a	3,5 (0,37) ^a	3,1 (0,26) ^a	3,3 (0,01) ^a	3,1 (0,15) ^a	2,9 (0,18) ^a	3,1 (0,23) ^a	2,8 (0,21) ^a	2,8 (0,13) ^a	2,9 (0,00) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			
Amargo	4,5 (0,60) ^a	4,5 (0,40) ^a	4,4 (0,15) ^a	4,2 (0,82) ^a	4,2 (0,41) ^a	4,1 (0,18) ^a	4,2 (0,01) ^a	4,5 (0,24) ^a	4,2 (0,49) ^a	4,5 (0,10) ^a	4,6 (0,09) ^a	4,3 (0,21) ^a	4,4 (0,02) ^a	2,9 (0,17) ^a	3,4 (0,19) ^a	3,2 (0,44) ^a	3,1 (0,36) ^a	3,5 (0,37) ^a	3,1 (0,26) ^a	3,3 (0,01) ^a	3,1 (0,15) ^a	2,8 (0,21) ^a	2,8 (0,13) ^a	2,9 (0,00) ^a			
Característico	6,0 (0,75) ^{ab}	5,9 (1,03) ^{ab}	5,3 (0,12) ^{ab}	4,9 (0,45) ^{ab}	3,8 (0,50) ^b	4,7 (0,11) ^{ab}	4,7 (0,09) ^{ab}	5,7 (1,21) ^{ab}	6,6 (0,32) ^a	5,9 (0,16) ^{ab}	6,6 (0,31) ^a	5,8 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,04) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			
Azedo	6,0 (0,75) ^{ab}	5,9 (1,03) ^{ab}	5,3 (0,12) ^{ab}	4,9 (0,45) ^{ab}	3,8 (0,50) ^b	4,7 (0,11) ^{ab}	4,7 (0,09) ^{ab}	5,7 (1,21) ^{ab}	6,6 (0,32) ^a	5,9 (0,16) ^{ab}	6,6 (0,31) ^a	5,8 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,04) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			
Persistência	6,0 (0,75) ^{ab}	5,9 (1,03) ^{ab}	5,3 (0,12) ^{ab}	4,9 (0,45) ^{ab}	3,8 (0,50) ^b	4,7 (0,11) ^{ab}	4,7 (0,09) ^{ab}	5,7 (1,21) ^{ab}	6,6 (0,32) ^a	5,9 (0,16) ^{ab}	6,6 (0,31) ^a	5,8 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,04) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			
Gosto residual	6,0 (0,75) ^{ab}	5,9 (1,03) ^{ab}	5,3 (0,12) ^{ab}	4,9 (0,45) ^{ab}	3,8 (0,50) ^b	4,7 (0,11) ^{ab}	4,7 (0,09) ^{ab}	5,7 (1,21) ^{ab}	6,6 (0,32) ^a	5,9 (0,16) ^{ab}	6,6 (0,31) ^a	5,8 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,04) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			
Classificação pior/melhor	6,0 (0,75) ^{ab}	5,9 (1,03) ^{ab}	5,3 (0,12) ^{ab}	4,9 (0,45) ^{ab}	3,8 (0,50) ^b	4,7 (0,11) ^{ab}	4,7 (0,09) ^{ab}	5,7 (1,21) ^{ab}	6,6 (0,32) ^a	5,9 (0,16) ^{ab}	6,6 (0,31) ^a	5,8 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,04) ^a	5,2 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a	5,2 (0,27) ^a	5,3 (0,58) ^a	4,7 (0,30) ^a	5,2 (0,18) ^a	5,5 (0,16) ^a	5,6 (0,25) ^a	5,7 (0,32) ^a	5,7 (0,28) ^a	5,6 (0,03) ^a			

^{a,b,c} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 3$, (teste de Scheffé).

Na análise de variância dos resultados que se encontram na Tabela 18 foi utilizado o teste de comparação de médias de Scheffé. No entanto deve ter-se algumas reservas no uso dos resultados desta análise, uma vez que foram obtidos com os resultados de apenas 3 réplicas. Por esse motivo, elaboraram-se perfis sensoriais (Figura 41, 42 e 43) em que os atributos foram agrupados em três conjuntos: aspecto e textura, cheiro e sabor e “flavour”. Para facilidade de interpretação, em cada perfil sensorial só foram incluídas 3 amostras: a amostra testemunho, uma amostra congelada por um período curto (2 meses) e uma amostra congelada por um período longo (12 meses).

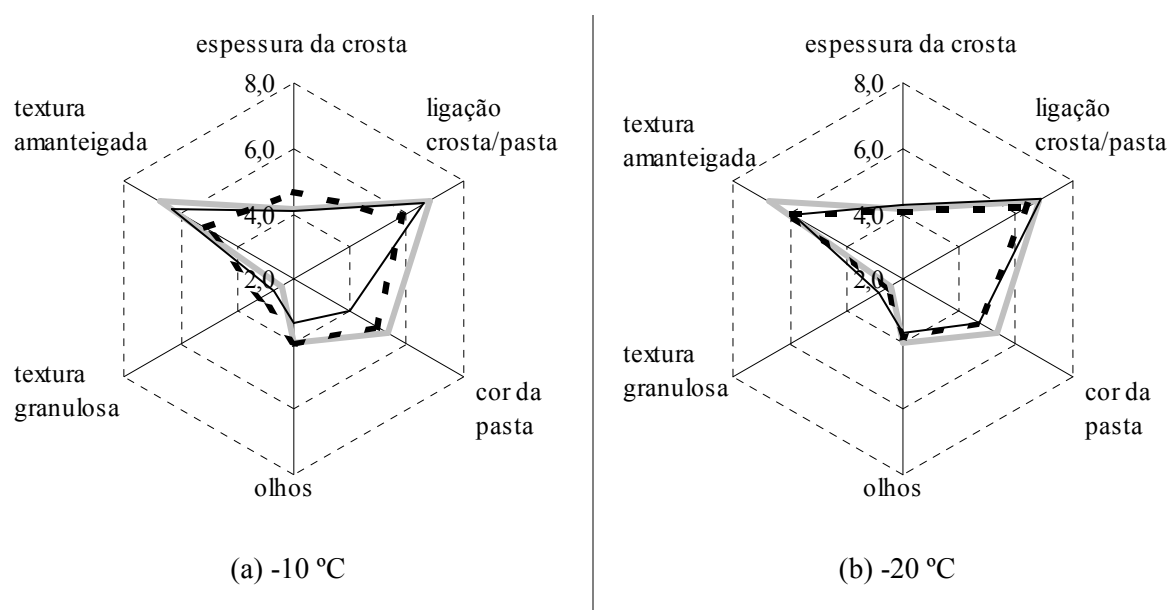


Figura 41 – Valores médios dos atributos de aspecto e textura das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (---) e congeladas durante 12 meses (· · ·), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).

Os atributos de textura das amostras congeladas a -10 °C (Figura 41a) apresentaram-se ligeiramente alterados em relação às amostras testemunho, quando são considerados longos períodos de congelação (12 meses), no entanto, se esses períodos forem curtos (2 meses), não se encontraram diferenças sensoriais relativas à textura. O aumento dos valores do atributo textura granulosa, em ambas as amostras congeladas a -10 °C e -20 °C (Figura 41a e 41b), foi, no entanto, mais evidente para longos tempos de congelação e com temperaturas de congelação -10 °C. Estes elementos reforçam os dados obtidos nos ensaios reológicos de dureza e módulo conservativo e complementam a explicação desses dados. O facto da textura se apresentar mais granulosa corrobora a explicação defendida por vários autores (Diefes *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 1996b) que atribuíram à desidratação local das proteínas a quebra da estrutura proteica, permitindo o contacto

entre os pequenos glóbulos de gordura, levando à formação dos grânulos que se percebem em termos sensoriais. Estes grânulos formaram-se nas amostras congeladas induzindo directamente um aumento no atributo textura granulosa e, indirectamente, numa diminuição do atributo textura amanteigada. Também foi possível observar uma diminuição da textura amanteigada em todas as amostras, no entanto, mais pronunciada para amostras congeladas a -10 °C por longos períodos de congelação. Em estudos de outros queijos de ovelha envolvendo congelação a -20 °C, também se observou uma diminuição da cremosidade (Tejada *et al.*, 2000; Prados *et al.*, 2006) e um aumento da textura granulosa (Tejada *et al.*, 2000).

É importante referir que, apesar de diferenças muito ligeiras, o perfil sensorial de aspecto e textura das amostras congeladas a -20 °C (Figura 41a) é muito próximo do obtido para a amostra testemunho. A excepção apresentou-se no atributo cor da pasta, em que as amostras congeladas apresentaram valores inferiores às amostras testemunho, indicando que a pasta das amostras congeladas (principalmente a -20 °C), foi classificada como mais esbranquiçada do que das amostras testemunho.

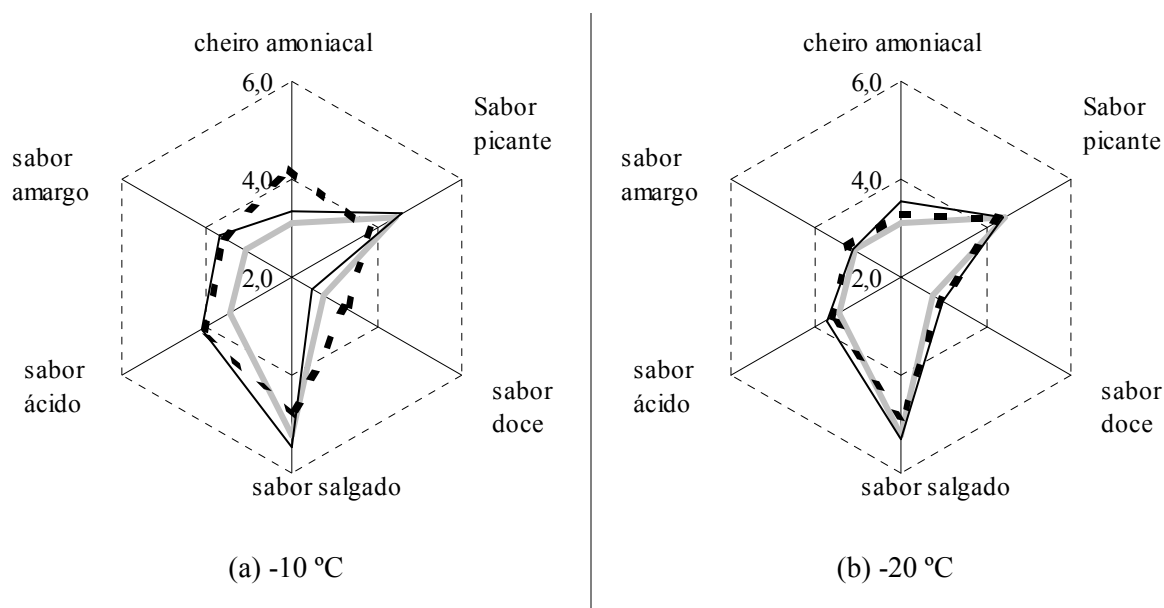


Figura 42 – Valores médios dos atributos de cheiro e sabor das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (---) e congeladas durante 12 meses (· · ·), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).

Nos atributos de cheiro e sabor, também se verificou uma coincidência bastante pronunciada entre a amostra testemunho e as amostras congeladas a -20 °C, quer por períodos curtos quer por períodos longos (Figura 42b): a semelhança dos três traçados foi bastante evidente. No entanto, nas amostras congeladas a -10 °C observaram-se

diferenças evidentes (Figura 42a): o aumento do cheiro amoniacal, principalmente observado nas amostras congeladas durante longos períodos, sugere actividade das peptidases e amino-peptidases bacterianas, embora lenta, com produção de amónia (Tejada *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2006), o que poderá estar relacionado com o ligeiro aumento do pH destas amostras. Quanto aos sabores amargo e ácido, aumentaram ligeiramente em relação à amostra testemunho, em ambos os períodos de armazenamento. Os restantes parâmetros não foram afectados pela congelção.

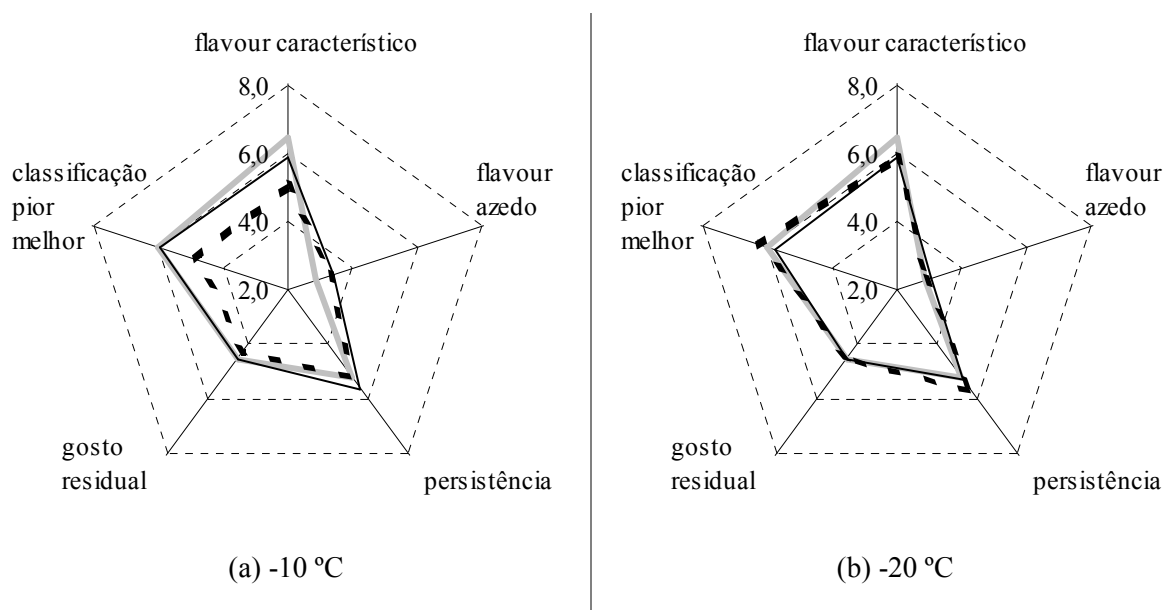


Figura 43 – Valores médios dos atributos de “flavour” das amostras testemunho não congeladas (—), congeladas durante 2 meses (---) e congeladas durante 12 meses (· · ·), à temperatura de -10 °C (a) e de -20 °C (b).

