



# **Avaliação da aplicação de atmosfera modificada para o aumento da vida útil do Requeijão**

Laura Duarte Santiago

## **Orientadores**

Luís Pedro Mota Pinto de Andrade

Dissertação de mestrado apresentado à Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Março de 2017**



## Agradecimentos

Agradeço ao Centro Tecnológico de Apoio Tecnológico Agroalimentar de Castelo Branco - CATAA pela oportunidade de realizar este projeto nos seus laboratórios. Agradeço também a todos os colaboradores do CATAA, pela simpatia, paciência e ajuda que demonstraram ao longo destes meses, assim como por toda a transmissão de conhecimentos que me proporcionaram;

À Queijaria Henrique Santiago Lda..

Ao Doutor Luís Pedro Pinto de Andrade, pela confiança, ensinamentos, partilha de opiniões e ideias.

À Doutora Catarina Gavinhos, por toda a ajuda, assistência e paciência na análise estatística dos dados.

Aos meus pais, irmã, namorado e amigos, por me terem ouvido, aconselhado e dado força nos momentos de fraqueza. Muito Obrigada!

Por último à Escola Superior Agraria de Castelo Branco.



## Resumo

A vida útil de alimentos perecíveis preservados na atmosfera normal é limitada principalmente pelo efeito do oxigênio atmosférico e o crescimento de microrganismos aeróbios que causam alterações no odor, sabor, cor e textura, levando, conseqüentemente, à perda de qualidade.

A modificação da atmosfera prolonga significativamente a vida útil dos alimentos em comparação com a refrigeração, que pode aumentar de três a quatro vezes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da embalagem de requeijão em atmosfera modificada.

As amostras foram divididas em três lotes com diferentes percentagens de gás e embalados com aproximadamente 0,5 L de requeijão. Lote - T0 (embalagem de controle, sem atmosfera), segundo lote T1 (30% CO<sub>2</sub> + 70% de N<sub>2</sub>), terceiro lote T2 (50% CO<sub>2</sub> + 50% de N<sub>2</sub>). Estes três lotes foram conservados a uma temperatura de 2°C durante dezoito dias. As condições do requeijão foram avaliadas durante os dezoito dias, nas diferentes atmosferas, por meio de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

Embora o tratamento T2 tenha produzido resultados interessantes a nível microbiológico, o investimento da compra de uma termoseladora não é justificado, uma vez que, os outros tratamentos também obtiveram resultados semelhantes.

**Palavras-Chave:** Vida útil, requeijão, atmosfera modificada, análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais



## Abstract

The shelf life of perishable foods preserved in the normal atmosphere is limited mainly by the effect of atmospheric oxygen and the growth of aerobic microorganisms that cause changes in odor, taste, color and texture, leading to loss of quality.

Modifying the atmosphere significantly prolongs the shelf life of food compared to refrigeration, which can increase three to four times. The objective of this work was to evaluate the effect of the package of curd cheese in a modified atmosphere.

The samples were divided into three lots with different percentages of gas and packed with approximately 0.5 L of curd. Lot - T0 (control package, no atmosphere), second lot T1 (30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub>), third lot T2 (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>

). These three batches were stored at 2 ° C for eighteen days. The conditions of the curd were evaluated during the eighteen days, in the different atmospheres, through physical-chemical, microbiological and sensorial analyzes. Although the T2 treatment has produced interesting results at the microbiological level, the investment of the purchase of a Heat sealer is not justified, since the other treatments also obtained similar results.

**Keywords:** shelf life, curd cheese, modified atmosphere, physical-chemical, microbiological and sensorial analyzes



# Índice Geral

1. Introdução e objetivos .....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. Setor agroindustrial .....	2
2.2. Subsetor dos laticínios em Portugal .....	2
2.3. Matéria-prima.....	3
2.4. O mercado do soro lácteo em Portugal.....	4
2.5. Propriedades nutricionais do soro .....	5
2.5.1. Processo produtivo do requeijão .....	6
2.5.2. Estimativa de Rendimento.....	8
2.6. Aplicação da atmosfera modificada para aumento da vida útil do requeijão.....	9
2.7. Características microbiológicas do requeijão .....	11
2.8. Características físicas do requeijão.....	12
2.9. Denominação de Origem Protegida .....	12
2.10. Parâmetros microbiológicos.....	15
2.11. Parâmetros Físico-químicos.....	18
3. Material e métodos.....	21
3.1. Análise estatística.....	24
3.2. Determinações microbiológicas .....	24
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	24
3.2.2. <i>Salmonella spp</i> .....	25
3.2.3. Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	25
3.2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.2.5. Contagem de Microrganismos totais.....	27
3.2.6. Contagem de <i>Pseudomonas spp.</i> .....	27
3.2.7. Microrganismos psicrotróficos .....	27
3.2.8. Bolores e Leveduras .....	28
3.3. Determinações Físico-químicas.....	28
3.3.1. Determinação da humidade .....	28
3.3.2. Determinação da matéria gorda .....	28

3.3.3.	Determinação das cinzas .....	29
3.3.4.	Determinação do pH .....	30
3.3.5.	Determinação da proteína .....	30
3.3.6.	Determinação dos Hidratos de Carbono .....	31
3.3.7.	Perfil de Ácidos Gordos.....	31
3.3.8.	Acidez.....	31
3.3.9.	Açucares totais .....	32
3.10.	Valor energético/ Hidratos de carbono .....	32
4.	Resultados e discussão .....	33
3.2.	Estado do Requeijão em embalagem controlo (T0) nos dezoito dias. ....	33
3.2.1.	Parâmetros Físico-químicos .....	33
3.2.2.	Parâmetros Microbiológicos:.....	37
3.3.	Estado do requeijão em atmosfera modificada (30% CO <sub>2</sub> + 70% N <sub>2</sub> ) nos dezoito dias.....	39
3.3.1.	Parâmetros Físico-químicos: .....	39
3.3.2.	Parâmetros Microbiológicos:.....	41
3.4.	Estado do requeijão em atmosfera modificada (50%CO <sub>2</sub> + 50% N <sub>2</sub> ) nos dezoito dias.....	42
3.4.1.	Parâmetros Físico-químicos .....	42
3.4.2.	Parâmetros Microbiológicos:.....	44
3.5.	Teor de Ácidos gordos .....	45
4.	Análise Sensorial.....	46
5.	Considerações finais .....	54
6.	Perspetivas futuras .....	55
Anexo.....		59

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Obtenção do Soro, após a elaboração do queijo	6
<b>Figura 2 -</b> Formação dos primeiros flocos.	7
<b>Figura 3 -</b> Requeijão embalado	7
<b>Figura 4 -</b> Esquema de produção do requeijão	8
<b>Figura 5 -</b> Logotipo que acompanha os produtos com Denominação de Origem Protegida (DOP) pela União Europeia.	15
<b>Figura 6 -</b> Parâmetros analisados no dia de fabrico em embalagem controlo	21
<b>Figura 7 -</b> Requeijão com 4 dias - Tratamento 0: Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30% CO <sub>2</sub> +70%N <sub>2</sub> ) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	22
<b>Figura 8 -</b> Requeijão com 9 dias - tratamento 0: Embalagem controlo; tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO <sub>2</sub> +70%N <sub>2</sub> ) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	22
<b>Figura 10 -</b> Requeijão com 18 dias - Tratamento 0: Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO <sub>2</sub> + 70%N <sub>2</sub> ) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50% CO <sub>2</sub> + 50% N <sub>2</sub> )	23
<b>Figura 9 –</b> Requeijão com 14 dias - Tratamento 0 : Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO <sub>2</sub> +70%N <sub>2</sub> ) e tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	23
<b>Figura 11 –</b> Pesagem das amostras para o parâmetro <i>Listeria monocytogenes</i>	24
<b>Figura 12 –</b> Preparação das placas com o meio de cultura Baird-Parker RPF Agar (BPA)	26
<b>Figura 13 -</b> Butirómetros em banho-maria para determinação da matéria gorda	29
<b>Figura 14 -</b> Capsulas de porcelana no excitador, para determinação das cinzas	29
<b>Figura 15 -</b> Determinação do teor de proteína pelo método kjeldahl	30
<b>Figura 16 -</b> Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa	31
Figura 17 - Determinação dos açúcares totais através da coluna spe	32
<b>Figura 18 -</b> Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo na embalagem controlo.	34
<b>Figura 19 -</b> Variação do valor de pH ao longo do tempo na embalagem controlo.	35
<b>Figura 20 -</b> Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo na embalagem controlo.	36
<b>Figura 21-</b> Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo na embalagem com atmosfera modificada (30%CO <sub>2</sub> + 70%N <sub>2</sub> )	40
Figura 22- Variação do valor de pH ao longo do tempo na embalagem com atmosfera modificada (30%CO <sub>2</sub> + 70%N <sub>2</sub> )	40
<b>Figura 23 -</b> Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (30%CO <sub>2</sub> +70%N <sub>2</sub> )	41

<b>Figura 24</b> - Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> ).	43
<b>Figura 25</b> - Variação do valor de ph ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	43
<b>Figura 26</b> - Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	44

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Produção de Queijo e Requeijão de 2005 a 2014	3
<b>Tabela 2</b> - Comparação da composição físico-química de vários tipos de leite (adaptado de: Alfa laval)	4
<b>Tabela 3</b> - Vantagens e Desvantagens da utilização da MAP (adaptado de Silverstick et al., 2002a; Philipps, 1996).	11
<b>Tabela 4</b> - Características físico-químicas do requeijão (DO)	12
<b>Tabela 5</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem controlo	33
<b>Tabela 6</b> - Resultados dos parâmetros microbiológicos relativos à embalagem controlo	37
<b>Tabela 7</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem com atmosfera modificada (30%CO <sub>2</sub> +70%N <sub>2</sub> )	39
<b>Tabela 8</b> - Resultados dos parâmetros microbiológicos relativos à embalagem com atmosfera modificada (30% CO <sub>2</sub> + 70% N <sub>2</sub> )	41
<b>Tabela 9</b> - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem com atmosfera modificada (50% CO <sub>2</sub> + 50% N <sub>2</sub> )	42
<b>Tabela 10</b> - Resultados dos parâmetros microbiológicos referentes à embalagem com atmosfera modificada (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )	44
<b>Tabela 11</b> - Resultados dos três embalamentos relativamente ao parâmetro Teor de ácidos gordos	45
<b>Tabela 12</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor no dia 0 em embalagem controlo	47
<b>Tabela 13</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem controlo	48
<b>Tabela 14</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 18º dia em embalagem controlo.	48
<b>Tabela 15</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura no dia 0 em embalagem controlo	48
<b>Tabela 16</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem controlo	48
<b>Tabela 17</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem controlo	48
<b>Tabela 18</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global no dia 0 em embalagem controlo	49
<b>Tabela 19</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem controlo	49
<b>Tabela 20</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global no 18º dia em embalagem controlo	49

<b>Tabela 21</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	50
<b>Tabela 22</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor no 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	50
<b>Tabela 23</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	50
<b>Tabela 24</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	51
<b>Tabela 25</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	51
<b>Tabela 26</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N <sub>2</sub> +30%CO <sub>2</sub> )	51
<b>Tabela 27</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	52
<b>Tabela 28</b> - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	52
<b>Tabela 29</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	52
<b>Tabela 30</b> - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	53
<b>Tabela 31</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	53
<b>Tabela 32</b> - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N <sub>2</sub> +50%CO <sub>2</sub> )	53

## **Abreviaturas**

**APT**- Agua peptonada tamponada

**ATM** – Atmosfera Modificada

**BPA**- Baird Parker Agar

**CATAA** – Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar

**DOP**- Denominação de Origem Protegida

**INE**- Instituto Nacional de Estatística

**MAP**- Modified atmosphere packaging

**PCA** – Plate Count Agar

**RPF** – Rabbit Plasma Fibrinogen

**SS Agar** – Salmonella Shigella Agar

**UFC**- Unidades formadoras de Colónias



## 1. Introdução e objetivos

Desde os tempos dos nossos ancestrais que a produção de leite e seus derivados fazem parte da economia do país e do sustento das famílias, muito devido às condições climáticas e geográficas de Portugal, onde abundam os pastos verdejantes e a pastorícia. Os laticínios, nomeadamente o setor agroalimentar, sempre se revelaram de extrema importância para a economia industrial, não só em termos de produção industrial, mas também, pelo elevado número de produtores de que dependem diretamente desse setor, especialmente em regiões do interior de Portugal, nomeadamente na região da Serra da Estrela (Beira, 2008).

O produtor de queijos, Henrique Santiago, criou a empresa “Henrique Santiago, Lda.” há cerca de vinte e cinco anos. Sedeada em Castelo Branco, conta, atualmente, com seis colaboradores e tem como principal atividade, a produção de queijo e como atividade secundária a produção de requeijão, sempre numa perspetiva de produção artesanal. Devido à crescente preocupação ambiental e o movimento em defesa do meio ambiente, sentiu-se a necessidade de se procurarem alternativas que vão de encontro ao desenvolvimento sustentável. Uma vez que, neste sector se produzem quantidades razoáveis de efluentes líquidos e estes, por sua vez, apresentam elevada carga orgânica, neste caso o soro resultante da produção do queijo, esta queijaria tem como grande objetivo aumentar a sua produção de requeijão.