Em relação aos atributos de “flavour”, bem como o gosto residual, também se pôde observar uma coincidência muito grande entre os traçados da amostra testemunho e das amostras congeladas a -20 °C, em ambos os períodos de congelção (Figura 43b). Nas amostras congeladas a -10 °C (Figura 43a), observou-se uma manutenção nos atributos de “flavour” para baixos tempos de permanência no estado congelado, no entanto, para longos períodos de congelção, observou-se um abaixamento em atributos muito importantes como o “flavour” característico, o gosto residual e classificação global pior/melhor.

Para avaliar o impacto do tempo de armazenagem a -10 e a -20 °C nas propriedades sensoriais das amostras de queijo, os resultados médios da caracterização sensorial foram sujeitos a uma análise em componentes principais (ACP). O número de amostras usadas foi 13 e estão em jogo 17 atributos sensoriais. Como o número de atributos não

pode ser superior ao número de amostras, julgou-se mais importante incluir os atributos de cheiro, textura, sabor e “flavour”, excluindo-se os atributos de aspecto. Assim, usaram-se nesta análise os seguintes atributos: cheiro amoniacal, textura granulosa, textura amanteigada, sabor picante, sabor doce, sabor ácido, sabor salgado, sabor amargo, “flavour” característico, “flavour” azedo, persistência, gosto residual e classificação global pior/melhor (13 atributos). Na Tabela 19 apresentam-se os valores próprios e a extracção dos componentes principais.

Tabela 19 – Valores próprios e extracção dos componentes principais dos valores médios dos atributos sensoriais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	8,65	66,52	8,65	66,52
2	1,97	15,12	10,61	81,64
3	0,99	7,58	11,60	89,22
4	0,56	4,29	12,16	93,52
5	0,31	2,38	12,47	95,90
6	0,22	1,73	12,69	97,63
7	0,19	1,46	12,88	99,08
8	0,08	0,63	12,96	99,71
9	0,02	0,18	12,99	99,90
10	0,01	0,10	13,00	100,00
11	0,00	0,00	13,00	100,00
12	0,00	0,00	13,00	100,00
13	0,00	0,00	13,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 81,7% da variância: 66,5% para a primeira componente e 15,1% para a segunda. Só foram significativos os dois primeiros componentes, uma vez que só estes apresentaram valor próprio superior a 1. O valor próprio do primeiro componente foi 5,65 e o do segundo 1,97. Na Tabela 20, encontram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais obtidos com a análise efectuada.

Tabela 20 – Coeficientes de correlação entre os valores médios dos atributos sensoriais (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Cheiro amoniacal	0,94*	-0,08
Textura granulosa	0,95*	0,14
Textura amanteigada	-0,92*	0,17
Sabor picante	-0,76*	0,39
Sabor doce	0,69	-0,51
Sabor salgado	-0,40	0,74*
Sabor ácido	0,81*	0,47
Sabor amargo	0,80*	0,47
“flavour” característico	-0,95*	-0,10
“flavour” azedo	0,76*	0,54
Persistência	-0,79*	-0,06
Gosto residual	-0,72*	0,43
Classificação global pior/melhor	-0,96*	-0,06

* - correlações significativas ($r > 0,7$).

O componente principal CP1 foi explicado, com maior peso, pelos atributos: cheiro amoniacal, textura granulosa, sabor ácido e sabor amargo e “flavour” azedo (com valores de correlação positivos). O sabor doce não teve correlação superior a 0,70 com nenhum componente principal, no entanto aparece com uma correlação bastante elevada (e de sinal positivo) com o CP1. O CP1, foi ainda explicado (mas com correlações negativas) por: textura amanteigada, sabor picante, “flavour” característico, persistência, gosto residual e classificação global pior/melhor. O componente principal CP2 foi explicado, com maior peso, pelo atributo sabor salgado, com valores positivos de correlação.

Na Figura 44 pode-se observar a distribuição dos atributos sensoriais no plano principal formado pelas duas primeiras componentes.

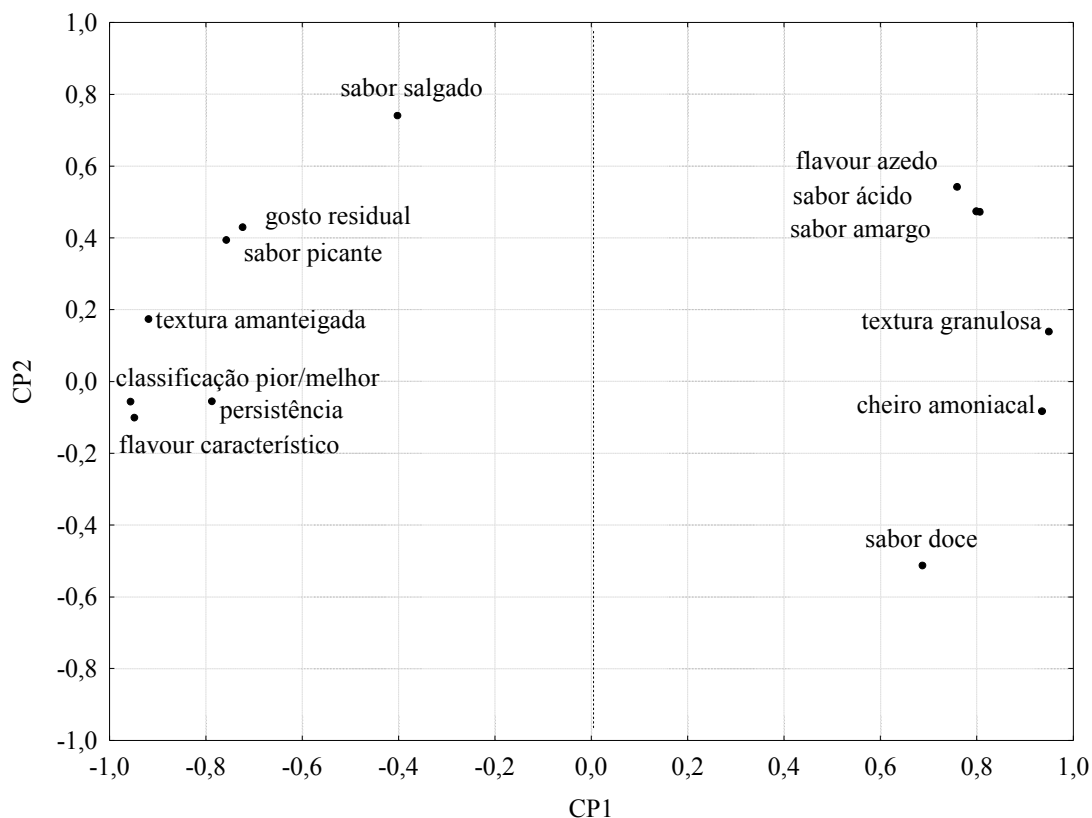


Figura 44 – Distribuição dos valores médios dos atributos sensoriais no plano principal (CP1 vs CP2).

O componente principal CP1 distinguiu-se como eficaz na separação dos atributos considerados positivos, a saber, classificação global pior/melhor, “flavour” característico, persistência, textura amanteigada, sabor picante e gosto residual, no seu quadrante negativo, enquanto que os atributos considerados negativos aparecem no quadrante positivo: sabor azedo, sabor amargo, sabor ácido, textura granulosa, cheiro amoniacal e sabor doce. O componente principal CP2 caracterizou-se pelo sabor salgado.

Na Figura 45 pode observar-se a projecção dos valores médios das amostras no plano principal, constituído pelos dois primeiros componentes principais.

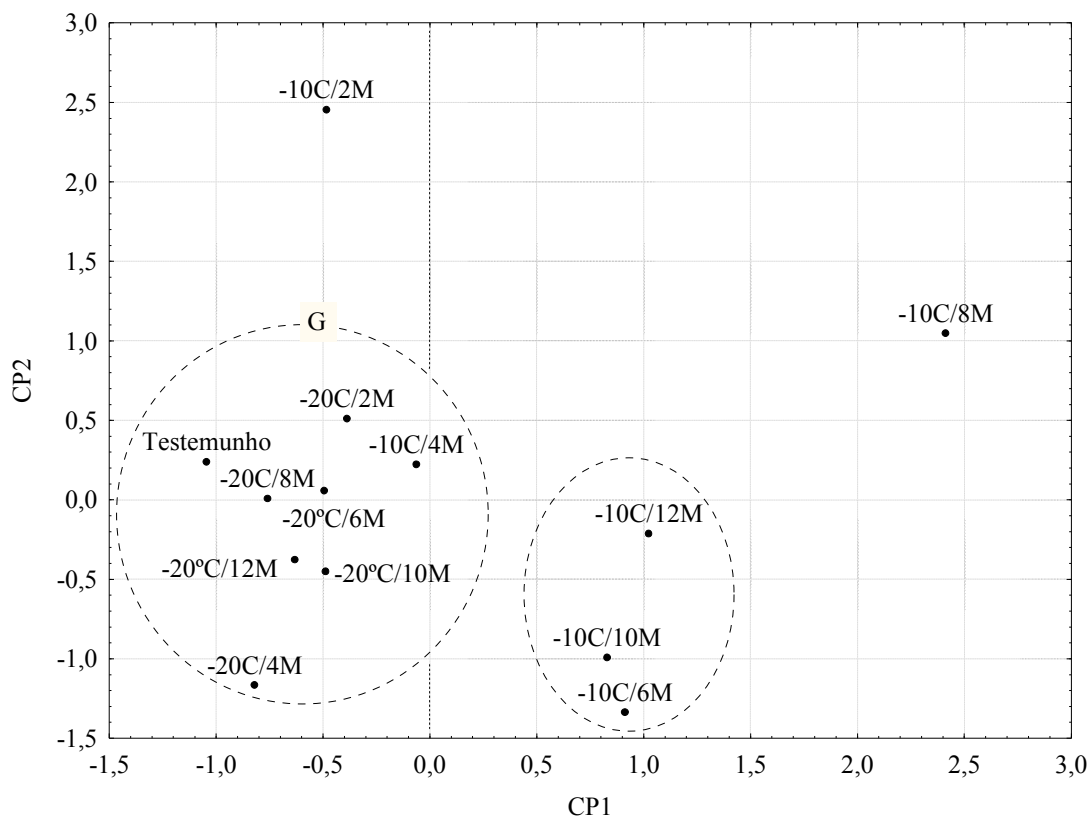


Figura 45 – Projeção das amostras no plano principal (atributos sensoriais).

Para o agrupamento das amostras, foi usado o método de classificação aglomerativa hierárquica, "Cluster Analysis", com uma distância de ligação entre amostras de cerca de 1,0 (Figura 46). Este tipo de análise multivariada dividiu as amostras em dois grupos. Um desses grupos, constituído pela amostra testemunho, por todas as amostras congeladas a -20 °C e pela amostra congelada a -10C/4M, foi designado por grupo G. O facto das amostras do grupo G estarem muito juntas no plano, indica que há uma semelhança muito grande entre elas no que se refere aos atributos sensoriais usados nesta análise: cheiro amoniacal, textura granulosa, textura amanteigada, sabor picante, sabor doce, sabor ácido, sabor salgado, sabor amargo, “flavour” característico, “flavour” azedo, persistência, gosto residual e classificação global pior/melhor. Uma vez que todas as amostras congeladas a -20 °C se encontram neste grupo, pode-se afirmar, com alguma segurança, que a congelação a -20 °C causou pouco impacto ao nível do perfil sensorial dos queijos de ovelha.

Pelo contrário, as amostras congeladas a -10 °C apresentaram-se afastadas da amostra testemunho, com excepção da amostra dos quatro meses de congelação (-10C/4M), que se encontra no grupo G. Uma observação pouco cuidadosa poder-nos-ia levar a excluir

totalmente esta temperatura como uma temperatura adequada à preservação dos atributos sensoriais, no entanto, se observarmos a localização da amostra -10C/2M, também se encontra do lado esquerdo do gráfico. O facto de se encontrar afastada em relação ao grupo G, na vertical, significa que apresentou um sabor salgado mais acentuado. Estes dados podem não estar relacionados com o processo de congelação em si, mas sim pelo processo artesanal de produção que contempla uma adição manual de sal podendo causar alguns desequilíbrios na distribuição de sal pelos queijos. De facto, os resultados individuais por amostra (dados não apresentados), mostraram que duas das 3 amostras com maior teor de sal, se encontram neste grupo (-10C/2M), reflectindo-se num aumento do valor médio deste atributo nestas amostras.

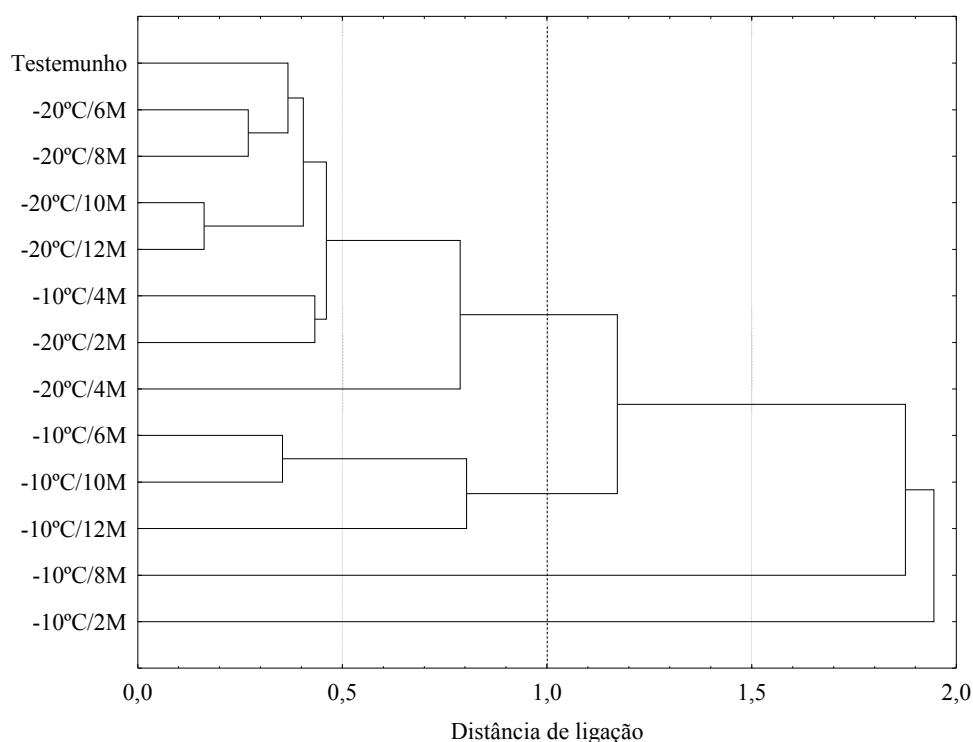


Figura 46 – Dendrograma das 11 amostras com base nas distâncias euclidianas entre elas, quando projectadas no plano principal (atributos sensoriais).