O soro de leite é um líquido diluído que contém lactose, proteínas, minerais, e vestígios de ácidos gordos e orgânicos, para além de cálcio. O Soro contém 7 % de sólidos totais, sendo 75 % de lactose e 10 % de proteína de soro (Mulvihill, 1991). O requeijão é um produto obtido a partir do soro do leite de ovelha e muitas vezes com uma mistura de soro de leite de cabra (Guiné *et al.*, 2012). É rico em proteína, lactose e água. Para além da produção de Requeijão, uma das formas de aproveitar o soro é através da produção de bebidas à base de soro de queijo de cabra, aromatizado com morango e polpa de pêsego. Estas bebidas têm um baixo valor calórico, apresentam uma boa aceitabilidade parte dos consumidores e têm um custo mínimo adicional para a indústria dos laticínios (Tranjan *et al.*, 2009). A produção de um molho para salada com soro de leite como fase aquosa também pode ser uma alternativa para a indústria alimentar (Fonseca *et al.*, 2009)

O objetivo primordial do presente trabalho é estudar a embalagem em atmosfera controlada, dentro das instalações da queijaria, ou seja, garantir que o requeijão quando é expedido possui a mesma qualidade que no dia em que é laborado, este embalamento, deve proporcionar o aumento da sua validade comercial, diminuindo perdas com a sua deterioração e facilitando a sua comercialização, pois o requeijão é muito perecível e caso ocorra uma contaminação durante a produção ou mesmo no armazenamento, irá afetar as suas propriedades físico-químicas, que por sua vez irão condicionar a aceitação pelo consumidor. O efeito bacteriostático da embalagem em atmosfera modificada deve-se à ação do CO<sub>2</sub>, que aumenta a fase de adaptação e

diminui a taxa de crescimento microbiano, para isto é necessário encontrar a mistura de gases ideal. (Mantilla *et al.*, 2010)

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Setor agroindustrial**

O peso da indústria agroalimentar é incomparável a qualquer outro setor industrial, visto que contribui com dois bilhões de euros positivos na balança comercial. O setor agroindustrial tem um peso muito importante na economia da Europa. Sendo atualmente o maior setor industrial. Em 2010 era composto por 310 mil empresas, com 4,4 milhões de postos de trabalho na União Europeia e com resultados de um volume de negócios de 965 bilhões de euros.

Dada a sua grande dimensão e evolução nos últimos anos, e para se estabelecer a ligação entre fornecedor e cliente, este setor teve também de se associar a cadeias de abastecimento, a fim de salvaguardar os valores dos produtos. É importante referir que tem um importante papel na economia do setor primário, pois é responsável pela compra e transformação de 70% da produção agrícola da União Europeia. No setor agroalimentar as PME representam 48,7% do total da faturação e geram 63% do total de postos de trabalho. Em 2008 este setor detinha 12,9 % do peso da economia das indústrias transformadoras, ficando à frente da indústria química e da indústria automóvel (CIAA,2010;Gregório,2010).

### **2.2. Subsetor dos laticínios em Portugal**

Em 2007 existiam em Portugal cerca de 560 queijarias de menores dimensões, sendo que 60% estavam instaladas na Beira Interior e 31% no Alentejo, destas apenas 36% estavam licenciados pela MADRP. (Costa,2011).

Importa destacar que em 2009 ocorreu uma grande queda na produção de queijo e requeijão, dado que passou de 79 549 toneladas em 2005 para 73 696 toneladas em 2009, posteriormente verificou-se uma subida gradual, chegando a atingir no ano de 2014 o valor de 78 536 toneladas, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1- Produção de Queijo e Requeijão de 2005 a 2014

Ano	Queijo e Requeijão- Produção anual (a) Unidade- Tonelada
2005	79 549
2006	77 767
2007	79 517
2008	77 051
2009	73 696
2010	76 458
2011	78 951
2012	78 467
2013	75 734
2014	78 536

a) Inclui a produção na exploração agrícola e a produção industrial (Fonte: INE: 2016)

### 2.3. Matéria-prima

O leite é a matéria-prima essencial para o fabrico do requeijão. É um produto muito complexo e a sua composição varia em função da espécie, da raça, da estação do ano, e até mesmo do período do dia, manhã ou tarde, em que é obtido. O leite traz na sua composição a influência da natureza do solo onde a pastagem é produzida, a variedade da composição dessa pastagem, as práticas de pastorícia, os microrganismos característicos desse ambiente e, certamente, as características do animal que o produziu. Tudo isto vai caracterizar a textura e o sabor do requeijão que se produz após o fabrico do queijo.

Qualquer que seja a sua origem, o leite é composto pelos mesmos constituintes maioritários, variando apenas a percentagem de cada um deles, como se pode verificar na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação da composição físico-química de vários tipos de leite (adaptado de: Alfa laval)

	Ovelha	Vaca	Cabra
<b>Matéria Seca (%)</b>	17,4 - 18,9	10,5 - 14,3	11,9 - 14,0
<b>Gordura (%)</b>	6,0 - 7,5	2,8 - 4,8	4,1 - 4,5
<b>Alb. Glob. (%)</b>	0,9 - 1,1	0,3 - 0,8	0,4 - 1,0
<b>Caseína (%)</b>	4,3-4,6	2,5-3,6	2,5-3,3
<b>Lactose (%)</b>	4,3-4,8	4,2-5,0	4,1-4,4
<b>Cinzas (%)</b>	0,9	0,7-0,9	0,8
<b>Cálcio (mg/l)</b>	2030	1360	-
<b>Sódio (mg/l)</b>	360	460	-
<b>Vit. A (mg/l)</b>	0,5	0,3	-
<b>Vit. E (mg/l)</b>	15,8	7	-
<b>Vit. C (mg/l)</b>	40,0	22	-
<b>Kcal/100g</b>	113	73	77

## 2.4. O mercado do soro lácteo em Portugal

O soro lácteo é um subproduto da indústria queijeira, que constitui um grave problema ambiental quando descarregado nos cursos de água, obrigando a que os efluentes desta indústria sejam submetidos a tratamentos onerosos e por vezes ineficazes. Sendo, por outro lado, passível de aproveitamento e valorização como fonte de lactose, de proteínas e de outros derivados, com potencial de utilização na alimentação humana e animal, é importante conhecer o respetivo mercado, em termos de produção e comércio global, utilização atuais e potenciais, e tendências evolutivas.

Nas últimas décadas, tem-se verificado um aumento da produção de soro devido a um crescimento da população e do conseqüente aumento da procura mundial de queijo (Chandan, *et al.*, 2011). Em 2008, foram produzidas cerca de 186 milhões de toneladas de soro (Affertsholt, 2009).

Na União Europeia, podem ser encontrados a maioria dos produtores, o que torna este mercado, o mais desenvolvido em todo o mundo, existindo uma forte competitividade.

O valor dos produtos do soro é proporcional dependendo do processo tecnológico que lhe dá origem. Os produtos com menor processamento, como o soro ou lactose em pó possuem um valor inferior às proteínas purificadas, já os concentrados de proteínas do soro e a lactose para fórmulas infantis ou farmacêuticas possuem

valores comerciais intermédios. O soro líquido possui um valor comercial quase nulo (Chandan, *et al.*, 2011).

## 2.5. Propriedades nutricionais do soro

O soro possui um valor nutritivo elevado. Para o soro passa a maior parte da água do leite, quase toda a lactose (88-99%), proteínas (21-25%), lípidos (6-12%) e sais minerais (62-89%) (Pintado e Malcata, 1999). A proteína do soro do leite é completa e de alta qualidade, com um rico perfil de aminoácidos. Esta proteína contém um amplo espectro de aminoácidos incluindo os essenciais e os de cadeia ramificada, que são importantes no crescimento e no reparo tecidual. A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada essencial na síntese proteica e foi recentemente identificada como tendo um papel crítico no metabolismo da insulina e da glicose.

Em Portugal existe uma tradição de fabrico de um queijo de soro de leite chamado Requeijão, produzido especialmente com soro de leite de ovelha (Pintado *et al.*, 1996). O requeijão é um produto de elevado valor nutricional, pois é rico em proteína (8,5%) e gordura (29%). Cerca de 50% da massa do requeijão é água e o conteúdo de lactose e ácido láctico é de 3,5% e 0,5%, respetivamente (Pintado e Malcata, 1999).

Verificou-se um aumento da longevidade em idosos, numa série de regiões rurais de Portugal, que sobrevivem com uma dieta baseada essencialmente em requeijão, complementada pelo rescaldão (soro resultante do fabrico do requeijão) como bebida de acompanhamento (Tavares e Malcata, 2011).

O consumo de requeijão contendo estirpes probióticas tem aumentado nos últimos anos, devido às melhorias do estado de saúde associado (Madureira *et al.*, 2008). Esta tendência tem impulsionado a produção de novos produtos. Foram produzidos requeijões a partir de soro de ovino ou bovino, inoculados com uma estirpe probiótica (*Lactobacillus paracasei* LAFTI (R) 26) á qual se adicionou açúcar, açúcar e aloé vera, açúcar e chocolate, açúcar e geleia. As substâncias adicionadas melhoraram as características organolépticas dos requeijões e produzem diferentes padrões de textura (Madureira *et al.*, 2012)

O método tradicional de produção de Requeijão baseia-se no aquecimento do soro, de modo que a coalhada sobe espontaneamente até à superfície, e é depois moldada em moldes de plástico deixando-se escorrer e arrefecer durante alguns minutos (Pintado *et al.*, 1996). Cruz *et al.* (2009) refere que o requeijão pode apresentar benefícios ao nível do trato gastrointestinal. É um alimento importante e altamente recomendado pelos nutricionistas. Como é um produto muito perecível, é importante alargar a sua vida de prateleira e mantê-lo fresco durante um longo período de tempo. Uma das formas de preservar o requeijão é através da técnica de

embalamento a vácuo, que altera o ambiente em torno do produto na embalagem, a fim de retardar as alterações sensoriais e microbiológicas (Khoshgozaran *et al.*, 2012)

### 2.5.1. Processo produtivo do requeijão

A composição do soro depende do leite, pois no fabrico dos queijos da Beira Baixa pode ser utilizado leite de ovelha ou leite de ovelha e cabra, consoante o tipo de queijo que se está a laborar, ou seja, queijo de ovelha ou queijo de mistura.

#### **Obtenção do Soro:**

O soro é o produto que se liberta por sinérese aquando do corte da coalhada, formada a partir da adição do coalho ou cardo ao leite. Após a separação coalhada/soro na francela, o soro é encaminhado até à tina do requeijão.



**Figura 1-** Obtenção do Soro, após a elaboração do queijo

### **Aquecimento do soro / Coagulação:**

Na tina do requeijão, o soro é aquecido à temperatura de 95°C durante pelo menos 1 hora e 30 minutos.

Com o aquecimento do soro, surge a coagulação das albuminas e globulinas. Após a precipitação proteica, emerge à superfície uma coalhada em flocos designada por requeijão, que é retirada com o auxílio de uma escumadeira.



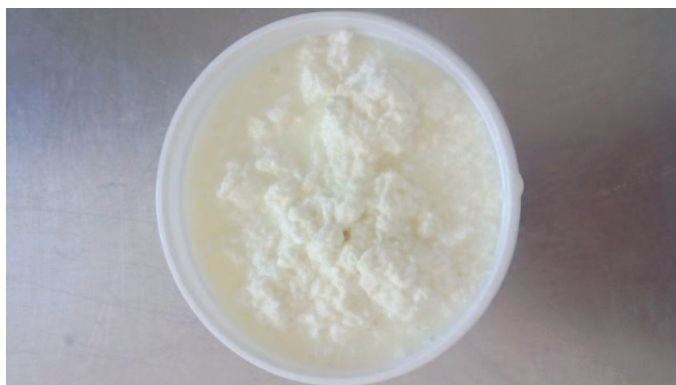
**Figura 2** - Formação dos primeiros flocos.

### **Enchimento da massa/Embalamento/Armazenamento:**

O requeijão é colocado em caixas de plástico próprias para a indústria alimentar, rotulado e armazenado em câmara frigorífica á temperatura de 2º C, até ser expedido.

### **Expedição**

A expedição é feita através da distribuição e no posto de venda da queijaria.



**Figura 3** - Requeijão embalado

Na figura 4, está representado o diagrama de fabrico do Requeijão em estudo.