Pelo que ficou exposto, os valores elevados de sabor salgado da amostra -10C/2M colocaram-na na parte superior do plano principal (Figura 45), afastando-a do grupo G. No entanto, pelo facto do período de congelação desta amostra ser 2 meses (inferior ao da amostra -10C/4M) seria espectável que, caso não se apresentasse com um sabor salgado tão pronunciado, esta amostra também se encontrasse no seio do grupo G.

De qualquer forma, todas as amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bem como as amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período inferior ou igual a 4 meses, apresentaram-se no lado esquerdo do plano, ou seja do lado negativo do componente principal CP1, explicado pelos atributos sensoriais positivos, a saber, classificação pior/melhor, persistência, gosto residual, flavour característico, textura amanteigada e sabor picante. As amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos superiores a 4 meses encontraram-se do lado direito do plano que foi explicado pelos atributos depreciativos, a saber, sabores ácido, amargo e doce, cheiro amoniacal, textura granulosa e flavour azedo.

6.4 – Conclusões

Neste ensaio, pretendeu-se estudar o impacto da congelação das amostras de queijo ao longo do tempo de armazenamento no estado congelado, nas propriedades químicas (essencialmente componentes maiores e fracção proteica) e físicas (propriedades estruturais e parâmetros de cor) e sensoriais de queijos de ovelha de pasta semi-mole. As conclusões obtidas foram as seguintes:

- Todas as amostras congeladas apresentaram propriedades semelhantes às amostras testemunho, no que se refere aos componentes principais do queijo, ou seja, humidade, gordura e proteína ($P > 0,05$). O pH das amostras congeladas apresentou valores ligeiramente superiores aos valores das amostras testemunho. Esta diferença de pH pode estar ligada à manutenção da actividade enzimática, mesmo a baixas temperaturas, com produção de compostos com reacção alcalina, como alguns aminoácidos, aminas e amónia.
- A extensão da proteólise, ou seja a quantidade de péptidos solúveis em água independentemente das dimensões destes, medida a partir dos valores de azoto solúvel em água, também não foi afectada pelo processo de congelação, não se encontrando diferenças significativas entre a média das amostras testemunho e as amostras congeladas ($P > 0,05$). No entanto, o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto as proteínas e os péptidos estão a serem degradados em péptidos mais pequenos, medida a partir dos azotos não proteico e aminoacídico, só se manteve durante 4 meses nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e durante 8 meses nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir destes períodos, a proteólise começou a ser cada vez mais profunda, principalmente nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. As flutuações de temperatura induzem, inevitavelmente, um aumento nas dimensões

dos cristais de gelo, e os danos provocados por estes cristais causam danos, quer na rede proteica, quer nas membranas celulares das bactérias, promovendo a lise e um enriquecimento enzimático do substrato. Esta observação está associada ao ligeiro aumento de pH, e ao aumento do cheiro amoniacal detectado pelo painel de provadores, nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir do 6º mês de congelamento.

- Os parâmetros reológicos, mostraram uma tendência para o endurecimento dos queijos ao fim de algum tempo de congelamento: seis meses para amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e oito meses para amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta tendência apresentou diferenças significativas nos valores da dureza para ambas as temperaturas de congelamento. No entanto, no caso do módulo conservativo, apenas se detectaram diferenças significativas nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$). O endurecimento das amostras sujeitas ao processo de congelamento, a partir de um determinado período, é muito pronunciado: a dureza das amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ duplica a partir do 6º mês e das amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir do 8º mês.
- Na cor, observaram-se ligeiras lesões na crosta das amostras de queijo congelado, com maior incidência nos parâmetros L^* e a^* e com menor incidência no parâmetro b^* . Com o passar do tempo de congelamento, a cor da crosta das amostras foi-se tornando cada vez mais esbranquiçada, menos esverdeada (mais avermelhada) e mais amarelada, principalmente nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$). Também se encontrou alguma tendência para este fenómeno nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, embora, na maior parte dos casos, não se tenham encontrado diferenças significativas ($P > 0,05$).
- Quanto à cor da pasta, as alterações causadas pela congelamento não foram tão evidentes, não se encontrando diferenças significativas ($P > 0,05$). Pode-se por isso concluir que a congelamento causou lesões mais pronunciadas ao nível superficial, nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo-se reflectir ao nível da aceitabilidade dos queijos, uma vez que estas lesões estão ligadas ao aspecto visual dos queijos, que têm importância fundamental na apreciação dos mesmos pelos consumidores.
- Quando se compararam amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com amostras testemunho (não sujeitas ao processo de congelamento), ao nível dos atributos sensoriais, verificou-se que a temperatura de congelamento de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi bastante

eficaz na manutenção dos atributos sensoriais positivos dos queijos, podendo-se destacar o “flavour” característico, a textura amanteigada, o sabor picante, a persistência e o gosto residual. Quanto às amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, também houve manutenção destes atributos durante quatro meses, no entanto, ao fim de seis meses de congelação, começaram a sofrer danos perceptíveis pelo painel de provadores (e.g. a textura começou a ficar granulosa, o cheiro amoniacal, e os sabores ácido, amargo e azedo começaram a acentuar-se).

Ao longo dos 12 meses de congelação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ocorrem os seguintes fenómenos: os constituintes principais do queijo, a cor da pasta, bem como os parâmetros cromáticos da crosta a^* e b^* mantiveram-se inalterados. A partir do 4^o mês de congelação ocorreu um ligeiro aumento na luminosidade da crosta. A partir do 8^o mês observou-se um endurecimento bastante significativo e, a partir do 10^o mês, iniciou-se o processo de proteólise (principalmente ao nível da profundidade). À excepção da dureza, todas estas alterações foram muito ligeiras e não se reflectiram ao nível da apreciação sensorial das amostras.

As alterações observadas nas amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ resumem-se da seguinte forma: os constituintes principais do queijo e a cor da pasta mantiveram-se inalterados. A partir do 2^o mês de congelação ocorreram alterações na cor da crosta. A partir do 6^o mês observou-se um endurecimento bastante significativo da pasta e iniciou-se o processo de proteólise (principalmente ao nível da profundidade). Estas alterações levaram a uma apreciação sensorial das amostras muito negativa a partir do 6^o mês de congelação.

Concluindo, a congelação de queijo de ovelha de pasta semi-mole à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por períodos não superiores a 6 meses preservou, na globalidade, a qualidade das amostras. Por períodos superiores começaram a surgir alguns danos, não detectados ao nível sensorial. Assim, para queijos com Denominação de Origem Protegida, onde os padrões de qualidade devem ser muito exigentes, a congelação à temperatura $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por períodos superiores a 6 meses, deve ser desencorajada. A congelação à temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ deve ser totalmente desencorajada, porque todas as lesões aparecem mais cedo. Nestas condições de congelação, os danos na cor da crosta são muito evidentes e surgem logo a partir dos dois meses de congelação, reflectindo-se numa diminuição da qualidade dos queijos e retirando valor comercial ao produto.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES GERAIS

O objectivo principal deste trabalho foi efectuar o estudo da introdução da tecnologia de congelação no processo de produção de queijos de ovelha de pasta semi-mole. Neste sentido, foram estudadas diferentes variáveis no sentido de otimizar o processo: o período da cura mais adequado para introduzir a congelação, a velocidade de congelação, a temperatura de congelação e o tempo de armazenamento à temperatura de congelação. Antes de estudar o processo de congelação, entendeu-se ser útil aprofundar o conhecimento existente sobre os fenómenos ocorridos durante a cura neste tipo de queijos e, neste campo, foi dado especial relevo à evolução estrutural da matriz durante este período. As conclusões foram sendo expostas em cada um dos capítulos (4, 5 e 6), mas podem aqui ser realçadas algumas delas.

A partir da evolução dos espectros mecânicos e dos texturogramas das amostras ao longo da cura, observou-se que a estrutura do queijo foi amolecendo, sendo esta característica muito importante nestes queijos. Esta diminuição dos valores de dureza e de módulo elástico é coincidente com uma queda no pH e um aumento das fracções proteicas indicadoras de proteólise, como o azoto não proteico e o azoto aminoacídico. Quanto aos parâmetros de cor, ao longo da cura, as amostras tornaram-se mais escuras, mais amarelas e ligeiramente mais esverdeadas.

Foi estabelecido um modelo para estimar o tempo de cura do queijo Serpa a partir de três parâmetros químicos, dois parâmetros de cor e três parâmetros reológicos, com um erro estimado de 1,74 dias, o valor de $R^2 = 0,99$ e o valor ajustado de $R^2 0,98$ ($P < 0,0001$). Quando o modelo foi testado com outros queijos (amostras dos outros ensaios), o afastamento do tempo estimado em relação ao tempo real subiu para 4,7 dias. A equação representativa do modelo é a seguinte:

$$Rt = 218,9 + 0,92NSA\% + 8,1NA\% - 8,9pH - 11,4a^* - 4,7b^* - 7,8\log \alpha - 123,9b - 130,5\tan \delta_{1Hz}$$

Este modelo poderá ser um importante contributo a nível de segurança alimentar e deve ser aplicado em queijos que, por qualquer motivo, se pense não terem completado os 30 dias de cura.

Durante as 2-3 primeiras semanas de cura ocorreu uma forte evolução das propriedades dos queijos e, a partir da terceira semana, as amostras começaram a estabilizar e a apresentar propriedades semelhantes às propriedades finais. Como estes queijos são muito apreciados pela macieza da pasta, logo que as propriedades físicas, químicas e de

“flavour” dos queijos estejam estabilizadas, estes devem ser conservados para evitar que se observe um endurecimento da pasta com implicações negativas no respectivo valor económico.

O processo de congelação foi mais eficaz quando se fez no final da cura (42 dias de cura) e quando as amostras se mantiveram conservadas a temperatura mais baixa (-20 °C). No que se ao tipo de congelação, não se observaram vantagens em relação ao processo de congelação ser mais rápido. Para além disso, pode-se concluir que a congelação de queijos de ovelha de pasta semi-mole à temperatura de -20 °C por períodos não superiores a 6 meses preserva, na globalidade, a qualidade das amostras. Em períodos superiores a este começam a surgir alguns danos, no entanto não detectados a nível sensorial. Assim, para queijos com Denominação de Origem Protegida, a congelação à temperatura -20 °C pode ser aplicada em períodos não superiores a 6 meses. No entanto, a temperaturas de -10 °C ou durante períodos superiores a 6 meses (mesmo a -20 °C) deve ser totalmente desencorajada, uma vez que se reflectiu numa diminuição da qualidade dos queijos.

Em termos reológicos, os espectros mecânicos revelaram-se mais úteis na explicação dos fenómenos ocorridos durante a cura de queijo Serpa (amolecimento devido à proteólise e diminuição do pH) enquanto que a textura instrumental se mostrou mais eficaz na detecção dos fenómenos ocorridos na congelação. Estas observações sugerem que, estas duas técnicas reológicas podem ser consideradas complementares e, em estudos envolvendo a monitorização reológica de queijo, não devem deixar de ser usadas em conjunto.

Perspectivas de trabalhos futuros

Com o desenvolvimento deste trabalho revelaram-se algumas necessidades de eventuais linhas de investigação para trabalhos futuros, nomeadamente.

- Desenvolvimento de embalagens e revestimentos no sentido de otimizar os processos de conservação dos queijos por congelação, dando especial importância à conservação do perfil de cor da crosta das amostras congeladas.
- Utilização de microscopia electrónica de varrimento em trabalhos onde se pretenda monitorizar a estrutura de queijos, quer seja para estudar a sua evolução ao longo da cura, quer seja para estudar as suas modificações durante os processos de congelação.
- Estudar a evolução do perfil reológico e sensorial de queijos submetidos ao processo de congelação em diferentes períodos pós-descongelação.
- Monitorização das propriedades estruturais do queijo de ovelha ao longo de períodos longos de maturação, como por exemplo 6 meses.
- Estudo da introdução da tecnologia de congelação noutros tipos de queijo, especialmente queijos de cabra e queijos de ovelha de pasta dura.
- A determinação dos valores de temperatura de transição vítrea, utilizando calorimetria diferencial de varrimento, para diferentes grupos de queijos portugueses de pequenos ruminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahama, S., Cachona, R., Colasc, B., Feron, G. e Coninck, J. (2007). Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal* **17**, 954-960.
- Adhikari, K., Heymann, H. e Huff, H. E. (2003). Textural characteristics of lowfat, fullfat and smoked cheeses: sensory and instrumental approaches. *Food Quality and Preference* **14**, 211-218.
- Águas, M. J. A. C. (2002). *Caracterização Físico-química do Queijo de Castelo Branco*. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Ak, M. M. e Gunasekaran, S. (1992). Stress-strain curve analysis of Cheddar cheese under uniaxial compression. *Journal of Food Science* **57**, 1078-1081.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche - principios de técnica lechera*, Editorial Reverté, S.A., Barcelona.
- Alichanidis, E., Polichroniadu, N., Tzanetakis, N. e Vafopoulou, A. (1981). Telemá cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science* **64**, 732-739.
- Alonso, L., Juarez, M., Ramos, M. e Martin-Alvarez, P. J. (1987). Effects of changes during ripening and frozen storage on the physicochemical and sensory characteristics of Cabrales cheese. *International Journal of Food Science and Technology* **22**, 525-534.
- Al-Otaibi, M. M. e Wilbey, R. A. (2006). Effect of chymosin reduction and salt substitution on the properties of white salted cheese. *International Dairy Journal* **16**, 903-909.
- Alvarenga, N. B. (1995). *Caracterização de Leite de Ovelha. Ponto de Congelação*. Tese de Licenciatura, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Alvarenga, N. B. (2000). *Estudos em Textura de Queijo Serpa*. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Alvarenga, N. B., Carreira, D. e Canada, J. (1996). O ponto de congelação do leite de ovelha. *Revista Via Láctea* **9**, 59-61.