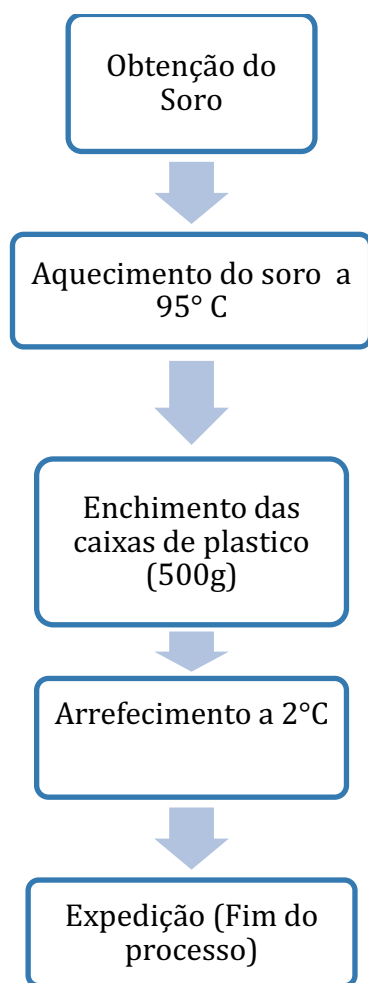


Figura 4 - Esquema de produção do requeijão

### 2.5.2. Estimativa de Rendimento

Na produção de 200 L de queijo, é obtido em média 100 L de soro, dependendo claro do rendimento do leite que é condicionado pela sua composição que apresenta variações ocasionadas por diversos fatores como: espécie, raça, fisiologia (estado do úbere, idade), alimentação, estações do ano, doenças, período de lactação, ordenha (número, intervalo e processo), fraudes e adulterações.

Estima-se que para produzir um requeijão são necessários 5 litros de soro, que resultam numa massa de 500 g de requeijão. Assim sendo, para a produção diária de 80 unidades, são necessários 400 L, obtendo-se 40 kg de requeijão.

Deste modo, a queijaria por semana labora em média 2400 L de leite por semana, ou seja obtém no total 1200 L de soro o que equivale a 120kg de requeijão.

## 2.6. Aplicação da atmosfera modificada para aumento da vida útil do requeijão

No desenvolvimento de novos produtos, a determinação da vida útil é fundamental, sendo definida como o tempo decorrido entre a produção e o armazenamento, até que se torne inaceitável ao consumo (Ellis, 1996). Lewis e Dale (1996) definiram vida útil de produtos processados como o número de dias que esses podem ser consumidos, mantendo suas qualidades atrativas e atendendo aos padrões estabelecidos. Inicialmente, identificam-se as características dos ingredientes, processamento e condições de conservação o que podem influenciar a vida de prateleira do produto.

Monitorizando-se e controlando-se esses parâmetros, pode-se determinar exatamente o final do tempo de vida útil, ou seja, o momento em que o produto não se encontra mais seguro para o consumo. Para determinar a vida útil de alimentos, é essencial determinar os fatores que podem causar alterações químicas, físicas e biológicas, os quais vão resultar em alterações sensoriais, que vão limitar esse período de conservação (Walker, 1996).

O processo de atmosfera modificada, começa a ganhar efetiva aplicação na conservação de alimentos em 1940. Em 1967, com os trabalhos de Kader em hortofrutícolas deram significativo impulso na utilização desse processo. Em 1980, Brecht discute conceitos associados com o uso de atmosfera modificada e refrigeração, e, com isto, o respetivo efeito sinérgico resultante da interação destes dois processos sobre produtos alimentícios.

A atmosfera modificada, além de ser vista como um processo integrado alimento/gás/embalagem, ganha aplicação a partir do momento em que passa a ser vista como um processo multidisciplinar, que utiliza princípios das ciências química, física e microbiológica dos alimentos (Souza *et al.*, 2001)

A ideia de modificar a atmosfera ao redor de um produto alimentício com o fim de aumentar a sua vida útil, transformou-se em tecnologia aplicada comercialmente na preparação de carnes, produtos lácteos, aves, pescado, frutas, hortaliças. A substituição do ar atmosférico por uma mistura otimizada de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> pode propiciar um aumento de vida útil, evitando a degradação dos alimentos, pois estas misturas inibem o crescimento microbiano, evitam o ranço proveniente de enzimas bacterianas e oxidação e inibem a respiração de tecidos (King e Nagel, 1975; Sarantópoulos e Oliveira, 1990 e Sarantópoulos e Soler, 1994)

A extensão da validade comercial do produto embalado em atmosfera modificada ocorre graças à baixa concentração de O<sub>2</sub>, resultando no controlo de bactérias aeróbias, que são as principais responsáveis pela deterioração. Além disso, a alta concentração de CO<sub>2</sub> também aumenta a validade comercial dos alimentos embalados. O efeito antimicrobiano do CO<sub>2</sub> ocorre em concentração igual ou acima de

10%, aumentando conforme se aumenta sua concentração na embalagem. Usando 20% de CO<sub>2</sub>, é possível controlar o crescimento de muitos aeróbios, incluindo *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Moraxella* spp., contudo, altas concentrações podem estimular o crescimento de *C. botulinum* (Floros e Matsos, 2005).

Embora o mecanismo da atividade antimicrobiana do CO<sub>2</sub> não esteja completamente entendido, sabe-se que o CO<sub>2</sub> estende a fase de retardo do crescimento microbiano de muitas maneiras: penetra na parede da célula microbiana e altera a permeabilidade celular; solubiliza-se dentro da célula e produz ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que reduz o pH da célula e, finalmente, interfere em muitos caminhos enzimáticos e bioquímicos dentro da célula microbiana, reduzindo a sua taxa de crescimento (Floros e Matsos, 2005).

Em geral, as bactérias Gram negativas são mais sensíveis à inibição pelo CO<sub>2</sub> do que as Gram positivas, sendo as pseudomonas classificadas como as mais sensíveis, e os clostrídios, como os mais resistentes.

Fungos, leveduras e bactérias aeróbias deteriorantes são altamente suscetíveis ao CO<sub>2</sub>. As bactérias facultativas podem ou não ser inibidas pelo CO<sub>2</sub>, enquanto as bactérias ácido-láticas e anaeróbias são altamente resistentes (Finne, 1982) Bactérias, como as da espécie *Brochothrix thermosphacta*, podem tolerar níveis de CO<sub>2</sub> acima de 75%, e outras, como as bactérias ácido-láticas, podem crescer em 100% de CO<sub>2</sub> (Smith *et al.*, 1990).

**Tabela 3** - Vantagens e Desvantagens da utilização da MAP (adaptado de Silverstick et al., 2002a; Philipps, 1996).

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Aumento do período de vida útil (50-400%)	Aumento dos custos
Redução das perdas por expiração do prazo de validade	Controlo imprescindível da temperatura
Produto de melhor qualidade	Especificações de atmosfera adequada a cada tipo de produto
Melhor separação de produtos fatiados	Especificação de pessoal e equipamento especial
Com poucos ou mesmo sem adição de conservantes	Maior volume de embalagens
Melhor apresentação dos produtos	Perda de benefícios após abertura da embalagem
Embalagens seladas, barreiras contra a contaminação e perda de líquidos	A dissolução de CO <sub>2</sub> pode levar ao colapso da embalagem
Embalagem prática e sem cheiro	

## 2.7. Características microbiológicas do requeijão

Em termos gerais, dentro do campo da microbiologia de alimentos, sem dúvida as contaminações microbianas dos alimentos são indesejáveis e inclusive nocivas. Este aspeto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiénicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para microrganismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogénicos que encontram no alimento um meio propício para o desenvolvimento e até mesmo a liberação de substâncias tóxicas (Franco e Almeida, 1992).

A microbiota do requeijão pode ser constituída por microrganismos desejáveis ou benéficos e indesejáveis ou patogénicos. A presença de microrganismos benéficos contribui para as características organolépticas, conservação e condições higieno-sanitárias do produto.

A presença de microrganismos patogénicos é pouco provável uma vez que o requeijão no seu processamento atinge uma temperatura de 95°C, no entanto pode ser resultante de contaminações relacionadas com higiene inadequada no momento do pré-embalamento (escorrimento) ou mesmo durante o embalamento.

## 2.8. Características físicas do requeijão

O Requeijão da Beira Baixa apresenta-se como um produto fresco, que não sofreu qualquer fermentação. A massa tem uma consistência macia, fatiável ou untável, bem ligada e granulosa, lisa ao corte, de cor branca e sabor láctico adocicado. O peso de cada unidade pode variar entre 150 a 400 gramas (Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações, 2011).

## 2.9. Denominação de Origem Protegida

Para que o Requeijão da Beira Baixa possa ser reconhecido como Denominação de Origem (DO) tem de respeitar os critérios estabelecidos pelo Despacho n.º 4184/2011 publicado em Diário da República, 2ª Série, n.º45 de 4 de Março de 2011. De acordo com este despacho o Requeijão da Beira Baixa DO tem de cumprir as características apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Características físico-químicas do requeijão (DO)

Parâmetros	Limites
Humidade	60 a 70%
Gordura Total	14g a 19g/100g de produto
Proteína Total	10g a 13g/100g de produto
Cinzas	1,4 a 1,8g/100g de produto

### História do Requeijão da Beira Baixa DOP

A história pastoril da região da Beira Baixa encontra-se intimamente ligada aos fluxos migratórios conhecidos como transumância.

Desde épocas imemoráveis que os rebanhos da Serra de Estrela se deslocavam para esta região em busca de sustento impossível de conseguir nas regiões de origem devido aos rigores Invernais. Segundo Ribeiro, O. (1941), este fluxo migratório iniciava-se em Novembro com a deslocação do gado alavão, mais sensível aos frios e carente de alimento, para entre outros destinos, as Campinas da Idanha, Campo Albicastrense e Cova da Beira, ficando-se alguns por destinos intermédios, mas mantendo-se, regra geral, nos locais de pastagem de inverno até ao mês de Abril. (Mattoso, et. al., 1997)

A persistência da transumância deve-se, no caso da Beira Baixa, ao prolongamento, até uma data recente, de formas de utilização da terra que associavam entre si aproveitamentos diferentes. Nesta região havia e há, grandes

latifúndios, como no Alentejo, mas também formas de posse e de utilização coletivas da terra que lembram Trás os Montes. (Mattoso et. al., 1997)

Com o passar dos anos este uso esmoreceu, referindo Dias, J. (1955), como causas principais a arborização que reduziu os pastos da Serra e conseqüentemente a riqueza pecuária da região, bem como a maior divisão da propriedade e sua ocupação com culturas intensivas, especialmente na região da Campina de Idanha.

Relatos feitos por vários autores ao longo do século XVIII, recolhidos por Dias, J. (2000), apontam para que na província da Beira Baixa se desenvolveria uma economia agro pastoril, restringindo-se a indústria às principais cidades. De um modo geral a agricultura baseava-se no fabrico de azeite e vinho, produção de trigo e centeio. A pastorícia, por sua vez, baseava-se na produção de ovinos e caprinos.

A primeira referência à produção de requeijão na região da Beira Baixa, de que temos conhecimento, chega-nos pela pena de Porfírio da Silva, que no ano de 1853, referindo-se à cidade de Castelo Branco, escrevia o seguinte: *“Os terrenos da parte ocidental da cidade são d’ uma natureza mais ingrata do que os que ficam na oriental (...) e n’elles se apascentam muitos rebanhos de gado lanígero que os aduba com seus estrumes e que produzem boas lãs e queijos, e os melhores requeijões que há no reino (...)”*

*“Em todas as queijarias da Beira Baixa se produz requeijão destinado à venda, no caso das localizadas junto das povoações importantes ou destinado ao consumo do pessoal da exploração, no caso das queijarias mais isoladas.”*

Viana (1967), referindo-se às leiteiras que diariamente se deslocavam de Alcains para venderem o leite aos albicastrenses, afirma que transportavam além do leite em cântaros, ferrados com requeijão e cestos com requeijões pequeninos. Esta dualidade de formas de transporte (ferrados e cestos), indica-nos que sempre se produziu requeijão e travia na região, denominações pelas quais, segundo Rebelo, A. (1994) seria conhecido na Beira Baixa, aplicando-se o termo Travia quando a venda se fazia ao litro, em recipientes designados por ferrados, dadas as características de fluidez do produto.

A produção de lacticínios tradicionais na região da Beira Baixa, reveste-se nos dias de hoje de uma grande importância cultural, na medida que representa o preservar de uma tradição com séculos de existência, como já antes verificámos com as referências históricas que diversos autores lhes fizeram, importância acrescida no caso da produção do Requeijão da Beira Baixa, dado que se aproveita e valoriza um produto potencialmente poluente, o soro.

Inegável é a importância socioeconómica de que se reveste esta atividade, com o aproveitamento de importantes recursos locais como sejam a mão de obra de uma região pobre e despovoada, e a valorização de matérias primas locais, que numa lógica de diversificação da produção agrícola, indo ao encontro da tendência por parte dos consumidores de privilegiarem a qualidade em detrimento da quantidade, se tem tornado nos últimos anos um trunfo importante para a melhoria do rendimento dos agricultores, contribuindo para a fixação da população rural desta região desfavorecida e para a preservação do ambiente, evitando a erosão e explorando recursos naturais autóctones ou bem adaptados à região. (Requeijão da Beira Baixa DOP-Caderno de Especificações)

### **Importância económica, social e cultural para a região**

O Requeijão da Beira Baixa goza de elevada notoriedade, junto dos consumidores que o procuram, reconhecem o seu nome e sabem que a sua origem está ancestralmente ligada à região que lhe deu o nome.

A sua qualidade nutritiva e organolética fazem dele um produto apreciado quer em mesa de ricos quer em mesa de pobres.

Se, em tempos idos, o soro, subproduto da laboração dos Queijos da Beira Baixa, simples ou com sopas de pão, terá servido na maior parte dos casos para alimentar famílias inteiras, dado os fracos recursos económicos da maioria da população, atualmente, por ser um produto de elevada percentagem de proteínas e baixo teor em gordura, é bastante apreciado como complemento final de uma refeição ou mesmo como refeição ligeira de famílias mais abastadas.

Consumido simples, misturado com mel, compotas de fruta, frutos secos ou como ingrediente de bolos e doces diversos, o Requeijão da Beira Baixa é um produto de inegável interesse económico, permitindo rentabilizar as queijarias e valorizar comercialmente um subproduto dos leites de ovelha e cabras.

Atualmente o fabrico deste produto continua a revestir-se de interesse primordial já que constitui um pilar da cultura e economia da região:

- Proporcionando a manutenção, se não mesmo a melhoria do índice de fertilidade dos solos, uma vez que se não for rentabilizada a produção de queijo e outros produtos da fileira, o número de rebanhos diminuirá, diminuindo drasticamente a fertilização natural causada pelos animais;

- Não delapidando o património florístico da região;
- Fixando população numas áreas particularmente desfavorecida;
- Evitando a desertificação e despovoamento do mundo rural;

- Permitindo a criação / manutenção de postos de trabalho diretos e indiretos;
- Alargando o cabaz de ofertas gastronómicas tradicionais da região;
  - Rentabilizando as instalações produtivas assim como os equipamentos de recolha de leites e de distribuição de produtos acabados;
  - Promovendo a transmissão às gerações futuras da arte e do saber que envolve a produção dos Queijos, Requeijões e outros produtos lácteos da Beira Baixa;
  - Oferecendo aos consumidores um produto natural, isento de produtos químicos e de fácil digestão e consumo;
  - Evitando o esquecimento de gostos e sabores próprios dos produtos tradicionais, que ainda recheiam a mente dos mais velhos fazendo-os regressar á origem ou á infância com saudade, bem como dos mais novos quando se iniciam na sua experimentação. (Requeijão da Beira Baixa DOP-Caderno de Especificações)



**Figura 5** - Logotipo que acompanha os produtos com Denominação de Origem Protegida (DOP) pela União Europeia.

## 2.10. Parâmetros microbiológicos

Durante o processo de fabrico, os alimentos sofrem manipulação, transporte e contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos e embalagens) que podem estar contaminadas com microrganismos.

O elevado número de microrganismos que se pode transmitir aos alimentos pode ter graves consequências, quer em termos de saúde pública, quer em termos de deterioração dos alimentos. Desta forma, o controlo microbiológico dos alimentos assume um papel determinante na área alimentar, constituindo um dos melhores meios para testar numa unidade industrial, a eficácia das operações de lavagem, os processos de desinfeção e a higiene pessoal dos operários (Casal *et al.*, 2004) Os meios de cultura utilizados neste trabalho para contagem de microrganismos foram os meios seletivos. Os meios seletivos são formulados para suprimir o crescimento

dos microrganismos que não interessam, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar (Ferreira e Sousa, 2000).

### **Staphylococcus coagulase positiva**

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae*. O nome tem origem grega e significa cocos em cacho, morfologia característica destes microrganismos. Os *Staphylococcus* são bactérias Gram positivas, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. Agrupam-se normalmente em cacho, embora se possam observar de formas diversas, como cocos isolados, aos pares, em cadeias curtas ou em cachos. São anaeróbios facultativos. Produzem catalase e ácidos por degradação da glicose, em aerobiose e em anaerobiose. São capazes de crescer em meios com elevado teor de NaCl e a temperaturas compreendidas entre 18°C a 40°C (Prescott *et al.*, 2002). Das várias enzimas produzidas por *Staphylococcus*, uma assume particular importância, a coagulase.

A principal fonte de contaminação por *Staphylococcus* é a cavidade nasal, mas também pode ser encontrado na pele, mãos e feridas infetadas. Desta forma, o facto de um alimento ser manipulado na ausência de condições de assepsia, já indica uma possível contaminação pelo microrganismo. Os animais também podem ser fontes de *Staphylococcus*, pois algumas espécies como a bovina, ovina e caprina podem ser associadas a casos de mamites (inflamação da glândula mamária) (Sant'Ana *et al.*, 2005).

### **Escherichia coli**

Os Coliformes são um grupo de bactérias do qual fazem parte os géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Aeromonas* e *Serratia*. Todas as bactérias coliformes são Gram negativas, não formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, produzem gás a partir de lactose e são destruídas por pasteurização (Prescott *et al.*, 2002).

A *Escherichia coli* pertence à família das *Enterobacteriaceae*, constituída por bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos.

A presença de *Escherichia coli* é um problema importante de saúde pública. Nos seres humanos é a principal causa de infeções alimentares entre turistas e viajantes, sendo transmitida principalmente por alimentos, pessoa-a-pessoa e águas contaminadas (Chauret, 2011).

## **Microrganismos totais**

Entende-se por microrganismo, as bactérias, bolores e leveduras que se desenvolvem em meio de cultura, formando colónias. A determinação de Microrganismos totais a 30°C fornece informação genérica sobre a qualidade dos produtos (Merck, 2000)

### **Pseudomonas spp.**

As *Pseudomonas* são bactérias em forma de bastonete direito ou ligeiramente curvo, Gram negativas, aeróbias, não formadoras de esporos e com flagelos polares simples ou múltiplos (Prescott *et al.*, 2002). O grupo de *Pseudomonas* inclui as espécies pigmentadas e não pigmentadas. As espécies pigmentadas são chamadas de *Pseudomonas* fluorescentes, pois produzem um pigmento que é fluorescente sob radiação ultravioleta. Entre estas salienta-se a *Pseudomonas aeruginosa* que produz piocianina (um pigmento fluorescente azul) e cresce até 42°C (Ferreira e Sousa, 2000). As *Pseudomonas* também podem produzir um pigmento fluorescente verde chamando pioverdina, que funciona como um transportador de ferro celular.

Outras espécies muito comuns no solo e na água são a *Pseudomonas putida*, a *Pseudomonas fluorescens* e a *Pseudomonas syringa*. A espécie *Pseudomonas fluorescens* encontra-se envolvida na alteração da cor, sabor e aroma de alimentos refrigerados (leite, carne, ovos, marisco) porque cresce a 4°C. As *Pseudomonas* não fluorescentes incluem as espécies *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Ferreira e Sousa, 2000).

### **Salmonella spp.**

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram negativa, em forma de bacilos não esporulados, aeróbia ou anaeróbia facultativa e móvel com flagelos peritricos. Não fermenta a lactose e produz sulfureto de hidrogénio (Prescott *et al.*, 2002).

A *Salmonella* é a principal bactéria patogénica em seres humanos e a principal causa de gastroenterite aguda em vários países. A salmonelose é um problema mundial de saúde pública devido ao aumento do número de estirpes resistentes a antibióticos.

As principais espécies do género *Salmonella* são a *Salmonella typhi*, a *Salmonella enteritidis*, a *Salmonella choleraesuis* e a *Salmonella paratyphi A*. Na maioria dos casos, a salmonelose é adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados. As aves e os animais contaminados constituem o principal reservatório de *Salmonella* não *typhi*

e transmitem a doença ao Homem. O reservatório de *S. thypi* é o Homem, que é o principal disseminador da febre tifóide (Ferreira e Sousa, 2000).

### **Listeria monocytogenes**

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, móvel à temperatura ambiente e hemolítico (Prescott *et al.*, 2002).

O queijo é considerado um dos alimentos mais frequentemente contaminados com *Listeria monocytogenes* devido às condições favoráveis de crescimento do microrganismo durante a produção e maturação do queijo e devido à natureza psicrófila e halotolerante da *Listeria monocytogenes* (Guenther e Loessner, 2011).

## **2.11. Parâmetros Físico-químicos**

A análise físico-química das características do leite é um instrumento necessário para verificar se existem, no alimento, padrões mínimos de qualidade, garantir que o leite não foi adulterado e que não apresenta contaminantes. Um bom leite para queijaria deve proporcionar um elevado rendimento queijeiro, fator de rentabilidade económica, e, por isso, ser rico e equilibrado em componentes de interesse para o fabrico de queijo (Martins e Vasconcelos, 1999).

De acordo com Amiot (1991), a composição do leite varia em função de muitos fatores, incluindo espécie, raça, indivíduo, idade do animal, fase de lactação, alimentação, condições de ordenha, estação do ano, clima.

### **Humidade**

A humidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em humidade de superfície e humidade adsorvida. A humidade de superfície refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento e que é facilmente evaporada. A humidade absorvida refere-se à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem se combinar quimicamente com o mesmo. A percentagem de humidade é determinada através da perda de peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida (Zenebon *et. al.*, 2008).

## **Matéria gorda**

Os lípidos são compostos orgânicos altamente energéticos, insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos.

A técnica utilizada para a determinação da percentagem de matéria gorda foi a técnica de Van Gulik (NP 2105:1983). Esta técnica aplica-se a todos os tipos de queijo e consiste na separação e quantificação da matéria gorda com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido sulfúrico desnatura as proteínas que se encontram ligadas à matéria gorda e o álcool isoamílico favorece a separação da matéria gorda (NP 2105:1983).

## **Proteína total**

A determinação da proteína total baseia-se na determinação do azoto, pelo processo de digestão Kjeldahl. Este método baseia-se em três etapas: digestão, destilação e titulação. Na digestão, a matéria orgânica existente na amostra é decomposta com ácido sulfúrico e catalisadores (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e o azoto orgânico é transformado em azoto amoniacal.

Na destilação, a adição de hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio provoca a libertação de amoníaco, sendo este destilado e recebido num excesso de solução de ácido bórico como indicador. Finalmente, na titulação, determina-se a quantidade de azoto presente na amostra titulando-se o excesso do ácido utilizado na destilação com ácido sulfúrico. Como o conteúdo em azoto das diferentes proteínas é aproximadamente 15% introduz-se o fator de conversão 6,25 para transformar o número de gramas de azoto encontrado no número de gramas de proteína. Consoante o tipo de alimento o fator de conversão varia. No caso dos produtos lácteos o fator de conversão utilizado é 6,38 (Zenebon *et al.*, 2008).

## **Cinzas**

As cinzas ou o resíduo seco por incineração é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto após a queima da matéria orgânica, que é transformada em dióxido de carbono, água e óxido nítrico. A cinza é constituída principalmente por potássio, sódio, cálcio e magnésio. Em pequenas quantidades pode conter alumínio, ferro, cobre, manganês e zinco. A cinza obtida não é necessariamente da mesma composição que a matéria mineral presente no alimento, pois pode haver perda por volatilização ou interação entre os constituintes da amostra. Os produtos lácteos têm

uma alta concentração de cálcio e fósforo e baixa concentração de ferro e sódio (Cecchi, 2001).

## **pH**

O pH indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um produto. Na determinação do pH do requeijão utilizou-se um potenciômetro, o que permitiu uma determinação direta.

## **Perfil de ácidos gordos**

Ácido gordo designa qualquer ácido monocarboxílico alifático que possa libertar-se por hidrólise a partir de óleos ou gorduras naturais (Campos, 1999).

Os mais importantes e frequentes são os monocarboxílicos, de cadeia linear não ramificada, com número par de átomos de carbono (entre 4 e 30). Podem ser saturados, insaturados e, por vezes, hidroxilados (Campos, 1999).

Os ácidos gordos constituintes dos trigliceróis da gordura de leite de ruminantes podendo ser agrupados em: saturados de cadeia curta (C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>), saturados de cadeia média (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>), saturados de cadeia longa (C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub>) e insaturados de cadeia longa (C<sub>14:1</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> e C<sub>18:2</sub>).

Estes ácidos estão normalmente presentes em teores acima de 1% e constituem cerca de 95% do total de ácidos gordos. No caso específico do leite de ovelha, observam-se maiores teores de ácidos saturados de cadeia curta e média (C<sub>6</sub> a C<sub>12</sub>), comparativamente com o leite de vaca (Gomes, 2011).