- Alvarenga, N. B., Fernandes, O., Ferro Palma, S., Canada, J. e Sousa, I. (2003). Influência da congelação/descongelação nas propriedades do queijo de ovelha. In *6º Encontro de Química dos Alimentos* (M. L. Nunes e M. N. Bandarra, eds.), Vol. 1, pp. 207-210. Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa.
- Alvarenga, N. B., Fernandes, O. e Sousa, I. M. (2004). Freezing/thawing impact on the rheological properties of ewe cheese. In *Progress in Rheology of Biological and Synthetic Polymer Systems* (A. C. Diogo, N. B. Alvarenga, J. Canada, S. F. Palma e J. Dias, eds.), pp. 247-251. Instituto Politécnico de Beja. Portugal.
- Alvarenga, N. B., Raymundo, A. e Sousa, I. M. (2001). Evolução da textura e da composição físico-química do queijo Serpa ao longo da maturação. In *5º Encontro de Química dos Alimentos da Sociedade Portuguesa de Química*, pp. 135-138. Escola Superior de Biotecnologia / Universidade Católica Portuguesa, Porto.
- Alvarenga, N. B. e Sousa, I. M. (2001). Evaluation of texture measurements of soft cheese. In *XIIIth International Congress on Rheology*, Vol. IV, pp. 392-394, Cambridge, UK.
- Alves, M. M. M. (2003). A Reologia. In *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos* (A. G. Castro, ed.), pp. 37-61. Instituto Piaget, Lisboa.
- AOAC (1990a). Method no. 920.124. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- AOAC (1990b). Method no. 926.08. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- AOAC (1990c). Method no. 955.30. In *Official Methods of Analysis*, 15ª edição. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Attaie, R. (2005). Effects of aging on rheological and proteolytic properties of goat milk Jack Cheese produced according to cow milk procedures. *Small Ruminant Research* **57**, 19-29.
- Awad, S. (2006). Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. *Food Chemistry* **97**, 394-400.
- Awad, S. (2007). Effect of sodium chloride and pH on the rennet coagulation and gel firmness. *Food Science and Technology* **40**, 220-224.

- Barcenas, P., Elortondo, F. J. P. e Albisu, M. (2004). Projective mapping in sensory analysis of ewes milk cheeses: A study on consumers and trained panel performance. *Food Research International* **37**, 723-729.
- Barcenas, P., Pérez-Elertrondo, F. J., Salmerón, J. e Albisu, M. (2000a). Análise sensorial de alimentos. I. Desarrollo del vocabulario descriptivo y uso de referencias específicas. *Alimentaria* **314**, 23-30.
- Barcenas, P., Pérez-Elertrondo, F. J., Salmerón, J. e Albisu, M. (2000b). Análises sensorial de alimentos. II. Selección, entrenamiento y control de los catadores. *Alimentaria* **314**, 31-33.
- Barros, R. M., Extremina, C. I., Goncalves, I. C., Braga, B. O., Balcao, V. M. e Malcata, F. X. (2003). Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 908-916.
- Benedito, J., Simal, S., Clemente, G. e Mulet, A. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal* **16**, 431-438.
- Bertola, N. C., Califano, A. N., Bevilacqua, A. E. e Zaritzky, N. E. (1996a). Effect of freezing conditions on functional properties of low moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, **79**, 185-190.
- Bertola, N. C., Califano, A. N., Bevilacqua, A. E. e Zaritzky, N. E. (1996b). Textural changes and proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese frozen under various conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **29**, 470-474.
- Blanshard, J. e Lillford, P. (1993). *The Glassy State in Foods*, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Bourne, M. C. (1982). *Food texture and viscosity - concept and measurement*, Academic Press, New York.
- Boutrou, R., Famelart, M., Gaucheron, F., Graet, Y., Gassi, J., Plot, M. e Leonil, J. (2002). Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. *Journal of Dairy Research* **69**, 605-618.
- Breuil, P. e Meullenet, J. F. (2001). A comparison of three instrumental tests for predicting sensory texture profiles of cheese. *Journal of Texture Studies* **32**, 41-55.

- Bryant, A., Ustunol, Z. e Steffe, J. (1995). Texture of Cheddar cheese as influenced by fat reduction. *Journal of Food Science* **60**, 1216-1219.
- Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B. e Sell, I. (2005). PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing* **24**, 564-571.
- Buffa, M. N., Trujillo, A. J., Pavia, M. e Guamis, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *International Dairy Journal* **11**, 927-934.
- Califano, A. N. e Bevilacqua, A. E. (1999). Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry* **64**, 193-198.
- Canada, J. S. B. (2001). *Caracterización Sensorial y Físico-Química del Queijo Serpa*. Tese de Doutoramento, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Canet, W., Acevedo, H. M. e Juárez, M. (1995). Estudio de la influencia de la congelación y de la conservación al estado congelado de la textura de quesos puros de oveja tipo graso semiduro. In *Reología y Textura de Productos Alimentarios de Interés Industrial* (C. Gallegos, A. Guerrero e J. Muñoz, eds.), pp. 15-26. Grupo Español de reología - Real Sociedade Española de Química, Sevilla.
- Carvalho, I. A. (1989). *Controlo físico-químico e microbiológico de leite e queijo de ovelha*. DTIA n° 113. LNETI, Lisboa.
- Castillo, I., Calvo, M. V., Alonso, L., Juárez, M. e Fontecha, J. (2007). Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry* **100**, 590-598.
- Chakraborty, A. e Basak, S. (2008). Effect of surfactants on casein structure: A spectroscopic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **63**, 83-90.
- Champion, D., Le Meste, M. e Simatos, D. (2000). Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 41-55.
- Chen, A. H., Larkin, J. W., Clark, C. J. e Irwin, W. E. (1979). Textural analysis of cheese. *Journal of Dairy Science* **62**, 901-907.

- Chirife, J. e Buera, M. P. (1995). A critical review of some non-equilibrium situations and glass transitions on water activity values of foods in the microbiological growth range. *Journal of Food Engineering* **25**, 531-552.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripo, J. C., Lambert, G., Lenoir, J. e Tourneur, C. (1987). Os fenómenos microbiológicos e enzimáticos, e a bioquímica da cura (maturação). In *O Queijo* (A. Eck coord., ed.), Vol. 1. Publicações Europa-América, Mem Martins.
- Costa, M. S. L. B. (2006). *Influência do Processo de Congelação nas Características Sensoriais do Queijo de Ovelha de Pasta Semi-Mole*. Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.
- Cunha, C. R., Spadoti, L. M. e Zacarchenco, P. B. (2002). Efeito do factor de concentração do retentado na composição e proteólise de queijo Minas Frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. *Ciência Tecnologia Alimentar* **22**, 82-87.
- Cunha, C. R., Viotto, W. H. e Viotto, L. A. (2006). Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal* **16**, 215-224.
- Dahl, S., Tavaría, F. K. e Malcata, F. X. (2000). Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* **10**, 255-262.
- Dalgleish, D. G. (1999). The enzymatic coagulation of milk. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 69-100. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A. e Douglas Goff, H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* **14**, 1025-1031.
- Dewettinck, K., Deroo, L., Messens, W. e Huyghebaert, A. (1999). Dynamic rheological properties of Gouda cheese as influenced by age and position. *Milchwissenschaft* **54**, 258-262.

- Dias, J. J. M. (1998). *Estudo de Alguns Parâmetros Microbiológicos e Tecnológicos do Queijo Serpa*. Tese de Licenciatura, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Dias, M. S. L. F. (1985). Delimitação das zonas oleícolas portuguesas por análise em componentes principais. *Boletim do Instituto do Azeite e Produtos Oleaginosos* **23**, 86-123.
- Diefes, H. A., Rizvi, S. S. H. e Bartsh, J. A. (1993). Rheological behaviour of frozen and thawed low-moisture part skim, Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* **58**, 764-769.
- Dofossé, L., Galaup, P., Carlet, E., Flamin, C. e Valla, A. (2005). Spectrocolorimetry in the CIE $L^*a^*b^*$ color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. *Food Research International* **38**, 919-924.
- DR (1985). Decreto Regulamentar n.º42/85 - cria a Região Demarcada do Queijo Serra da Estrela. *Diário da República - I Série - Nº 152 de 5 de Julho*, 1847.
- DR (1986). Decreto Regulamentar n.º49/86 - cria a Região Demarcada do Queijo de Azeitão. *Diário da República - I Série - Nº 227 de 2 de Outubro*, 2849-2850.
- DR (1987). Decreto Regulamentar n.º39/87 - cria a Região Demarcada de Queijo Serpa. *Diário da República - I Série - Nº 146 de 29 de Junho*, 2499-2500.
- DR (1988). Decreto Regulamentar n.º22/88 - cria a Região Demarcada dos Queijos da Beira Baixa. *Diário da República - I Série - Nº 121 de 5 de Julho*, 2230-2232.
- DR (1990). Portaria n.º 73/90. Regulamenta as características, classificação, acondicionamento, rotulagem e condições de conservação do queijo. *Diário da República - I Série - Nº 27 de 1 de Fevereiro*, 436-438.
- Drake, M. A., Chen, X. Q., Gerard, P. D. e Gurkin, S. U. (1998). Composition and quality attributes of reduced-fat cheese as affected by lecithin type. *Journal of Food Science* **63**, 1018-1023.
- Drake, M. A., Herrett, W., Boylston, T. D. e Swanson, B. G. (1996). Lecithin improves texture of reduced fat cheeses. *Journal of Food Science* **61**, 639-642.
- Draper, N. R. e Smith, H. (1998). *Applied Regression Analysis*, 3ª edição, John Wiley, New York.

- Dumais, R., Blais, J. A. e Conrad, F. (1991). Queso. In *Ciencia y Tecnología de la Leche - Principios y Aplicaciones*, Vol. 2, pp. 249-266. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- Esteves, C. L. C., Lucey, J. A., Hyslop, D. B. e Pires, E. M. V. (2003). Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *International Dairy Journal* **13**, 877-885.
- Faro, C. C. (1991). *Purificação e Caracterização Físico-Química da Protease de Cynara cardunculus L.* Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Coimbra - Portugal.
- Farrell Jr., H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. e Qi, P. X. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *Journal of Dairy Science* **87**, 1641-1674.
- Farrell Jr., H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. e Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 135-147.
- Fellows, P. (1994). *Tecnología del Processado de los Alimentos: Principios y Prácticas*, Editorial Acribia, Zaragoza.
- Fenelon, M. A. e Guinee, T. P. (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal* **10**, 151-158.
- Fennema, O. (1972). *Freezing of cheese - pros and cons*. In *Marschall Italian and Specialty Cheese Seminar*, Madison, Wisconsin.
- Fennema, O. (1989). *Freezing Preservation of Foods: Fundamental Aspects*. In *Annual Meeting of The South African Association for Food Science and Technology*, Durban - South Africa.
- Fernández-Salguero, J. e Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chemistry* **64**, 177-183.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Veiros, C., Pinho, O., Veloso, A. C. A., Peres, A. M. e Mendonça, A. (2006). Casein breakdown in Terrincho ovine cheese: comparison with bovine cheese and with bovine/ovine cheeses. *Journal of Dairy Science* **89**, 2397-2407.

- FIL/IDF (1982). *Document 142*, Federation Internationale Laitiere, Brussels.
- Filchakova, N. N., Pankova, R. I., Mishenina, Z. A. e Ovcharova, G. P. (1983). Changes of protein properties in cheese during freezing. In *Proceeding of the XVIth International Congress of Refrigeration*, Vol. 3, pp. 529-533, Paris.
- Fontecha, J., Bellanato, J. e Juarez, M. (1993). Infrared and Raman spectroscopic study of casein in cheese: effect of freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Science* **76**, 3303-3309.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* **72**, 1379-1400.
- Fox, P. F. (1999). Cheese: an overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 389-438. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H. e Wallace, J. (1999). Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 389-438. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Franco, J., Raymundo, A., Sousa, I. e Gallegos, C. (1998). Influence of processing variables on the rheological and textural properties of lupin protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **46**, 3109-3115.
- Freitas, A. C., Fresno, J. M., Prieto, B., Malcata, F. X. e Carballo, J. (1997). Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* **60**, 219-229.
- Freitas, A. C., Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (2000). Review: technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International* **6**, 351-370.
- Freitas, A. C. e Malcata, F. X. (1996). Influence of milk type, coagulant, salting and ripening time on the final characteristics of Picante cheese. *International Dairy Journal* **6**, 1099-1116.
- Fuente, M. A., Requena, T. e Juarez, M. (1997). Salt balance in ewe's and goat's milk during storage at chilling and freezing temperatures. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **45**, 82-88.

- García, F. D., Corrales, J. C., Morgado, R. d. H. e Fornaris, L. C. (1996). Definición de la tecnología y caracterización de un queso semiduro de corta maduración. *Alimentaria* **273**, 43-46.
- Garde, S., Arqués, J. L., Gaya, P., Medina, M. e Nuñez, M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal* **17**, 1424-1433.
- Gardner, W. P. (1997). *Statistical Analysis Methods for Chemists. A Software-Based Approach*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Gaya, P., Sánchez, C., Nuñez, M. e Fernández-García, E. (2005). Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research* **72**, 287-295.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *Microbiology Reviews* **28**, 251-260.
- Goff, H. D. e Sahagian, M. E. (1996). Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability. *Thermochimica Acta* **280/281**, 449-464.
- Gormley, R., Walshe, T., Hussey, K. e Butler, F. (2002). The effect of fluctuating vs. constant frozen storage temperature regimes on some quality parameters of selected food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **35**, 190-200.
- Gorostiza, A., Cichoski, A. J., Valduga, A. T., Valduga, E., Bernardo, A. e Fresno, J. M. (2004). Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free aminoacids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry* **85**, 407-414.
- Graiver, N. G., Zaritzky, N. E. e Califano, A. N. (2004). Viscoelastic behavior of refrigerated frozen low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* **69**, 123-128.
- Grappin, R., Rank, T. e Olson, N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science* **68**, 531-540.
- Green, M. L. (1999). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 101-140. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.

- Gunasekaran, S. e Ak, M. M. (2003). *Cheese Rheology and Texture*, CRC Press, London.
- Hassan, A. N., Corredig, M., Frank, J. F. e Elsoda, M. (2004). Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research* **71**, 116-120.
- Heth, A. A. e Swaisgood, H. E. (1982). Examination of casein micelle structure by a method for reversible covalent immobilization. *Journal of Dairy Science* **65**, 2047-2054.
- Hong, C. M., Wendorff, W. L. e Bradley Jr, R. L. (1995). Factors affecting light-induced pink discoloration of annatto-colored cheese. *Journal of Food Science* **60**, 94-97.
- Horne, D. S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **7**, 456-461.
- Horne, D. S. (2003). Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **213**, 255-263.
- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 148-153.
- Horne, J., Carpino, S., Tuminello, L., Rapisarda, T., Corallo, L. e Licitra, G. (2005). Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. *International Dairy Journal. The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, characterization and Technology* **15**, 605-617.
- Hsieh, Y. L., Yun, J. J. e Rao, M. A. (1993). Rheological properties of Mozzarella cheese filled with dairy, egg, soy proteins, and gelatin. *Journal of Food Science* **58**, 1001-1003.
- Innocente, N. (1997). Free amino acids and water-soluble nitrogen as ripening indices in Montasio cheese. *Le Lait* **77**, 359-369.

- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C. e Torre, P. (2002). Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *International Dairy Journal* **12**, 27-34.
- ISO 3432 (1975). *Cheese - Determination of Fat Content - Butyrometer for Van Gulik Method*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 3972 (1991). *Analyse Sensorielle. Méthodologie. Méthode d'Eveil à la Sensibilité Gustative*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 5492 (1992). *Sensory Analysis - Vocabulary*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Izco, J. M. e Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry* **70**, 409-417.
- Jaubert, A., Durier, C., Kobilinsky, A. e Martin, P. (1999). Structural organization of the goat casein micelle: effect of the physico-chemical environment (pH, temperature, ionic strength) on its mineral and protein composition. *International Dairy Journal* **9**, 369-370.
- Johnson, R. A. e Wichern, D. W. (1998). *Applied Multivariate Statistical Analysis*, Prentice Hall International, London, UK.
- Johnston, D. E. e Murphy, R. J. (1984). Effects of fat content on properties of rennet-induced milk gels. *Milchwissenschaft* **39**, 585-587.
- Jovita, M. M. R. (1991). *Evolucion de la Composicion y Caracteristicas Fisico-Quimicas del Queso de Acehuche Durante su Maduracion*. Tese de Mestrado, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Juan, B., Ferragut, V., Guamis, B. e Trujillo, A. J. (2008). The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* **18**, 129-138.
- Karlsson, A. O., Ipsen, R. e Ardö, Y. (2007). Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal* **17**, 1053-1062.

- Karoui, R. e Dufour, E. (2003). Dynamic testing rheology and fluorescence spectroscopy investigations of surface to centre differences in ripened soft cheeses. *International Dairy Journal* **13**, 973-985.
- Karoui, R., Laguet, A. e Dufour, É. (2003). Fluorescence spectroscopy: a tool for the investigation of cheese melting - correlation with rheological characteristics. *Lait* **83**, 251-264.
- Kasapis, S., Paraskevopoulou, A., Kiosseoglou, A. e Alevipoulus, S. (1997). Small deformation properties of model salad dressing prepared with reduced cholesterol egg yolk. *Journal of Texture Studies* **28**, 221-237.
- Kaya, S. (2002). Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining. *Journal of Food Engineering* **52**, 155-159.
- Kelly, A. L. e O'Donnell, H. J. (1998). Composition, gel properties and microstructure of Quarg as affected by processing parameters and milk quality. *International Dairy Journal* **8**, 295-301.
- Korolczuk, J. e Mahaut, M. (1990). Relaxation studies of acid type cheese texture by a constant speed cone penetrometric method. *Journal of Texture Studies* **21**, 107-122.
- Kubícková, J. e Grosch, W. (1998). Evaluation of flavour compounds of Camembert cheese. *International Dairy Journal* **8**, 11-16.
- Kuchroo, C. N. e Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* **37**, 331-335.
- Larráyo, P., Mendía, C., Torre, P., Barcina, Y. e Ordóñez, I. (2002). Sensory profile of flavour and odour characteristics in Roncal cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Sensory Studies* **17**, 415-427.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. e Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **70**, 1748-1760.
- Le Graët, Y. e Gaucheron, F. (1999). pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: Influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research* **66**, 215-224.

- Lopez, M. B., Lomholt, S. B. e Qvist, Q. B. (1998). Rheological properties and cutting time of rennet gels: Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal* **8**, 289-293.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E. e Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science* **86**, 2725-2743.
- Luyten, H., Vliet, T. v. e Walstra, P. (1991). Characterization of the consistency of Gouda cheese: Rheological properties. *Netherlands Milk Dairy Journal* **45**, 33-53.
- Ma, L., Drake, M. A., Barbosa-Cánovas, G. V. e Swanson, B. G. (1997). Rheology of full-fat Cheddar cheeses as related to type of fat mimetic. *Journal of Food Science* **62**, 478-452.
- Macedo, A. C., Costa, M. L. e Malcata, F. X. (1996a). Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese: effects of axial cheese location, ripening time and lactation season. *Lait* **76**, 363-370.
- Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (1997). Hydrolysis of α_s - and β -caseins during ripening of Serra cheese. *Food Chemistry* **58**, 43-48.
- Macedo, A. C., Tavares, T. G. e Malcata, F. X. (2004). Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology* **21**, 233-240.
- Macedo, I. M. Q., Faro, C. J. F. e Pires, E. M. V. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1537-1540.
- Macedo, I. M. Q., Faro, C. J. F. e Pires, E. M. V. (1996b). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L: Action on bovine α - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 42-47.
- Madsen, J. S. e Ardo, Y. (2001). Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. *International Dairy Journal* **11**, 423-431.

- Marcos, A. e Esterban, M. A. (1999). Iberian Cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 2, pp. 173-220. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Marilley, L. e Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 139-159.
- Martins, A. P. L. (1989). *O leite de ovelha - produção, utilização e características. Contribuição para o estudo do leite de ovelha da Região de Azeitão*, ENTPA - INIA, Lisboa.
- Martins, A. P. L. (1999). *A Flor do Cardo (Cynara cardunculus L.) Como Agente Coagulante no Fabrico de Queijo*. Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Martins, A. P. L., Pestana-de-Vasconcelos, M. M. e Bruno-de-Sousa, R. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus L.*) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait* **76**, 473-477.
- McSweeney, P. L. H. e Fox, P. F. (1993). Cheese: methods of chemical analysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), 2ª edição, Vol. 1, pp. 341-388. Chapman & Hall, London, U.K.
- McSweeney, P. L. H. e Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le Lait* **77**, 41-76.
- McSweeney, P. L. H. e Fox, P. F. (1999). Cheese: methods of chemical analysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), 2ª edição, Vol. 1, pp. 341-388. Chapman & Hall, London, U.K.
- McSweeney, P. L. H. e Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* **80**, 293-324.
- Medina, M., Pozo, B. F. D., Rodríguez-Marin, M. A., Gaya, P. e Nuñez, M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research* **58**, 355-361.

- Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J. H. J. e van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science* **98**, 25-50.
- Mendia, C., Ibañez, F. C., Torre, P. e Barcina, Y. (1999). Effect of pasteurization on the sensory characteristics of a ewe's-milk cheese. *Journal of Sensory Studies* **14**, 415-424.
- Messens, W., Estepar-Garcia, J., Dewettinck, K. e Huyghebaert, A. (1999). Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal* **9**, 775-782.
- Messens, W., Van de Walle, D., Arevalo, J., Dewettinck, K. e Huyghebaert, A. (2000). Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal* **10**, 359-367.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gasparad, C. E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. e Vernozy-Rozand, C. (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 537-544.
- Microsoft Corporation (2002). *Microsoft Excel 2002*.
- Minolta (1991). *Chroma meter CR-300/CR-310/CR-321/CR-331/CR331C - Instruction Manual*, Minolta Co., Ltd, Japan.
- Monteiro, S. M. R. (1998). *Produção de Queijo Serpa. Condições de Cura, Armazenagem e de Expedição a Controlar, Tendo em Vista a Respectiva Optimização*. Relatório de Estágio, Instituto Politécnico de Beja, Beja.
- Montgomery, D. C. (1984). *Design and Analysis of Experiments*, 2ª edição, John Wiley & Sons, Singapore.
- Moore, S. (1968). Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxid as solvent for the ninhydrin reaction. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 6281-6283.
- Moussa, O. B., Mankai, M., Barbana, C., Hassouna, M., Alvarenga, N. B. e Canada, J. (2008). Influence of culture conditions on esterase activity of five psychrotrophic Gram negative strains selected from raw Tunisian milk. *Annals of Microbiology* **58**, 53-59.

- Muir, M. D. (1984). Reviews of the progress of dairy science: frozen concentrated milk. *Journal of Dairy Research* **51**, 649-664.
- Najera, A. I., de Renobales, M. e Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry* **80**, 345-352.
- Nájera, A. L., R. Barrón, L. J. e Barcina, Y. (1993). Revisión: comparación de la fracción lipídica del queso de vaca, oveja y cabra, y la influencia sobre su calidad. *Revista Espanhola de Ciencia e Tecnologia de los Alimentos* **334**, 345-363.
- Narimatsu, A., Dornellas, J. R. F., Spadoti, L. M. e Pizaia, P. D. (2003). Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. *Ciência Tecnologia Alimentar* **23**, 177-182.
- Noomen, A. (1983). The role of surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. *Netherlands Milk Dairy Journal* **37**, 229-232.
- NP 1922 (1985). *Queijo Serra da Estrela. Definição, Características e Marcação*. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- NP 2105 (1983). *Queijos. Determinação do Teor de Matéria Gorda. Técnica de Van Gulik*. Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro Alimentar, Lisboa.
- NP ISO 8586-1 (2001). *Análise Sensorial. Guia Geral para a Selecção, Treino e Controlo dos Provadores. Parte 1: Provadores Qualificados*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP ISO 8586-2 (2001). *Análise Sensorial. Guia Geral para a Selecção, Treino e Controlo dos Provadores. Parte. 2: Peritos*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Nuñez, M., Rodríguez, J. L., García, E., Gaya, P. e Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 671-677.
- O'Mahony, J. A., Lucey, J. A. e McSweeney, P. L. H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **88**, 3101-3114.

- O'Keeffe, A., Fox, P. F. e Daly, C. (1978). Proteolysis in cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research* **45**, 465-477.
- Oliveira, J. C., Cruz, I. B., Pereira, P. M. e Frias, J. M. (1997). Análise da mobilidade molecular em matrizes sólidas utilizando conceitos de ciências de biomateriais: aplicação na otimização da qualidade de produtos congelados. *Boletim de Biotecnologia* **56**, 20-29.
- Oliveira, J. C., Pereira, P. M., Frias, J. M., Cruz, I. B. e MacInees, W. M. (1999). Application of the concepts of biomaterials science to the quality optimization of frozen foods. In *Processing Foods* (F. A. R. Oliveira e J. C. Oliveira, eds.), pp. 107-130. CRC Press LLC, New York.
- Omar, M. M. (1984). Microstructure, free amino acids and free fatty acids in Ras cheese. *Food Chemistry* **15**, 19-29.
- Omar, M. M. e El-Zayat, A. I. (1986). Ripening changes of Kashkaval cheese made from cow's milk. *Food Chemistry* **22**, 83-94.
- Pandey, P. K., Ramaswamy, H. S. e St-Gelais, D. (2003). Effect of high pressure processing on rennet coagulation properties of milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **4**, 245-256.
- Park, Y. W. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**, 73-87.
- Park, Y. W. e Drake, M. A. (2005). Effect of 3 months frozen-storage on organic acid contents and sensory properties, and their correlations in soft goat milk cheese. *Small Ruminant Research* **58**, 291-298.
- Park, Y. W., Gerard, P. D. e Drake, M. A. (2006). Impact of frozen storage on flavour of caprine milk cheeses. *Journal of Sensory Studies* **21**, 654-663.
- Park, Y. W., Kalantari, A. e Frank, J. F. (2004). Changes in the microflora of comercial soft goat milk cheese during refrigerated and frozen-storage. *Small Ruminant Research* **53**, 61-66.
- Park, Y. W. e Lee, J. H. (2006). Effect of freezing on organic acid contents and lipolytic index of plain soft and Monterey Jack goat milk cheeses. *Small Ruminant Research* **63**, 58-65.

- Pavia, M., Guamis, B., Trujillo, A. J., Capellas, M. e Ferragut, V. (1999). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal* **9**, 91-98.
- Pearce, K. N., Karahalios, D. e Friedman, M. (1988). Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese. *Journal of Food Science* **53**, 432-438.
- Pelaez, M. C. (1983). Congelacion de cuajadas. *Alimentaria* **144**, 19-22.
- Pereira, C. I., Gomes, E. O., Gomes, A. M. P. e Malcata, F. X. (2008). Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry* **108**, 862-868.
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M. M. e Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2004). Chemical, physical and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science* **87**, 1-9.
- Pinho, O. M. C. (2003). *Implementação de Metodologias Analíticas com Reduzido Impacto Ambiental para Análise de Queijo de Ovelha - Contribuição na Caracterização do Queijo Terrincho*. Tese de Doutorado, Universidade do Porto, Porto.
- Poveda, J. M., Cabezas, L. e McSweeney, P. L. H. (2004a). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry* **84**, 213-218.
- Poveda, J. M., Garcia, A., Martin-Alvarez, P. J. e Cabezas, L. (2004b). Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chemistry* **84**, 29-33.
- Prados, F., Pino, A., Rincon, F., Vioque, M. e Fernandez-Salguero, J. (2006). Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered vegetable coagulant and rennet. *Food Chemistry* **95**, 677-682.
- Pripp, A. H., Skeie, S., Isaksson, T., Borge, G. I. e Sorhaug, T. (2006). Multivariate modelling of relationships between proteolysis and sensory quality of Prast cheese. *International Dairy Journal* **16**, 225-235.