**Ácidos gordos Saturados:** Obedecem à fórmula geral: GH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH. Os que se encontram mais frequentemente são o ácido palmítico (C<sub>16</sub>) e o ácido esteárico (C<sub>18</sub>). Em menor concentração, encontram-se os ácidos gordos contendo 12 e 14 átomos de carbono. O leite é, em contrapartida, rico em ácidos gordos de cadeia curta. A par dos ácidos gordos com número par de átomos de carbono, encontram-se, geralmente em pequenas quantidades, ácidos gordos com 15, 17 ou 19 átomos de carbono (Weil, 2000).

**Ácidos gordos Insaturados (Weil, 2000):** Os principais ácidos insaturados são:

- a) Ácidos gordos mono-insaturados (uma dupla ligação): ácido oleico (C<sub>18</sub>), dupla ligação entre C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub> abreviadamente (C<sub>18</sub>, Δ<sub>9</sub>, ou 18:1(9) ou 18ω<sub>9</sub>).

**Acido oleico:** CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-COOH

b) Ácidos gordos poli-insaturados (várias duplas ligações): Os mais comuns apresentam duplas ligações não conjugadas separadas por um grupo metileno. (C18,Δ9,12 ou:18:2(9,12) ou 18:2ω6)

Ácido linoleico : CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-COOH

### 3. Material e métodos

O presente trabalho decorreu na queijaria onde foi produzido requeijão em estudo e no Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar de Castelo Branco (CATAA), onde o requeijão foi embalado nas diferentes atmosferas e onde foram efetuadas as determinações microbiológicas e físico-químicas dos diferentes embalamentos.

Esta etapa decorreu entre o período de 24 de outubro a 11 de novembro de 2016. O esquema do delineamento experimental (Figuras 6,7,8,9,10) mostra os parâmetros analisados. As amostras foram conservadas ao longo do tempo á temperatura de 2°C pois é esta a temperatura de conservação na câmara de frio da queijaria.

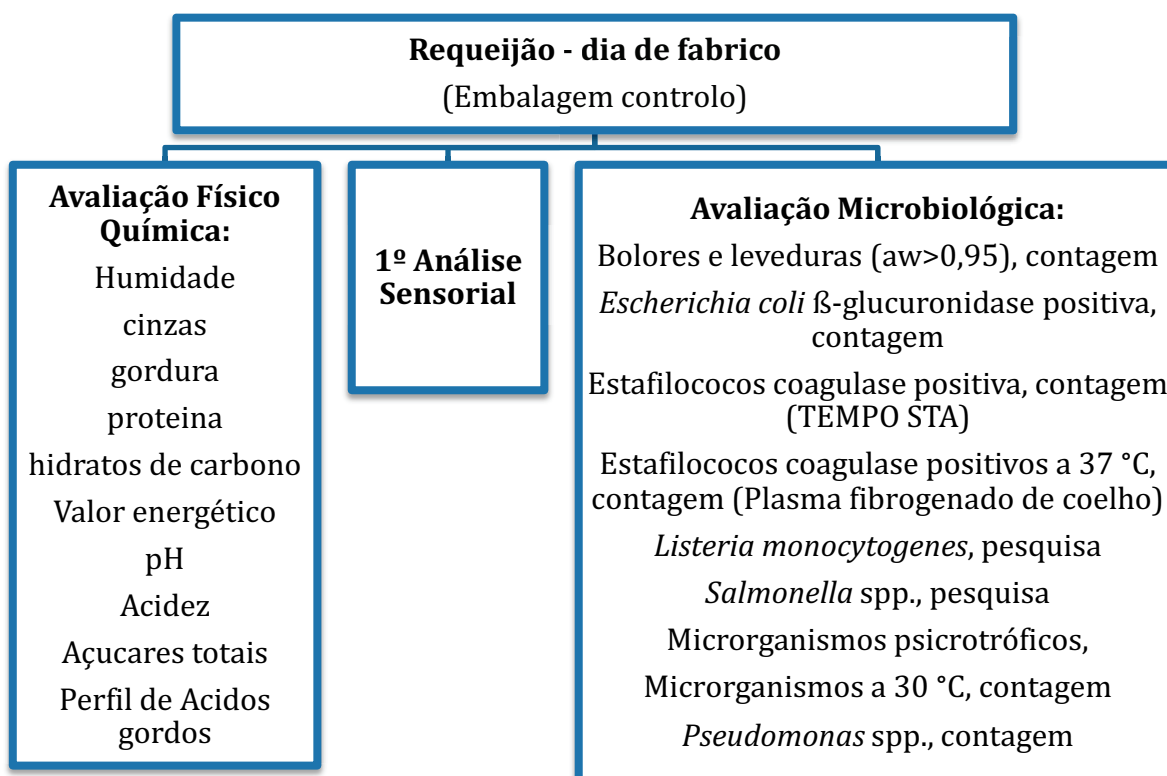
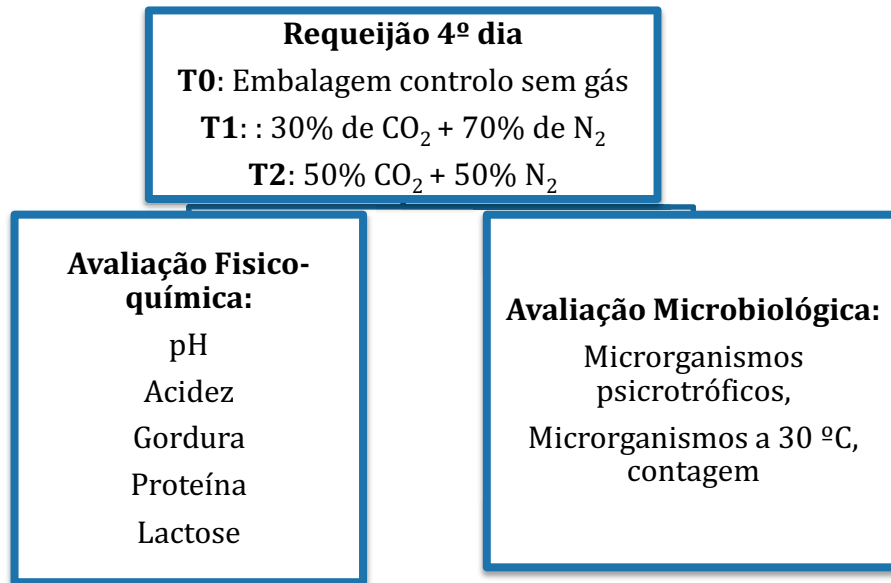
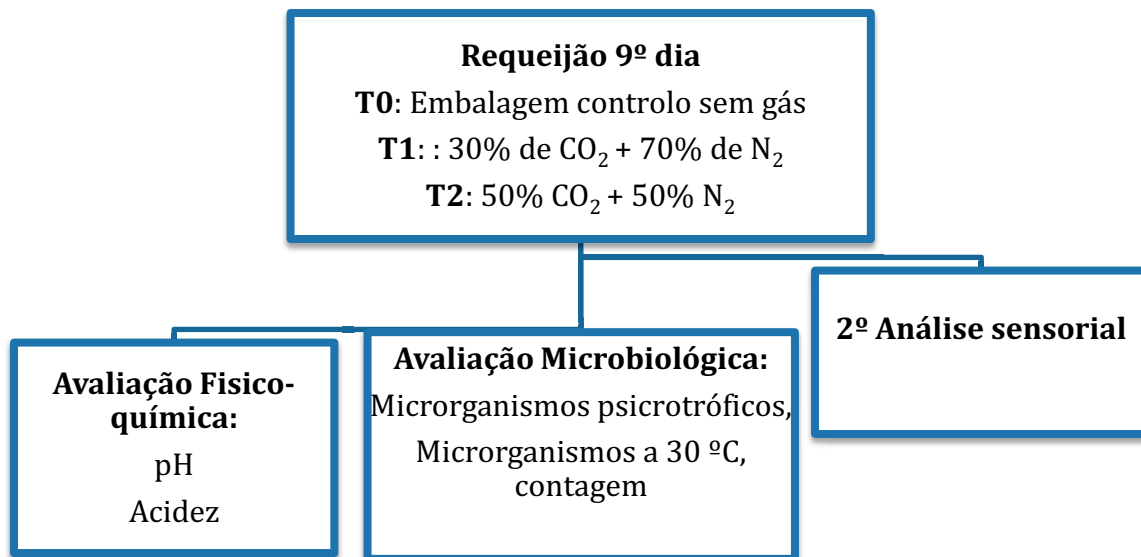


Figura 6 - Parâmetros analisados no dia de fabrico em embalagem controlo



**Figura 7** - Requeijão com 4 dias - Tratamento 0: Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30% CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)



**Figura 8** - Requeijão com 9 dias - tratamento 0: Embalagem controlo; tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)

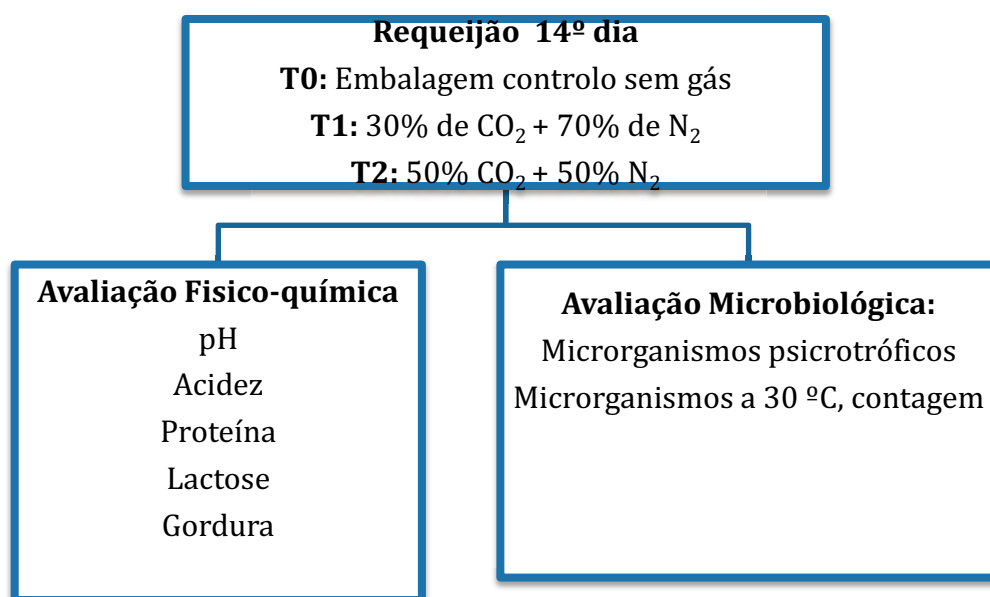


Figura 9 - Requeijão com 14 dias - Tratamento 0 : Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>) e tratamento 2: Embalagem ATM (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)

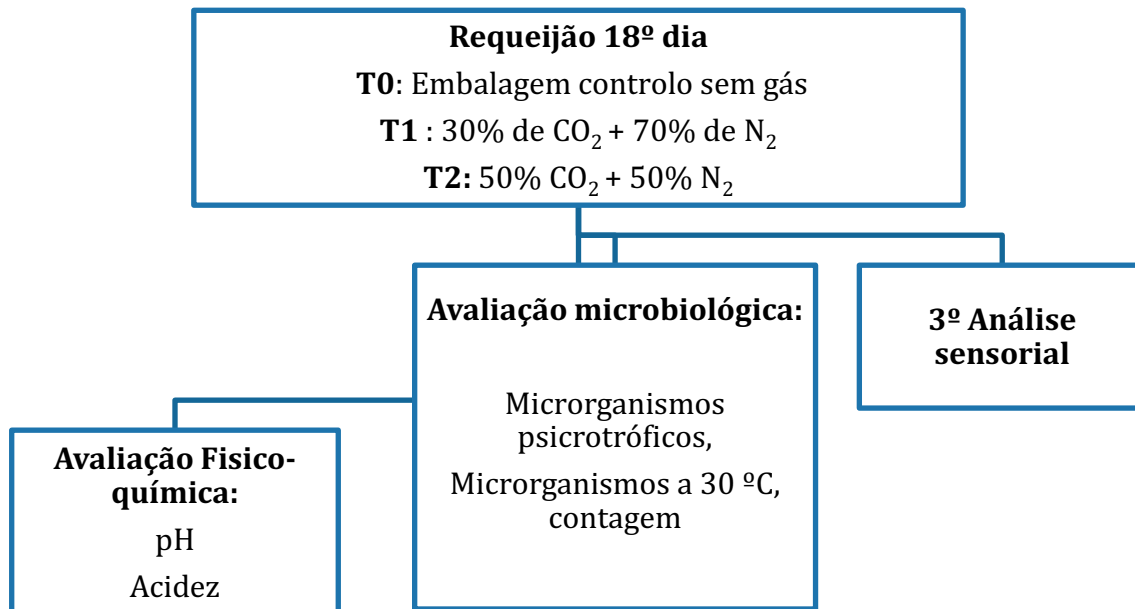


Figura 10 - Requeijão com 18 dias - Tratamento 0: Embalagem controlo; Tratamento 1: Embalagem ATM (30%CO<sub>2</sub> + 70%N<sub>2</sub>) e Tratamento 2: Embalagem ATM (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>)

### 3.1. Análise estatística

A estatística descritiva dos resultados obtidos foi feita com recurso ao programa excel®2007. Na tabela 11 relativamente ao teor de ácidos gordos foram apresentadas as médias ajustadas (least square means) os desvios padrões das médias e as comparações múltiplas entre médias foram efetuadas quando se detetaram efeitos significativos, utilizando a correção de Tukey para comparações múltiplas e foram declaradas significativamente diferentes para  $p < 0,05$ , utilizando o software SPSS versão 17. Nas tabelas relativas à análise sensorial foi apresentado o valor das médias e os desvios padrão.