- prNP 4263 (1992). *Projecto Norma - Análise Sensorial - Vocabulário*. Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro Alimentar, Lisboa.
- Raksakulthai, R., Rosenberg, M. e Haard, N. F. (2002). Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *Journal of Food Science* **67**, 923-929.
- Ramkumar, C., Campanella, O. H., Watkinson, P. J., Bennett, R. J. e Creamer, L. K. (1998). The effects of pH and time on rheological changes during early cheese maturation. *Journal of Texture Studies* **29**, 633-644.
- Ramos, M., Cáceres, I. e Polo, C. (1987). Effect of freezing on soluble nitrogen fraction of cabrales cheese. *Food Chemistry* **24**, 271-278.
- Rank, T., Grappin, R. e Olson, N. (1985). Secondary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science* **68**, 801-805.
- Ranken, M. (1993). *Manual de Industrias de los Alimentos*, Editorial Acribia S. A., Zaragoza.
- Raphaelides, S., Antoniou, K. D. e Petridis, D. (1995). Texture evaluation of ultrafiltered Teleme Cheese. *Journal of Food Science* **60**, 1211-1215.
- Reis, P. J. M. e Malcata, F. X. (2007). Improvements in small scale artisanal cheesemaking via a novel mechanized apparatus. *Journal of Food Engineering* **82**, 11-16.
- Ribero, G. G., Rubiolo, A. C. e Zorrilla, S. E. (2007a). Influence of immersion freezing in NaCl solutions and of frozen storage on the viscoelastic behaviour of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* **72**, 301-307.
- Ribero, G. G., Rubiolo, A. C. e Zorrilla, S. E. (2007b). Initial freezing point of Mozzarella cheese. *Journal of Food Engineering* **81**, 157-161.
- Risch, E. (1992). Rheological properties of goat milk cheese: method of true axial stress versus apparent axial stress. *Journal of Texture Studies* **23**, 403-413.
- Rogers, M. A., Roos, Y. H. e Goff, H. D. (2006). Structural heterogeneity and its effect on the glass transition in sucrose solutions containing protein and polysaccharide. *Food Hydrocolloids* **20**, 774-779.

- Roseiro, L. B., Garcia-Risco, M., Barbosa, M., Ames, J. M. e Wilbey, R. A. (2003a). Evaluation of Serpa cheese proteolysis by nitrogen content and capillary zone electrophoresis. *International Journal of Dairy Technology* **56**, 99-104.
- Roseiro, L. B., Gómez-Ruiz, J. A., Garcia-Risco, M. e Molina, E. (2003b). Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication. *Lait* **83**, 343-350.
- Roseiro, L. B., Viala, D., Besle, J. M., Carnat, A., Fraisse, D., Chezal, J. M. e Lamaison, J. L. (2005). Preliminary observations of flavonoid glycosides from the vegetable coagulant *Cynara* L. in protected designation of origin cheeses. *International Dairy Journal. The Fourth IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization and Technology* **15**, 579-584.
- Roseiro, L. B., Wilbey, R. A. e Barbosa, M. (2003c). Serpa cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Lait* **83**, 469-481.
- Roseiro, M. L. B. (1991). Ewe's milk cheesemaking in Portugal using a vegetable rennet. *Sheep Dairy News* **8**, 4-75.
- Rosenberg, M., Wang, Z., Chuang, S. L. e Shoemaker, C. F. (1995). Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science* **60**, 640-644.
- Salles, C., Hervé, C., Septier, C., Demaizières, D., Lesschaeve, I., Issanchou, S. e Le Quéré, J. L. (2000). Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheeses. *Food Chemistry* **68**, 429-435.
- Sánchez, M. T. (1996). Food Texture: concept and measurement. *Alimentaria* **272**, 29-34.
- Sandra, S., Alexander, M. e Dalglish, D. G. (2007). The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **308**, 364-373.
- Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry* (P. F. Fox, ed.), pp. 61-86. Applied Science, London, UK.

- Silva, M. L. C. d. (2001). *Estudo da Maturação em Queijo São Jorge: Caracterização do Perfil Proteolítico*. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Silva, S. V. e Malcata, F. X. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry* **89**, 19-26.
- Slade, L. e Levine, H. (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* **30**, 115-360.
- Slade, L. e Levine, H. (1995). Water and the glass transition - dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special implications for flour functionality in cookie baking. *Journal of Food Engineering* **24**, 431-509.
- Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E. e Siezen, R. (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International* **33**, 153-160.
- Sousa, I. (2001). A reologia dos produtos alimentares. In *Reologia e Suas Aplicações Industriais* (A. G. Castro, J. A. Covas e A. C. Diogo, eds.), pp. 131-158. Ciência e Técnica, Instituto Piaget, Lisboa.
- Sousa, I., Matias, E. e Laureano, O. (1997). The texture of low calorie grape juice jelly. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **205**, 140-142.
- Sousa, M. J., Ardo, Y. e McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11**, 327-345.
- Sousa, M. J. e Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 305-314.
- Stampanoni, C. R. e Noble, A. C. (1991). The influence of fat, acid and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs: a scalar study. *Journal of Texture Studies* **22**, 367-380.
- StatSoft (2001). *STATISTICA (data analysis software system), Version 6*, Statsoft, Inc, Melbourne - Australia.

- St-Gelais, D. e Hache, S. (2005). Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. *Food Research International* **38**, 523-531.
- Subramanian, R. e Gunasekaran, S. (1997). Small amplitude oscillatory shear studies on Mozzarella cheese Part I. Region of linear viscoelasticity. *Journal of Texture Studies* **28**, 633-642.
- Sutheerawattananonda, M. e Bastian, E. D. (1998). Monitoring process cheese meltability using dynamic stress rheometry. *Journal of Texture Studies* **29**, 169-183.
- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of texture characteristics. *Journal of Food Science* **28**, 385-389.
- Tavaria, F. K., Francob, I., Carballob, F. J. e Malcata, F. X. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* **13**, 537-545.
- Tavaria, F. K., Reis, P. J. M. e Malcata, F. X. (2006). Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* **16**, 895-902.
- Tejada, L., Gomez, R. e Fernandez-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cyanara cardunculus*. *Journal of Food Quality* **30**, 91-103.
- Tejada, L., Gomez, R., Vioque, M., Sanchez, E., Mata, C. e Fernandez-Salguero, J. (2000). Effect of freezing and frozen storage on the sensorial characteristics of los Pedroches, a Spanish cheese. *Journal of Sensory Studies* **15**, 251-262.
- Tejada, L., Sanchez, E., Gomez, R., Vioque, M. e Fernandez-Salguero, J. (2002). Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. *Journal of Food Science* **67**, 126-129.
- Tejada., L., Abellan, A., Cayuela, J. M. e Martinez-Cacha (2006). Sensorial characteristics during ripening of the Murcia al vino goat's milk cheese: the effect of the type of coagulant used and the size of the cheese. *Journal of Sensory Studies* **21**, 333-347.

- Tunick, M. H., Malin, E. L., Smith, P. W. e Holsinger, V. H. (1995). Effects of skim milk homogenization on proteolysis and rheology of Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* **5**, 483-491.
- Ustunol, Z., Kawachi, K. e Steffe, J. (1995). Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *Journal of Food Science* **60**, 1208-1210.
- Van-Hekken, D. L., Tunick, M. H. e Park, Y. W. (2005). Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk Cheese. *Journal of Dairy Science* **88**, 1966-1972.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M. e Topisirovic, L. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2142-2152.
- Verdini, R. A. e Rubiolo, A. C. (2002a). Effect of frozen storage time on the proteolysis of soft cheeses studied by principal component analysis of proteolytic profiles. *Journal of Food Science* **67**, 963-967.
- Verdini, R. A. e Rubiolo, A. C. (2002b). Texture changes during the ripening of Port Salut Argentino cheeses in 2 sampling zones. *Journal of Food Science* **67**, 1808-1813.
- Verdini, R. A., Zorrilla, S. E. e Rubiolo, A. C. (2003). Changes in equilibrium modulus and α_{s1} -casein breakdown during the ripening of Port Salut Argentino cheese as affected by frozen storage. *Journal of Texture Studies* **34**, 331-346.
- Verdini, R. A., Zorrilla, S. E. e Rubiolo, A. C. (2005). Effects of the freezing process on proteolysis during the ripening of Port Salut Argentino cheeses. *International Dairy Journal* **15**, 363-370.
- Verdini, R. A., Zorrilla, S. E., Rubiolo, A. C. e Nakai, S. (2007). Multivariate statistical methods for Port Salut Argentino cheese analysis based on ripening time, storage conditions, and sampling sites. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **86**, 60-67.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L. e Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese

- manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 451-456.
- Visser, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *Journal of Dairy Science* **76**, 329-350.
- Voutsinas, L. P., Katsiari, M. C., Pappas, C. P. e Mallatou, H. (1995a). Production of brined soft cheese from frozen ultrafiltered sheep's milk. Part 1. Physicochemical, microbiological and physical stability properties of concentrates. *Food Chemistry* **52**, 227-233.
- Voutsinas, L. P., Katsiari, M. C., Pappas, C. P. e Mallatou, H. (1995b). Production of brined soft cheese from frozen ultrafiltered sheep's milk. Part 2 compositional, physicochemical, microbiological and organoleptic properties of cheese. *Food Chemistry* **52**, 235-247.
- Walstra, P. (1999a). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* **9**, 189-192.
- Walstra, P. (1999b). *Dairy Technology - Principles of Milk Properties and Processes*, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Walstra, P. (1999c). The syneresis of curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 141-192. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A. e White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal* **11**, 455-464.
- Widgery, A. J. (1990). *An Investigation of the Effects of Different Freezing and Thawing Techniques on the Production and Properties of Ewe's Milk Soft Cheese*. Bachelor of Science Thesis, Polytechnic South West, Seale-Hayne.
- Yun, J. J., Hsieh, Y. L., Barbano, D. M. e Rohn, C. L. (1994). Rheological and chemical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Texture Studies* **25**, 411-420.
- Yvon, M. e Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **11**, 185-201.

- Zalazar, C. A., Zalazar, C. S., Bernal, S., Bertola, N., Bevilacqua, A. e Zaritzky, N. (2002). Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal* **12**, 45-50.
- Zhang, R. H., Mustafa, A. F., Ng-Kwai-Hang, K. F. e Zhao, X. (2006). Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. *Small Ruminant Research* **64**, 203-210.
- Zottola, E. A. e Smith, L. B. (1991). Pathogens in cheese. *Food Microbiology* **8**, 171-182.

ANEXO

Alvarenga, N., Silva, P., Rodriguez-Garcia, J. e Sousa, I. (2008). Estimation of Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR) considering rheological, physical and chemical data. *Journal of Dairy Research* **75**, 233-239.

Estimation of Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR) considering rheological, physical and chemical data

Nuno Alvarenga^{1,*}, Paula Silva¹, José Rodriguez Garcia² and Isabel Sousa²

¹ Instituto Politécnico de Beja – Escola Superior Agrária, Rua Pedro Soares, Apartado 6158, 7801-908 Beja, Portugal

² Technical University of Lisbon, Instituto Superior de Agronomia, DAIAT, Tapada de Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

Received 14 March 2007; accepted for publication 5 February 2008

Raw ewes' milk semi-soft cheeses (RESS-cheeses) are important products in Portugal and in several European regions. Creamy texture is an essential attribute of these cheeses, which results from structural properties that are not always well characterized. Here, the structural changes occurring during the ripening period of a traditional RESS-cheese, known as Serpa cheese, were analysed through small amplitude oscillatory shear (SAOS). Rheological data was complemented with other physical and chemical parameters, that were monitored during ripening, in order to estimate Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR). Mechanical spectra indicated a relatively strong structure, comparable to a gel, with a low dependence on frequency at the beginning of ripening and a weak structure, comparable to a concentrated suspension, with a crossing point ($G'' = G'$) at the left of the graphic and with both moduli highly dependent on frequency, at the end of ripening. Good correlations ($P < 0.05$) were obtained between structural (hardness and storage modulus) and proteolysis indicators. Using a combination of chemical, colour and rheological parameters we were able to obtain a multiple linear regression (MLR) which allows the estimation of Serpa cheese ripening time with an estimation error of 1.7 d (adjusted $R^2 = 0.98$, $P < 0.0001$).

Keywords: ewe cheese, multiple linear regression, estimation, ripening, rheology, proteolysis.

Raw ewes' milk semi-soft cheese (RESS-cheese) constitutes an important manufactured product in Portugal, with high added value. Serpa is one of the most appreciated Portuguese RESS-cheeses and it is produced in the south eastern region of Portugal. It is a creamy, fat and semi-soft cheese, originated from a slow curd syneresis after coagulation with a vegetable rennet infusion (*Cynara cardunculus* L.) (Roseiro et al. 2003a). Because Serpa cheese is made from raw ewes' milk, on traditional farms, a minimum ripening period of 30 d is necessary to ensure food safety. The production of lactic acid during this ripening period reduces the pH, improves whey expulsion from the curd, affects cheese flavour and inhibits the growth of the pathogenic bacteria. This is one of the several control methods available to the cheesemaker to prevent disease outbreaks caused by cheese (Zottola & Smith, 1991). Therefore, Serpa cheese can only be sold after this period, which is required to fulfil Serpa cheese Appellation of Origin regulation

(Portuguese legislation). For these safety reasons, the estimation of the ripening time, i.e., how many days of ripening the cheese has undergone during maturation (cheese age), has recently become an important issue, since cheeses do not display the manufacture date (Pinho et al. 2004; Poveda et al. 2004; Ferreira et al. 2006).

For consumers, the most important feature of RESS cheeses is the creamy mouth feel attribute. The structural properties of cheese can be described by its viscoelastic behaviour and are mostly dictated by the properties of the continuous network formed by the protein crosslinks. Other important cheese constituents that contribute to the overall viscoelastic behaviour, while modifying the properties of the protein network, are fat and moisture (Zalazar et al. 2002). Measurements using small amplitude oscillatory shear (SAOS) allow the quantification of the elastic and viscous contributions to the cheese properties. Elastic response in cheese is primarily due to the protein-protein bonds. In contrast, the viscous dissipation in cheese may be due to the lubrication effect of fat on this matrix material (Park, 2007).

*For correspondence; e-mail: bartolomeu.alvarenga@esab.ipbeja.pt

Cheese texture is affected by factors that determine structure, such as milk composition, moisture content, salt, pH and degree of proteolysis during ripening (Da Cunha et al. 2006). Proteolysis is the most complex of these events and, possibly, the most important in the flavour and texture development (Sousa et al. 2001). Cheese textural changes during ripening results in smoothing and softening, due to a prevalence of proteolysis of the α_{s1} -casein (Al-Otaibi & Wilbey, 2006), or hardening, when the drying process dominates (Awad, 2006). These opposing effects on the rheological properties of the cheese were explained by Dewettinck et al. (1999): proteolysis reduces the storage modulus while drying has the opposite effect. However, it is well established that cheese softening, induced by proteolysis, prevails when cheese is made from raw milk (Rosenberg et al. 1995).