### 3.2. Determinações microbiológicas

#### 3.2.1. Listeria monocytogenes

Pré-enriquecimento: adicionou-se assepticamente 25g de amostra e 225ml de FRASER ½ (Biomerieux) concentrado. Homogeneizou-se, no Stomacher e incubou-se a  $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 – 26h.

Enriquecimento: Após a incubação, agitou-se e transferiu-se 0,1 ml da suspensão em 10 ml de caldo FRASER e incubou-se a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 – 26h.

Realização do teste: Utilizou-se uma barrete e um cone para cada amostra, uma barrete e um cone para o controlo positivo e uma barrete e um cone para o ensaio em branco (controlo negativo). Pipetou-se, no primeiro poço: de: cada: barrete: 500: µl: de: amostra calibrador ou controlo consoante o caso. Colocaram-se os cones e as barretes no aparelho e iniciou-se a análise. Todas as etapas são geridas automaticamente pelo aparelho. Os resultados foram obtidos em aproximadamente 70 min.



**Figura 11** – Pesagem das amostras para o parâmetro *Listeria monocytogenes*

### **3.2.2. *Salmonella* spp.**

Pré-enriquecimento: adicionou-se assepticamente 25g de amostra e 225ml de água peptonada tamponada (APT) ou um volume de amostra para 9 volumes de caldo de pré-enriquecimento. Homogeneizou-se, no Stomacher e incubou-se a  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 16 – 20h.

Enriquecimento: Após a incubação, agitou-se e transferiu-se 0,1 ml da suspensão em 10 ml de caldo SX2 e incubou-se a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 22 – 26h.

Realização do teste: Utilizou-se uma barrete e um cone para cada amostra, uma barrete e um cone para o controlo positivo e uma barrete e um cone para o ensaio em branco (controlo negativo). Pipetou-se no primeiro poço de cada barrete, 500  $\mu\text{l}$  de amostra calibrador ou controlo consoante o caso. Sempre que a pesquisa de um dos microrganismos patogénicos anteriormente mencionados é positiva, tem que ser feita a sua confirmação pela técnica clássica.

Foi utilizado um teste imunoenzimático que permite a deteção de antígenos de *Salmonella* ou de *Listeria monocytogenes* (consoante os casos) pela técnica ELFA ( Enzyme Linked Fluorescent Assay ) com o aparelho mini-VIDAS.

### **3.2.3. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva**

Entende-se por *Staphylococcus* coagulase positiva as bactérias que formam colónias características na superfície de um meio de cultura selectivo e que apresentem uma reacção de coagulase fortemente positiva.

O meio de cultura utilizado foi o Baird-Parker RPF Agar (BPA), que é constituído por triptona, extrato de carne, extrato de levedura, piruvato de sódio, glicina, cloreto de lítio e ágar bacteriológico. A este meio é adicionado o suplemento RPF (fibrinogénio plasmático de coelho), cuja função é servir de substrato à coagulase presente nos *Staphylococcus* coagulase positiva. O suplemento RPF é constituído por plasma de coelho, fibrinogénio de bovino, inibidor da tripsina e telurito de potássio. O cloreto de lítio e o telurito de potássio inibem o crescimento da flora microbiana enquanto o piruvato e a glicina estimulam o crescimento de *Staphylococcus*. O plasma de coelho é adicionado devido à especificidade dos *Staphylococcus* produzirem coagulase.

O plasma de coelho é reforçado com fibrinogénio de bovino, o que provoca o aparecimento de halos de fibrina à volta das colónias. As colónias ficam de cor negra devido à redução do telurito de potássio para telureto. A presença de telurito também inibe o crescimento de outras bactérias Gram positivas. As colónias de *Staphylococcus coagulase positiva* são pretas ou cinzentas rodeadas por um halo opaco de fibrina.



**Figura 12** - Preparação das placas com o meio de cultura Baird-Parker RPF Agar (BPA)

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 0,1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

#### **3.2.4. Escherichia coli**

O meio utilizado foi o Compass Ecc Agar, que é um meio seletivo e cromogénico que permite simultaneamente a contagem de *Escherichia coli* e de Coliformes em produtos alimentares. Os Coliformes têm a capacidade de fermentar a lactose produzindo ácido láctico e dióxido de carbono. A fermentação da lactose envolve duas enzimas, uma permease e a  $\beta$ -galactosidase. A presença da  $\beta$ -galactosidase é usada como critério de classificação para Coliformes. Verificou-se também a presença de outra enzima, a  $\beta$ -D-glucuronidase em *Escherichia coli*. Assim, a presença da  $\beta$ -galactosidase permite a identificação de Coliformes e a presença da  $\beta$ -galactosidase e da  $\beta$ -D-glucuronidase permite a deteção específica de *Escherichia coli*.

A utilização de um substrato cromogénico permite a deteção da atividade da enzima através de uma reação colorida. Os Coliformes produzem colónias cor-de-rosa e a *Escherichia coli* produz colónias azuis que podem ser rodeadas por um halo cor-de-rosa.

Após feitas as diluições, transferiu-se por incorporação 1 mL de cada diluição e as placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

### **3.2.5. Contagem de Microrganismos totais**

Mediu-se 1 mL de amostra numa relação de 1/10 em solução de diluição, homogeneizou-se no Stomacher. O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA), constituído por triptona, extrato de levedura, glucose e ágar-ágar. Este meio não contém inibidores e é principalmente usado para determinar o número total de bactérias no leite, produtos lácteos, água e outros materiais.

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC)

Foram respeitados os requisitos constantes na norma ISO 7218:2007- Microbiologia de alimentos e alimentação animal – Requisitos e orientação para exames microbiológicos.

### **3.2.6. Contagem de *Pseudomonas spp.***

Mediu-se 1 mL de amostra numa relação de 1/10 em solução de diluição, homogeneizou-se no Stomacher. O meio de cultura utilizado foi o PP Agar (Agar, penicilina e piramicina) . Este meio é usado para o isolamento e contagem de *Pseudomonas* pigmentadas e não pigmentadas em alimentos.

Após feitas as diluições, transferiu-se assepticamente 1 mL de cada diluição para a superfície do meio. O inóculo foi espalhado com o auxílio de um espalhador esterilizado e as placas foram incubadas em estufa a 25°C durante 48 horas. Após a incubação, contaram-se as colónias características para se calcularem as unidades formadoras de colónias (UFC).

### **3.2.7. Microrganismos psicotróficos**

Mediu-se 1 mL de amostra em solução de diluição, homogeneizou-se no Stomacher e prepararam-se as diluições. Inoculou-se por incorporação 1 mL da amostra, da suspensão mãe em PCA (Ágar pepetona de caseína glucose extrato de

levedura) as placas foram incubadas a 6,5°C durante 10 dias. Na contagem de colónias foram consideradas as placas com menos de 300 colónias.

### **3.2.8. Bolores e Leveduras**

Mediu-se 1 mL de amostra em solução de diluição, homogeneizou-se no Stomacher e prepararam-se as diluições. Após as diluições inoculou-se por espalhamento 0,1 mL da amostra, da suspensão mãe no meio de cultura DRBC (Ágar dichloran rose bengal chloramphenicol) as placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias. A contagem das colónias foi feita nos 2 e 5 de incubação considerando as placas com menos de 150 colónias.

## **3.3. Determinações Físico-químicas**

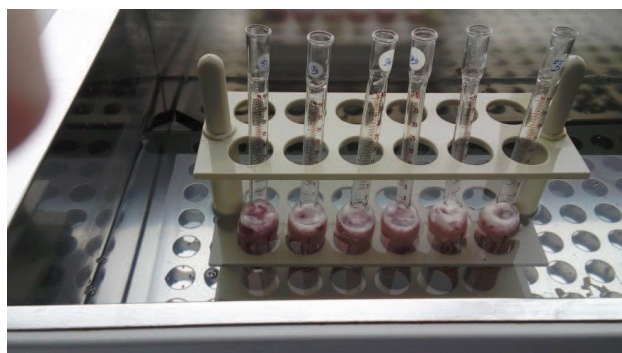
### **3.3.1. Determinação da humidade**

A humidade foi determinada de acordo com a norma EN ISO 5534:2004. Pesaram-se 20,0 g de areia do mar tratada para uma cápsula e esta foi seca em estufa a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 horas. A cápsula foi arrefecida em exsiccador, pesaram-se 3,0 g de requeijão e este foi envolvido com a areia, de forma a aumentar a porosidade da amostra e melhorar as condições de evaporação. A cápsula foi colocada na estufa a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Após arrefecimento em exsiccador foi novamente pesada. A humidade é expressa em percentagem e foi realizada em duplicado.

### **3.3.2. Determinação da matéria gorda**

A material gorda foi determinada de acordo com a NP 2105:1983 Pesou-se 3,0 g de requeijão para o butirómetro e adicionou-se cerca de 2/3 de ácido sulfúrico (65%), até tapar completamente a amostra. Introduziu-se a respetiva rolha e colocou-se o butirómetro em banho-maria a  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 horas, até dissolução total das proteínas. Retirou-se o butirómetro do banho e após cuidadosa agitação, adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico (98,5%), agitando novamente. Deitou-se de seguida ácido sulfúrico até que o nível atinja o traço da escala. Introduziu-se a rolha e inverteu-se várias vezes o butirómetro.

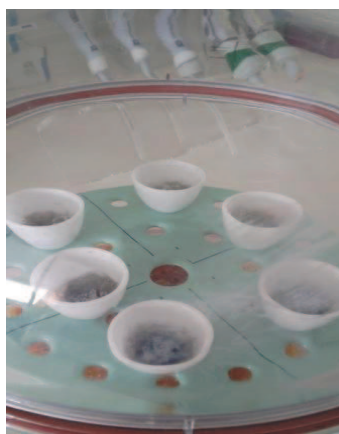
Centrifugou-se durante 10 minutos a  $350 \pm 50$  G. A leitura da matéria gorda é feita diretamente na escala graduada do butirómetro e é expressa em percentagem. A determinação da matéria gorda foi realizada em duplicado.



**Figura 13** - Butirômetros em banho-maria para determinação da matéria gorda

### 3.3.3. Determinação das cinzas

Para determinar as cinzas procedeu-se de acordo com o método oficial da AOAC nº935.42. As cápsulas de porcelana foram incineradas na mufla a 550°C durante 1 hora, arrefecidas em exsicador e pesadas. De seguida, pesou-se 5,0 g de requeijão e este foi incinerado na mufla a 550°C durante 24 horas. As cápsulas foram novamente arrefecidas em exsicador e pesadas.



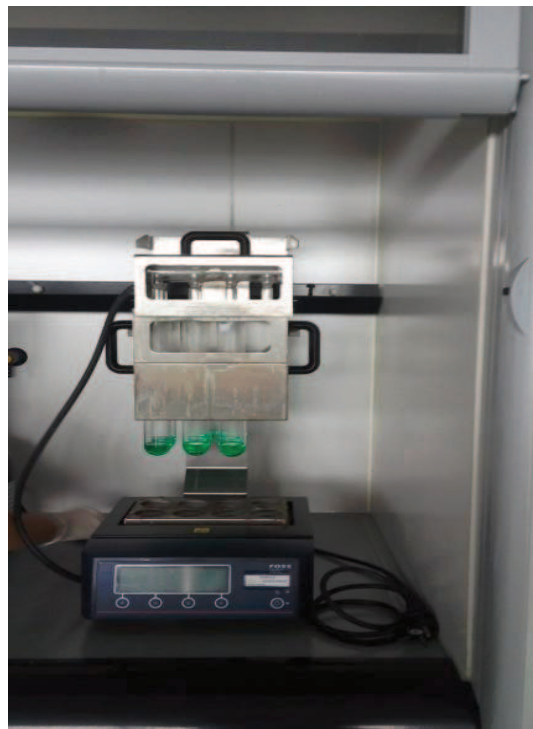
**Figura 14** - Capsulas de porcelana no exsicador, para determinação das cinzas

### 3.3.4. Determinação do pH

O método de determinação do pH consistiu em mergulhar os eléctrodos, previamente calibrados, na amostra e aguardar até que as leituras de pH estabilizassem. Os valores são lidos diretamente pelo potenciómetro.