Little is known about the physical and biochemical mechanisms that underline the ripening process of the traditional Serpa RESS-cheese. Therefore, the aims of this study were: (i) to monitor the structural changes of Serpa RESS-cheeses during ripening, considering a range of rheological (mechanical spectrum – $G'_{1\text{Hz}}$, $\tan\delta_{1\text{Hz}}$, $\log \alpha$ and b ; texture analysis parameters – hardness and adhesiveness), colour (L^* , a^* and b^*) and chemical parameters (moisture, fat, acidity, pH, total nitrogen, water soluble nitrogen, non-protein nitrogen and amino acidic nitrogen), and (ii) to develop a multiple linear regression model that will allow the estimation of the duration of the ripening period (cheese age), using chemical, colour and rheological data. In this study, the use of cheeses manufactured by two different producers was studied to overcome the variability inherent in an essentially traditional process.

Materials and methods

Cheese samples

For this study, two producers were selected for sample collection on the basis of the quality and regularity of their Serpa cheese production. Cheeses were manufactured from slow curd syneresis, after raw ewes' milk coagulation (30 °C/45 min) with a *Cynara cardunculus* L. infusion. The curd was pressed and subjected to 42 d ripening, performed in two successive controlled rooms: two weeks of ripening performed in a controlled temperature (8–9 °C) and relative humidity (92–97%) room and, afterwards, in a second ripening room, at 10–13 °C and at 85–90% relative humidity (Roseiro et al. 2003b). From each producer, samples were collected at different ripening stages. At producer 1, groups of 2 cheeses were picked after 0, 7, 14, 21, 28 and 35 d ripening. At Producer 2, groups of 2 cheeses were picked after 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d ripening. Cheese samples were sent to the laboratory in refrigerated boxes and analysis started on the same day. One cm layer of the upper surface of each cheese was removed in order to expose a homogeneous surface of the

inside allowing colour, pH and texture determinations. Furthermore, a cheese portion (approximately 0.15 kg) was removed and conserved (4 °C) in a Petri dish to be used for the rheometer determinations.

Dynamic rheology

Rheological measurements were performed at 20 ± 1 °C using a controlled-stress Rheometer RS-75 (Haake, Germany), with a serrated parallel plate geometry of 20 mm diameter, in order to prevent slippage (Rosenberg et al. 1995). A stress sweep determination was performed on a different aliquot to ascertain linearity. The mechanical spectrum (frequency sweeps) was performed on another aliquot of the same sample at a constant shear stress of 200 Pa (samples of 0–14 d) and at 50 Pa (samples of 21–42 d). All frequency sweeps were conducted with oscillation frequencies ranging from 0.001 to 100 Hz in three different samples (triplicate). The output of the rheometer measurements was the variation of storage modulus G' (Pa), loss modulus G'' (Pa), loss tangent $\tan\delta$ (G''/G') and complex viscosity $|\eta^*|$ (Pa.s), as a function of the frequency f (Hz). From the later, $\log \alpha$ and b values were obtained by logarithmic fitting of experimental data to the Power Law, according to eqn (1) (Kasapis et al. 1997):

$$|\eta^*| = \alpha \cdot f^{-b} \quad \text{or} \quad \log |\eta^*| = \log \alpha - b \log f \quad (1)$$

The $\log \alpha$ value is a function of the viscoelastic proprieties that depend on the material consistency while the b value reflects the dependency of viscoelastic properties on the frequency variation.

Texture analysis

A texture analyser TAHDi (Stable Micro Systems, Godalming, UK), equipped with a 250 N load cell, was used to perform the texture analysis at 20 ± 1 °C. The procedure was implemented by puncture with a 20 mm diameter aluminium cylindrical probe, at a penetration depth of 20 mm (the height of the sample was 50 mm), with a crossed speed of 1 mm s^{-1} . Texture measurements were performed in triplicate: one was performed in the core and the two others were performed in the rind of the cheese. From the force vs. time texturograms, two parameters were obtained: hardness and adhesiveness (Van-Hekken et al. 2005).

Colour measurement

The colour analysis was performed using a colorimeter CR 300 (Minolta, Osaka, Japan). The L^* , a^* , and b^* colour measurements were determined according to the CIELAB colour space, using a standard white tile ($L^*=97.10$, $a^*=-4.88$, $b^*=7.04$) for calibration (Pinho et al. 2004). Colour measurements were repeated ten times: five measurements in the core and another five in the rind of the cheese.

Chemical characterization

Titrate acidity, moisture content and total nitrogen (TN) were determined according to AOAC (1990) methods. In addition, pH was measured using a penetration electrode (Metrohm, Switzerland) and fat content through the Van Gulik method (ISO 3432, 1975). Water soluble nitrogen (WSN) was quantified performing an aqueous extraction of the N-components (Kuchroo & Fox, 1982), followed by nitrogen determination using the micro-Kjeldahl method using a Kjeltec System 1030 distilling+titration unit system (Tecator, Höganäs, Sweden). Non-protein nitrogen (NPN) was determined by the N-component precipitation with a trichloroacetic acid solution (1.2 g kg⁻¹) and N determination of the filtrate (filter paper Whatman No. 42) using the micro-Kjeldahl method (Freitas et al. 1997). Aminoacidic nitrogen (AN) was determined by the ninhydrin method (Pearce et al. 1988). All chemical analyses were performed in triplicate.

Statistical treatment of data

The average, standard deviation, and 0.95 confidence interval values were determined for each parameter. Experimental data were subjected to One-way ANOVA (pairwise comparison of means with Scheffé test), to correlation analysis and to principal component analysis (PCA), which will allow the evaluation of RESS-cheese changes during ripening. Estimation of Serpa cheese length of the ripening period was performed with a stepwise MLR, which combines the backward elimination and forward selection regression methods (Draper & Smith, 1998). The level of significance, chosen for variable selection, was 0.05. Data were analysed using STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Results and discussion

Structural and chemical monitoring

Structural changes occurring during the ripening period of the traditional Serpa cheese were evaluated. Data (not shown) concerning the mechanical spectra and loss tangent profile (Fig. 1), indicated a relatively strong structure, comparable to a gel, with a low dependence on frequency, at the beginning of ripening period, especially in samples 0–21 d. However, the cheese got less and less structured to the end of ripening as can be observed in Fig. 1, by the increased dependence of G' and G'' on frequency after long periods of ripening, 28, 35 and 42 d. The critical crossing point, $G'=G''$, is well shown at 35 d and this is the spectre of a very weak gel, sometimes considered too weakly structured to form a gel, being usually found in emulsion systems (Franco et al. 1998). As expected, texture data were in agreement with the observed mechanical spectra: in the first 14 d, the curves were characteristic of a soft solid with a fracture point in the first peak (Fig. 2) (Szczeniak, 1963). Subsequent curves for 21 and 28 d

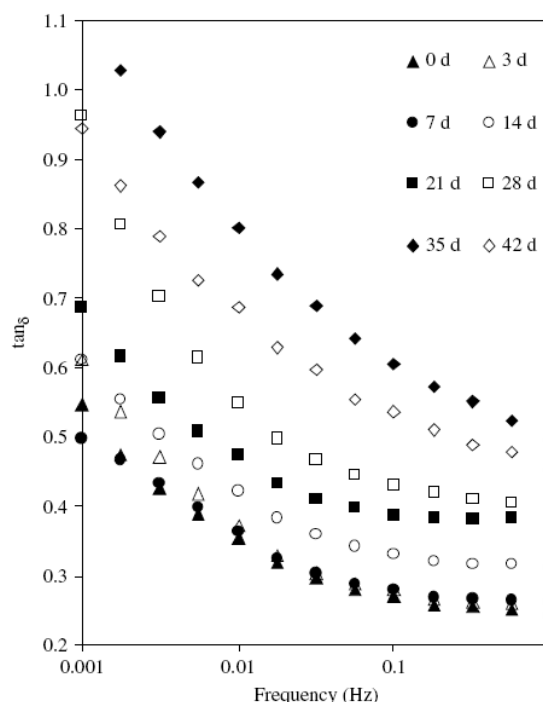


Fig. 1. Loss tangent profiles for samples with 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d (producer 2, mean values, $n=6$).

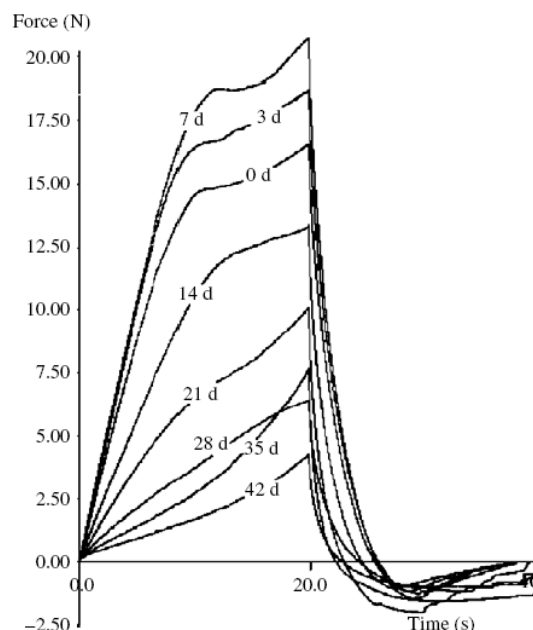


Fig. 2. Texture profile for samples with 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d (producer 2, mean values, $n=6$).

showed a small shoulder as a consequence of smooth texture and, further ripening time (35 and 42 d), showed the typical profile for a highly viscous fluid under penetration.

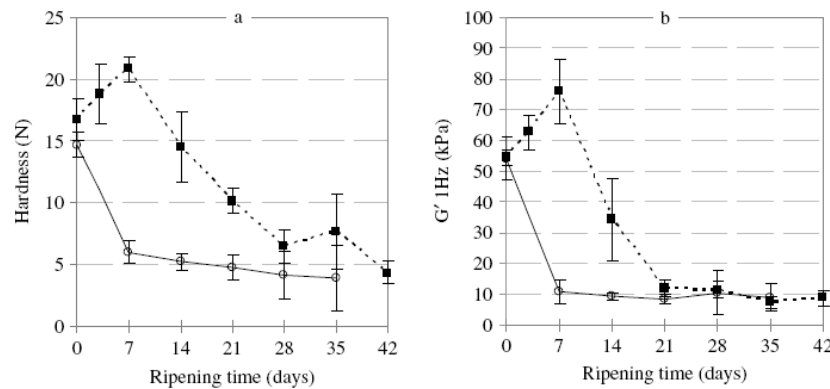


Fig. 3. Changes in the hardness (a) and storage modulus (b) for the producer 1 (—○—) and producer 2 (---■---) during ripening. Y error bars shows the 95% confidence level.

Hardness values decreased during ripening, from around 15 N, at the beginning, to values around 5 N at the end of the ripening period ($P < 0.05$; Fig. 3a). In the same manner, the storage modulus at 1 Hz changed from about 54 kPa at the beginning to a value of around 10 kPa ($P < 0.05$), which remained stable until the end of ripening (Fig. 3b). However, in producer 2 these variables presented a slight increase at the beginning of the ripening process and a delayed decrease in hardness and $G' 1\text{ Hz}$. Nevertheless, at the end of the ripening period, hardness and storage modulus were similar for cheeses originated from both producers. According to the results observed in those figures, hardness and storage modulus can be considered as cheese structural indicators.

At the start of the study (0 d) cheeses from both producers presented similar structural indicators (Fig. 3). However, a delay in the ripening process was evident in the cheese of producer 2, which could be explained by the higher drying rate observed in the first week (-0.31% moisture/day for producer 1 and -0.51% moisture/day for producer 2; Fig. 4a) and by the initial decrease verified in the proteolysis indicator NPN/TN% (Fig. 4b). Roseiro et al. (2003a), studying RESS-cheeses, identified a proteolysis dependence during the production/ripening process. Therefore, differences in the ripening dynamics of raw ewes' milk cheeses seem to depend primarily on the quantity and quality of its natural enzymes which can, therefore, be considered main attributes of the raw milk quality (Tavaria et al. 2006).

The proteolysis indicators and pH showed a high correlation ($P < 0.05$) among the structural indicators (Table 1). In addition, the highest correlation observed was between hardness and NPN/TN (-0.92), suggesting that proteolysis explained the Serpa cheese softening. The correlation between moisture and structural indicators was positive. If structural changes were influenced by the drying process, we could have expected a negative correlation between those properties. This means that the effect of drying, on the cheese structural changes, was overtaken by the pH

and proteolysis effects. Taken together, these data and the information in Fig. 4a–e, suggest that softening of Serpa cheese is essentially characterized by an increase in proteolysis rate and a considerable pH decrease.

The pH profile was different in Serpa cheeses originated from the different producers (Fig. 4e). The minimum pH value was higher for cheeses coming from producer 1 (pH 5.4) compared with cheeses coming from producer 2 (pH 5.1). Nevertheless, the final pH at the end of the ripening period was similar in cheeses of the two producers: 5.7 for producer 1 and 5.6 for producer 2. Therefore, the main difference between cheeses originated from the two producers was the time taken to achieve the final pH rise: 28 d for producer 1 and 42 for producer 2. In addition, due to lactose metabolism acidity increased during cheese ripening up to d 14, and then decreased until the end of the ripening period (Fig. 4d). The falling pH (Fig. 4e) induced an effect of micelle demineralization (Ca bonds) and consequent dissociation, which were also responsible for cheese softening. This phenomenon causes a progressive dissociation of para κ particles into small casein aggregates and, therefore, in the protein links of the cheese matrix (Ramkumar et al. 1998; Boutrou et al. 2002; Hassan et al. 2004). Therefore, a reduction of the solid-like properties can be observed in samples presenting low pHs (28–42 d; Fig. 1).

Finally, the evolution of cheese colour was monitored during the ripening period. The data, presented in Fig. 4g–i, revealed a decrease in luminosity and a slight increase in both greenness and yellowness during cheese ripening, a similar result has been reported (Pinho et al. 2004). In addition, the highest average values presented by the b^* value in producer 1 could be connected to the higher fat content of their cheeses (Fig. 4f).