### 3.3.5. Determinação da proteína

O teor de proteína do requeijão foi determinada de acordo com a norma AOAC 920.123 pelo método de kjeldahl que consiste na mineralização da amostra com ácido sulfúrico, em presença de um catalisador à base de cobre e selénio, para a digestão até que o carbono e o hidrogénio sejam oxidados. O azoto da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amónia. Segue-se a alcalinização dos produtos da reacção adicionando-se NaOH concentrado, destilação e titulação. O teor de proteína é determinado multiplicando o teor de azoto total pelo fator 6,38. O equipamento utilizado para esta determinação foi o Kjeltec 84



**Figura 15** - Determinação do teor de proteína pelo método kjeldahl

### 3.3.6. Determinação dos Hidratos de Carbono

A determinação dos hidratos de carbono do queijo é feita por dedução através da seguinte fórmula:

$$\text{HC (g/100g)} = 100 - \% \text{ Proteína} - \% \text{ Gordura} - \% \text{ Cinzas} - \% \text{ Perdas por secagem}$$

### 3.3.7. Perfil de Ácidos Gordos

O método para a determinação do perfil de ácidos gordos foi adaptado de Shingfield *et al.* (2006). Fez-se a determinação do teor de ácidos gordos por extração lipídica cujo solvente foi a mistura (1:1) de éter etílico e éter de petróleo, seguida de metilação básica com KOH metanol com concentração de 2M neutralizado com ácido acético e respetiva quantificação por cromatografia gasosa com injeção *Split* e detetor de ionização de chama (GC SSL-FID). A quantidade de amostra utilizada para a determinação do perfil de ácidos gordos foi de 100 mg de requeijão.



**Figura 16** - Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa

### 3.3.8. Acidez

Adiciona-se à amostra previamente preparada conforme 10 gotas de solução de fenolftaleína a 1 % e titular com a solução de hidróxido de sódio 0,1 M até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

### 3.3.9. Açúcares totais

A amostra é clarificada e os interferentes são removidos através de uma coluna SPE. Os açúcares ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) – glucose, frutose, sacarose, lactose e maltose – são quantificados por cromatografia líquida.



Figura 17 - Determinação dos açúcares totais através da coluna spe

### 3.10. Valor energético/ Hidratos de carbono

Obtidos segundo o Regulamento (UE) N.º 1169/2011 de 25 de Outubro.

Calculo:

Valor energético (kcal) = (4xProteína) + (4xHidratos de Carbono) + (9xGordura)

Valor energético (kJ) = (16xProteína) + (16xHidratos de Carbono) + (36xGordura)

## 4. Resultados e discussão

### 3.2. Estado do Requeijão em embalagem controlo (T0) nos dezoito dias.

#### 3.2.1. Parâmetros Físico-químicos

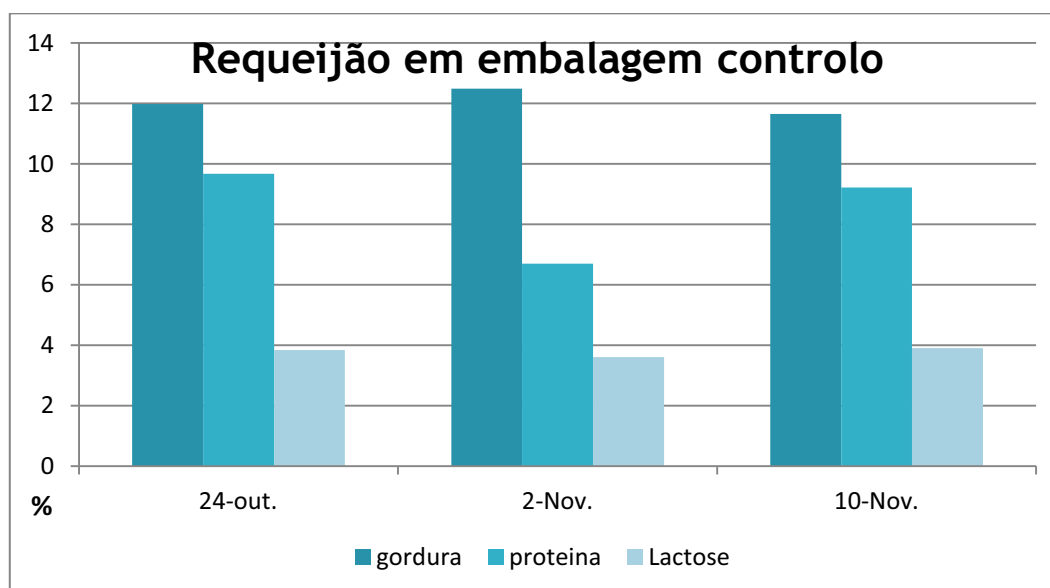
Os resultados dos parâmetros físico-químicos relativamente à embalagem controlo estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem controlo

Embalagem Controlo	24-Out.	28-Out.	2-Nov.	7-Nov.	10-Nov.	11-Nov.
Humidade (g/100g)	72.62	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cinza (g/100g)	1.09	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Gordura (g/100g)	11.97	n.d	12.48	n.d	11.65	n.d
Proteína (g/100g)	9.67	n.d	6.69	n.d	9.21	n.d
Lactose (g/100g)	3.84	n.d	3.6	n.d	3.9	n.d
Hidratos de carbono (g/100g)	4.63	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Valor energético (kJ)	686.23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Valor energético (kcal)	164.99	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
pH	6.38	6.44	6.50	6.50	6.50	6.51
Acidez (% Ácido Láctico)	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09
Glucose (g/100g)	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Frutose (g/100g)	0.033	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sacarose (g/100g)	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Maltose (g/100g)	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Açúcares Totais (g/100g)	3.87	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Segundo o despacho nº 4184/2011, o requeijão da Beira Baixa DO deve apresentar 60-70% de humidade. Este requeijão não está dentro dos valores definidos pois obtivemos um valor de 72,62 % de humidade, o que indica que grande parte da constituição do requeijão é água. Segundo Pintado e Malcata (1999) a percentagem de água do requeijão é relativamente variável, dependendo da permeabilidade do molde onde é colocado, do período de drenagem e das condições de armazenamento. (Vodret, 1970) também relatou que as diferenças na percentagem de humidade do requeijão podem estar relacionadas com a temperatura de precipitação das proteínas.

O requeijão da Beira Baixa DO deve ter um teor de cinzas entre 1,4-1,8g/100g de produto, este requeijão não se encontra dentro dos limites uma vez que possui 1,09g/100.



**Figura 18** - Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo na embalagem controlo.

Segundo o despacho nº 4184/2011, o Requeijão da Beira Baixa DO deve apresentar um teor de matéria gorda de 14g 19g/100g de produto. Este requeijão nestas condições não cumpre os valores definidos. No dia do embalamento obtivemos uma gordura de 11,97g subindo para 12,48g 10 dias depois voltando a descer 18 dias depois para 11,65g. Pintado *et al.* (1996) obtiveram uma percentagem de matéria gorda que variou de 17, 8 g a 18,5g em requeijões sem adição de leite, como este, produzidos a 90°C durante 45 minutos, referindo que temperatura e o tempo de aquecimento influenciam a % de matéria gorda do requeijão. Os valores neste estudo são claramente inferiores aos obtidos por Pintado *et al.* (1996) devido ao processo de fabrico dos queijos da Beira Baixa, em que a maior parte da matéria gorda do leite fica retida nos queijos.

Quanto à proteína o despacho refere que o teor de proteína total deve ser de 10g a 13g / 100g de produto. Podemos observar que apesar de próximo o requeijão em estudo não atinge os limites definidos uma vez que o valor mais alto observado é de 9,67g. Pintado *et al.* (1996) obtiveram valores entre 7,4g a 8,2g em requeijões sem adição de leite, produzidos a 90°C durante 45 minutos, referindo que a temperatura de aquecimento afeta especialmente a percentagem de proteína total do requeijão. Neste requeijão há uma maior retenção de proteína no requeijão mas não podemos corroborar com a conclusão retirada uma vez que neste requeijão a temperatura de aquecimento é de 95°C.

O despacho não refere limites em relação lactose, podemos constatar que aumentou ao longo do armazenamento. Passando de 3,84g para 3,9g, dezoito dias depois.

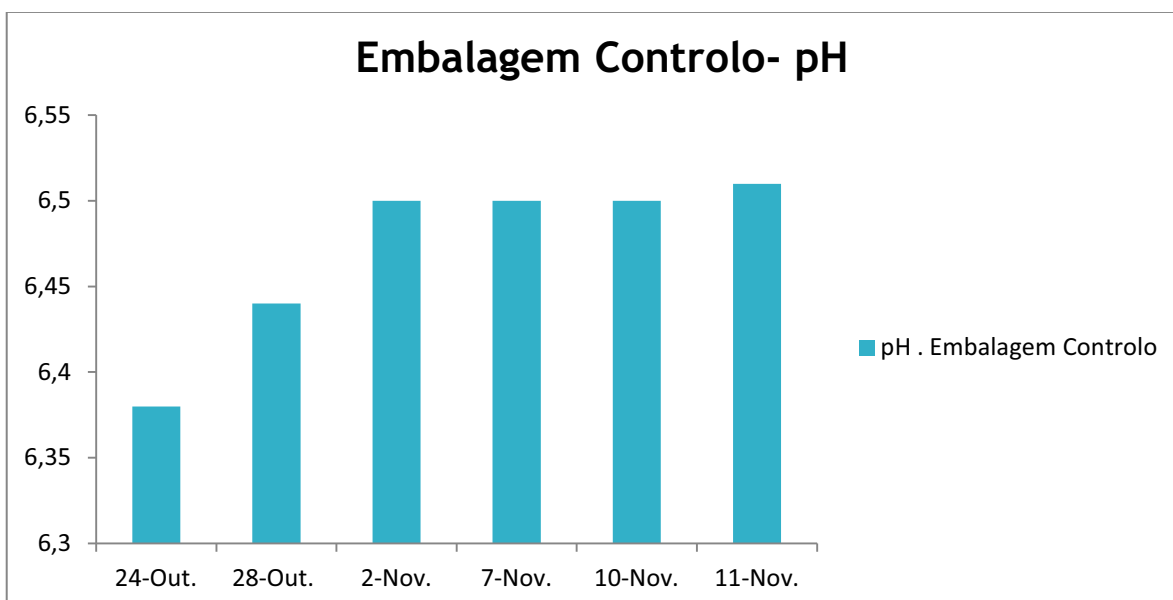
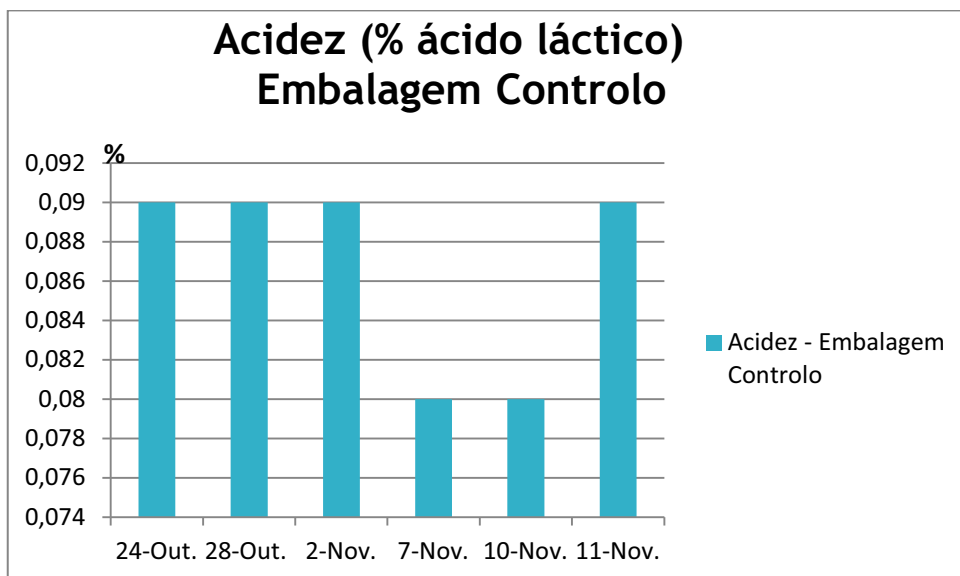


Figura 19 - Variação do valor de pH ao longo do tempo na embalagem controlo.

Podemos verificar que ao longo do tempo de armazenamento o pH aumenta ligeiramente de 6,38 no dia 0 para 6,51 que corresponde ao 18º dia. Pintado e Malcata (2000) referem que no 15º dia o requeijão controlo sofreu uma descida acentuada de pH (4,78) uma justificação possível será o facto de no estudo citado ter sido adicionado 10% de leite de cabra ao soro antes do seu aquecimento.