Ripening dynamic using PCA approach

PCA results, presented in Fig. 5, suggest that samples from the different producers showed differences in

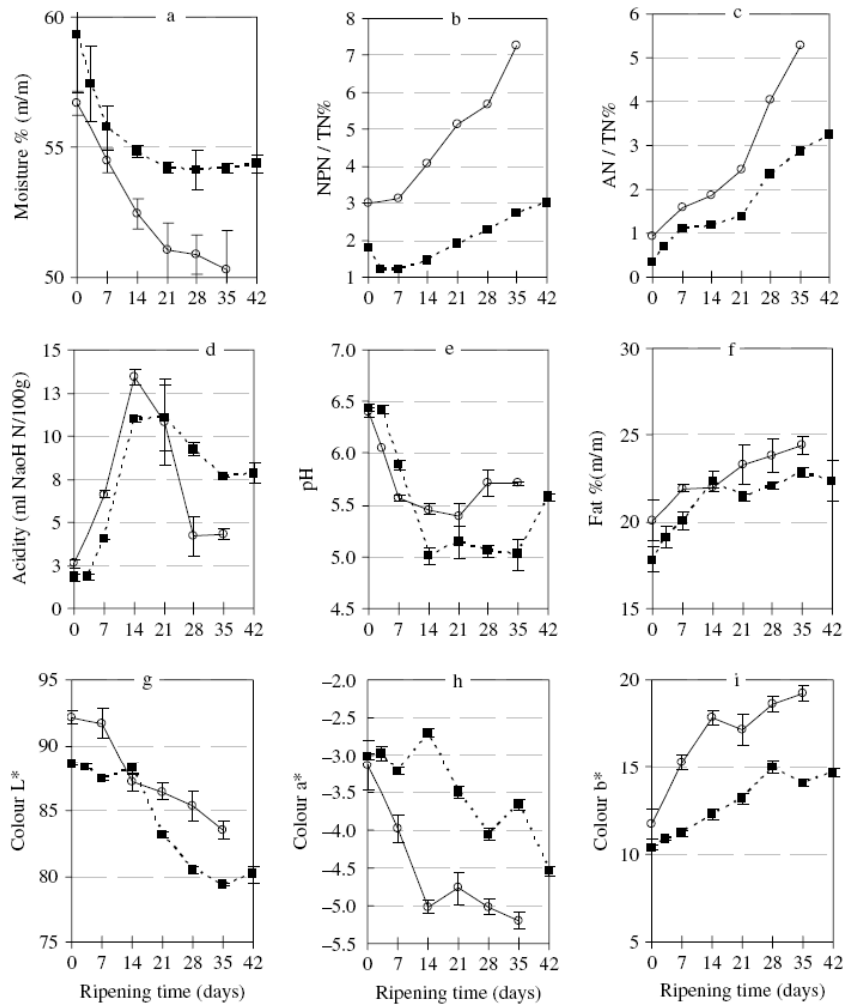


Fig. 4. Changes in: moisture (a), non-protein-N fraction (b), aminoacidic-N fraction (c), acidity (d), pH (e), fat (f) and colour parameters: L* (g), a* (h) and b* (i) for the producer 1 (—○—) and producer 2 (---■---) during ripening. Y error bars shows the 95% confidence level.

adhesiveness and luminosity. Samples from producer 1 were, in general, more luminous and less adhesive than those from producer 2 and these parameters were mostly explained by PC2. These were the main parameters that allow the differentiation of origin. In contrast, changes in Serpa cheese properties during ripening were mostly explained by PC1. For all parameters explained by this principal component, changes occurred faster at the beginning of the ripening process (14 d for producer 1 and 21 d for producer 2), and slowed down progressively towards the end of ripening. This can be deduced from the relative distance among the plotted samples: large distances between 0 d and 14 d (producer 1) or 21 d (producer 2) samples, and shorter distances between the other samples collected at the end of the ripening. This higher rate of the biochemical reactions at the beginning

Table 1. Correlation results (*r*) and *P* values between structural indicators (storage modulus and hardness) and proteolysis indicators (NPN/TN% and NA/TN%) and pH

	Storage modulus (Pa)		Hardness (N)	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Moisture % (m/m)	0.724	0.042	0.682	0.063
NPN/TN%	-0.836	0.010	-0.921	0.001
NA/TN%	-0.788	0.020	-0.878	0.004
pH	0.767	0.026	0.654	0.079

of the ripening process may derive from the use of raw milk, as suggested by other authors (Rosenberg et al. 1995; Awad, 2006).

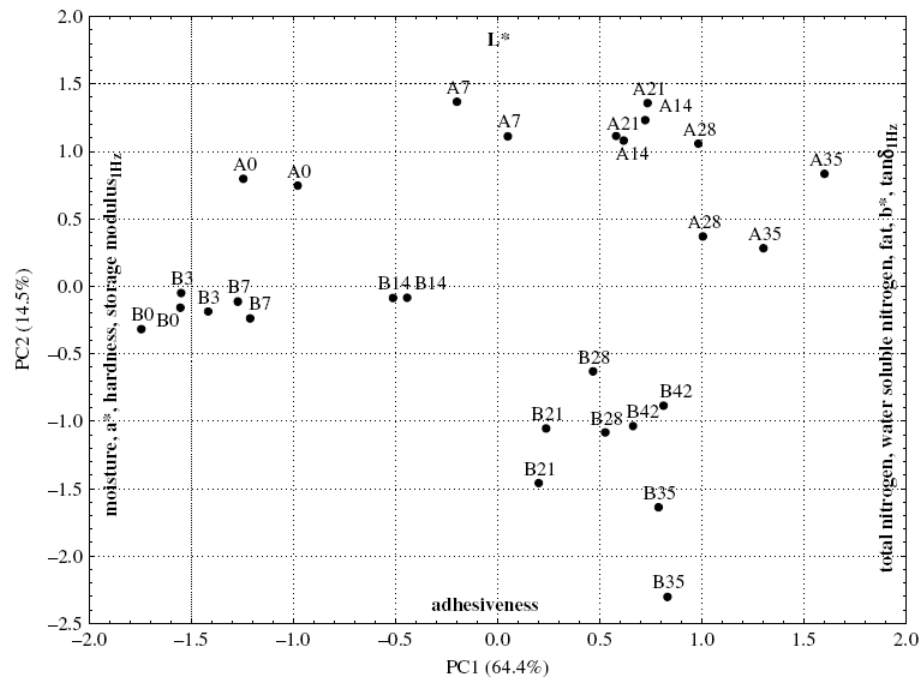


Fig. 5. PC1 vs. PC2 projection of samples. A0, A7, A14, A21, A28 and A35 are the samples of producer 1 with different ripening day times, and B0, B3, B7, B14, B21, B28, B35 and B42 are the samples of producer 2 with different ripening day times.

Estimation of Serpa cheese ripening time

A MLR analysis using the collected structural, chemical and colour data, was performed with the objective of developing a model that could allow the estimation of Serpa cheese ripening time (cheese age). This model might be useful to predict and guarantee food safety in Serpa Cheese. For this purpose, the model described by eqn (2), was followed (Draper & Smith, 1998).

$$Rt = \beta_0 + \beta_1 \chi_1 + \dots + \beta_n \chi_n + \varepsilon \quad (2)$$

In eqn (2), Rt represents ripening time, $\chi_1 \dots \chi_n$ are structural, chemical, and colour parameters, $\beta_0 \dots \beta_n$ represent model coefficients and ε is the additive error term. The data demonstrated that ripening time (age of cheeses) could be estimated with the 8 parameters (SN/TN, AN/TN, pH, a^* , b^* , $\log \alpha$, b and $\tan \delta_{1Hz}$). A graphical representation of the observed ripening time values vs. the predicted ripening time values was performed and it is presented in Fig. 6. The estimation of the cheese ripening period was performed for other types of ewes' milk cheeses using only chemical parameters based on quantification of protein fractions of α_{S1} -casein and α_{S1} -I peptide. This ripening time prediction model showed an estimation error of 2.5 d (Ferreira et al. 2006), and this was the smallest value found. When only dry matter, pH and a_w parameters were used, the prediction of the ripening period suffered an estimation error as high as 11.9 d (Poveda et al. 2004). Using both instrumental texture and colour

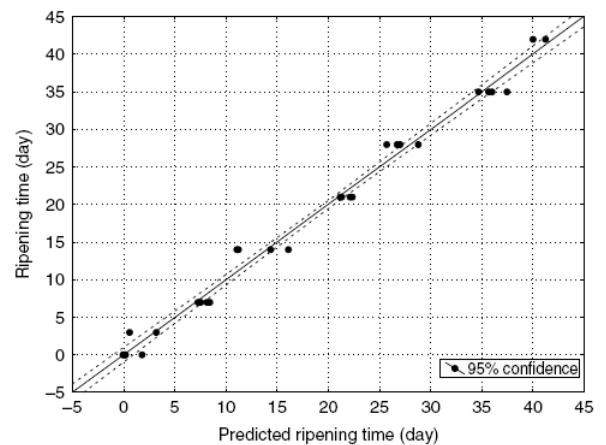


Fig. 6. Estimation of cheese ripening time.

parameters the error obtained forecasting ripening time was 4.2 d (Pinho et al. 2004). In the present proposed model, observed in eqn (3), the estimation error was 1.74 d and the adjusted R^2 was 0.98 ($P < 0.0001$). Therefore, using a combination of chemical, colour and rheological parameters we were able to obtain a MLR with a more satisfactory quality.

$$Rt = 218.93 + 0.92SN/TN + 8.10AN/TN - 8.86pH - 11.40a^* - 4.67b^* - 7.83 \log \alpha - 123.88b - 130.54 \tan \delta_{1Hz} \quad (3)$$

For safety reasons the model obtained in this study can assume a remarkable importance since, although it is not mandatory to display cheese age, it can be checked using the described approach. It is important to emphasize that this equation is valid only for Serpa Cheese and must be checked when an extrapolation to other RESS-cheeses is considered.

Conclusion

In this study a comprehensive analysis of several physical and biochemical parameters that characterize the ripening process of Serpa cheese was performed. Together the data suggest that from the several rheological parameters analysed, hardness and storage modulus were the most adequate indicators of the RESS-cheeses softening process during ripening. In addition, softening of Serpa RESS-cheeses occurring during ripening can be explained by changes in the protein network, such as the breakage of the protein-protein bonds, which occurred during proteolysis, and to the dissociation of sub-micelles caused by a pH decrease. Data presented here confirm that these processes occur mainly during the first 2–3 weeks of Serpa cheese ripening. Estimation of the ripening period, using 3 chemical, 2 colour and 3 rheological parameters, was possible with a standard error of 1.74 d and an adjusted R^2 of 0.98 ($P < 0.0001$). In the future, this equation should be used to assess the safety of Serpa cheese; this product is obtained from raw ewes' milk and, therefore, should not be sold before completing at least 30 days of ripening.

References

- AI-Otaibi MM & Wilbey RA 2006 Effect of chymosin reduction and salt substitution on the properties of white salted cheese. *International Dairy Journal* **16** 903–909
- AOAC 1990 *Official methods of analysis (15th edition)*. Washington: Association of Official Analytical Chemists
- Awad S 2006 Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. *Food Chemistry* **97** 394–400
- Boutrou R, Famelart M, Gaucheron F, Graet Y, Gassi J, Plot M & Leonil J 2002 Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. *Journal of Dairy Research* **69** 605–618
- Da Cunha CR, Viotto WH & Viotto LA 2006 Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal* **16** 215–224
- Dewettinck K, Deroo L, Messens W & Huyghebaert A 1999 Dynamic rheological properties of Gouda cheese as influenced by age and position. *Milchwissenschaft* **54** 258–262
- Draper NR & Smith H 1998 *Applied regression analysis*. New York: John Wiley
- Ferreira IMPLVO, Veiros C, Pinho O, Veloso ACA, Peres AM & Mendonca A 2006 Casein Breakdown in Terrincho Ovine Cheese: Comparison with Bovine Cheese and with Bovine/Ovine Cheeses. *Journal of Dairy Science* **89** 2397–2407
- Franco J, Raymundo A, Sousa I & Gallegos C 1998 Influence of processing variables on the rheological and textural properties of lupin protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **46** 3109–3115
- Freitas AC, Fresno JM, Prieto B, Malcata FX & Carballo J 1997 Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* **60** 219–229
- Hassan AN, Corredig M, Frank JF & Elsoda M 2004 Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research* **71** 116–120
- ISO 3432 1975 Cheese – Determination of fat content – Butyrometer for Van Gulik method. *International Organization for Standardization*
- Kasapis S, Paraskevopoulou A, Kiosseoglou A & Alevipoulou S 1997 Small deformation properties of model salad dressing prepared with reduced cholesterol egg yolk. *Journal of Texture Studies* **28** 221–237
- Kuchroo CN & Fox PF 1982 Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* **37** 331–335
- Park YW 2007 Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68** 73–87
- Pearce KN, Karahalios D & Friedman M 1988 Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese. *Journal of Food Science* **53** 432–438
- Pinho O, Mendes E, Alves MM & Ferreira IMPLVO 2004 Chemical, physical and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science* **87** 1–9
- Poveda JM, Garcia A, Martin-Alvarez PJ & Cabezas L 2004 Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chemistry* **84** 29–33
- Ramkumar C, Campanella OH, Watkinson PJ, Bennett RJ & Creamer LK 1998 The effects of pH and time on rheological changes during early cheese maturation. *Journal of Texture Studies* **29** 633–644
- Roseiro LB, Garcia-Risco M, Barbosa M, Ames JM & Wilbey RA 2003a Evaluation of Serpa cheese proteolysis by nitrogen content and capillary zone electrophoresis. *International Journal of Dairy Technology* **56** 99–104
- Roseiro LB, Wilbey RA & Barbosa M 2003b Serpa cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Lait* **83** 469–481
- Rosenberg M, Wang Z, Chuang SL & Shoemaker CF 1995 Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science* **60** 640–644
- Sousa MJ, Ardo Y & McSweeney PLH 2001 Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11** 327–345
- Szczesniak AS 1963 Classification of texture characteristics. *Journal of Food Science* **28** 385–389
- Tavaria FK, Reis PJM & Malcata FX 2006 Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* **16** 895–902
- Van-Hekken DL, Tunick MH & Park YW 2005 Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk Cheese. *Journal of Dairy Science* **88** 1966–1972
- Zalazar CA, Zalazar CS, Bernal S, Bertola N, Bevilacqua A & Zaritzky N 2002 Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal* **12** 45–50
- Zottola EA & Smith LB 1991 Pathogens in cheese. *Food Microbiology* **8** 171–182