**Figura 20** - Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo na embalagem controlo.

Relativamente à acidez ao longo do tempo não subiu mantendo-se no valor de 0,09%, ocorrendo uma descida de 0,1 % ao 15 dia de armazenamento até ao 17º.

Pintado e Malcata (2000) na embalagem controlo obtiveram valores de acidez superiores alcançando os 0,49.

### 3.2.2. Parâmetros Microbiológicos:

Os resultados dos parâmetros microbiológicos relativamente à embalagem controlo estão representados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados dos parâmetros microbiológicos relativos à embalagem controlo

<b>Embalagem Controlo</b>	<b>24-Out.</b>	<b>28-Out.</b>	<b>2-Nov.</b>	<b>7-Nov.</b>	<b>10-Nov.</b>
<b>Bolores e leveduras (aw&gt;0,95), contagem</b>	<10 ufc/g	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Escherichia coli</i> β-glucuronidase positiva, contagem	<10 ufc/g	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Estafilococos coagulase positiva</i> , contagem (TEMPO STA)	<10 ufc/g	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Estafilococos coagulase positivos</i> a 37 °C, contagem (Plasma fibrogenado de coelho)	<10 ufc/g	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Listeria monocytogenes</i> , pesquisa	Ausência em 25g	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Salmonella spp.</i> , pesquisa	Ausência em 25g	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Microrganismos psicrótrópicos, contagem</b>	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g
<b>Microrganismos a 30 °C, contagem</b>	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<4,0 x 10 <sup>6</sup> ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g
<i>Pseudomonas spp.</i> , contagem	<10 <sup>2</sup> ufc/g	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: não determinado

Não existe um limite definido pela legislação relativamente a bolores e leveduras. Observou-se no entanto um número inferior a 10 ufc/g o que indica qualidade da matéria-prima e cumprimento do plano de higienização durante o fabrico.

Segundo o regulamento (CE) Nº 1441/2007 o nº de colónias de *Escherichia coli* deve ser inferior a 100 ufc/g sendo o máximo permitido 1000 ufc/g. Verificou-se um número de *Escherichia coli* inferior a 10 ufc/g. Estes resultados estão de acordo com os referidos por Pintado, *et al.*, (2001) que não obtiveram contagem de *Escherichia*

*coli* no dia do fabrico. A *Escherichia coli* pode derivar de contaminação de utensílios ou manipulação do requeijão.

O regulamento refere que o número de colónias de *Staphylococcus coagulase* positivas deve ser inferior a 100 ufc/g sendo o máximo permitido de 1000 ufc/g. Verificou-se um numero inferior a 10 ufc/g , Pintado, *et al.*,(2001) obtiveram o mesmo resultado.

Segundo o regulamento (CE) N° 1441/ 2007 a pesquisa de *Salmonella spp.* E de *Listeria monocytogenes* deve ser ausente em 25,0 g de amostra. A pesquisa de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* foi negativa neste requeijão. Estes resultados estão de acordo com os referidos por Angelidis *et al.* (2012) que obtiveram sempre resultados negativos para *Listeria monocytogenes* em todos os requeijões analisados.

Para a contagem de *Pseudomonas spp.* também não existe um limite definido pela legislação. Verificou-se um numero inferior a  $10^2$  ufc/g, estes resultados estão de acordo com os referidos por Pintado, *et al.*, (2001) que também não obtiveram contagem de *Pseudomonas spp.* no dia do fabrico do requeijão. As *Pseudomonas spp.* Podem contaminar os produtos durante o processo de fabrico, pois conseguem formar biofilmes em superfícies de ácido inoxidável. A resistência das *Pseudomonas spp.* aos desinfetantes usados na industria alimentar agrava o problema da presença de biofilmes em superfícies em contacto direto com os produtos alimentares (Chmielewski e Frank, 2003).

Para a contagem de microrganismos totais não existe um limite definido pela legislação. Neste requeijão verificou-se um numero de microrganismos totais inferior a 10 ufc/g . O número de ufc/g depende da qualidade microbiológica da matéria-prima, e da higiene aquando da manipulação deste.

### 3.3. Estado do requeijão em atmosfera modificada (30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub>) nos dezoito dias.

#### 3.3.1. Parâmetros Físico-químicos:

Os resultados dos parâmetros físico-químicos relativamente a embalagem atmosfera modificada (30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub>) estão representados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem com atmosfera modificada (30%CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>)

Embalagem atmosfera modificada (30% CO <sub>2</sub> + 70% N <sub>2</sub> )	28-Out.	2-Nov.	7-Nov.	10-Nov.	11-Nov.
Humidade (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cinza (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Gordura (g/100g)	n.d	12.97	n.d	12.23	n.d
Proteína (g/100g)	n.d	9.06	n.d	8.43	n.d
Lactose (g/100g)	n.d	3.8	n.d	3.9	n.d
Hidratos de carbono (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Valor energético (kJ)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Valor energético (kcal)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
pH	6.30	6.42	6.34	6.31	6.41
Acidez (% Ácido Láctico)	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08
Glucose (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Frutose (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sacarose (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Maltose (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Açúcares Totais (g/100g)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: não determinado

Como podemos observar na figura 20, relativamente aos parâmetros gordura, proteína e lactose houve uma estabilidade ao longo do tempo destes compostos o que evidência que a atmosfera modificada constituída por 30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub> não altera o valor nutricional do requeijão ao longo do tempo.

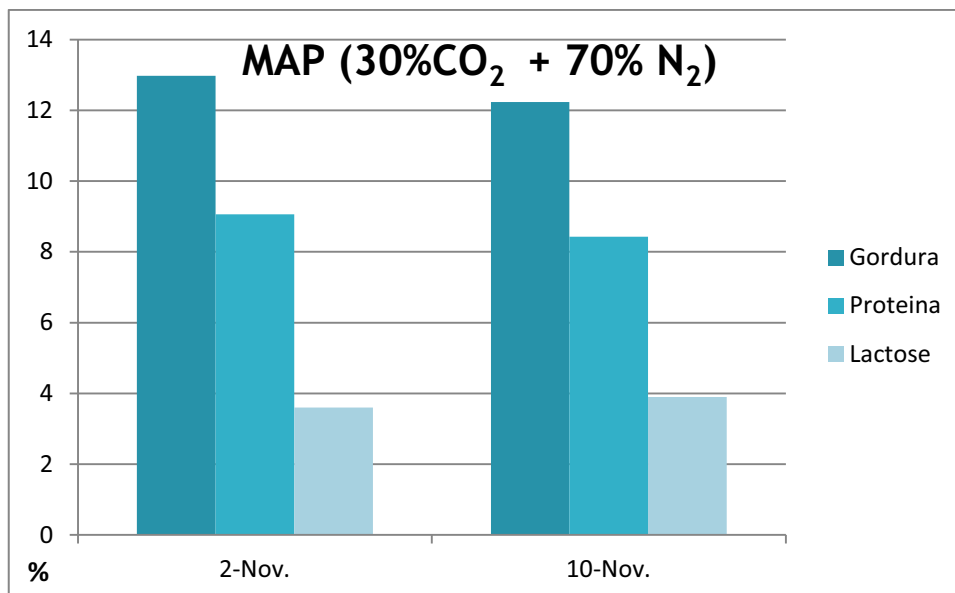


Figura 21- Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo na embalagem com atmosfera modificada (30%CO<sub>2</sub> + 70%N<sub>2</sub>)

Na figura 22, podemos observar a evolução do pH ao longo do tempo na embalagem com atmosfera modificada (30%CO<sub>2</sub> + 70%N<sub>2</sub>)

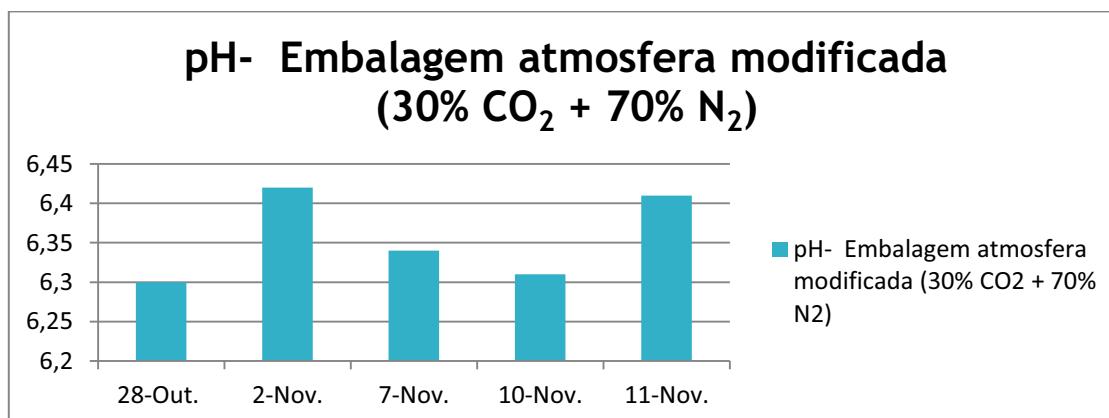
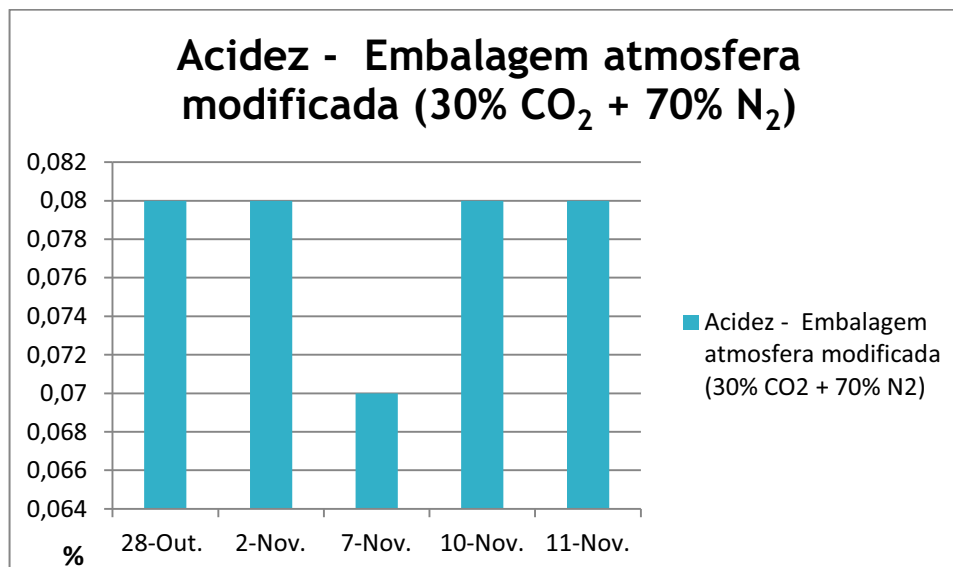


Figura 22- Variação do valor de pH ao longo do tempo na embalagem com atmosfera modificada (30%CO<sub>2</sub> + 70%N<sub>2</sub>)

Ao longo do tempo o pH manteve-se constante. Outros autores observaram um decréscimo do pH (Faber,1991; Fandos *et al.* 2000, Pintado & Malcata 2000 e Olarte *et al.* 2002) isto pode dever-se ao facto de que a este requeijão não é adicionado leite e também porque é aquecido até ao 95°C o que não acontece nos restantes estudos.

Na figura 22, podemos verificar os valores de acidez ao longo do tempo na embalagem MAP (30%CO<sub>2</sub> + 70%N<sub>2</sub>).



**Figura 23** - Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (30%CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>)

Relativamente a acidez ao longo do tempo, não subiu e foi inferior aos valores atingidos na embalagem controlo, mantendo-se nos 0,08 % enquanto na embalagem controlo chegou aos 0,09%.

Pintado e Malcata (2000) e Maniar *et al.*, na embalagem controlo verificaram valores de acidez superiores alcançando os 0,49% e 0,52% respetivamente.

### 3.3.2. Parâmetros Microbiológicos:

**Tabela 8** - Resultados dos parâmetros microbiológicos relativos á embalagem com atmosfera modificada (30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub>)

Embalagem atmosfera modificada (30% CO <sub>2</sub> + 70% N <sub>2</sub> )	28-Out	2-Nov.	7-Nov.	10-Nov.
Microrganismos psicrótróficos, contagem	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g
Microrganismos a 30 °C, contagem	<4,0 x 10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g

Neste tipo de acondicionamento não houve crescimento significativo de colônias de microrganismos, houve até no 15º dia um número de microrganismos a 30°C inferior o que comprova que esta combinação de gases tem efeitos favoráveis no aumento da vida útil do requeijão.

O N<sub>2</sub> é usado como um gás de enchimento, substituindo o O<sub>2</sub> como uma alternativa da embalagem a vácuo, visto que, por ser pouco solúvel em água e gordura, é utilizado para limitar o colapso da embalagem causado pela absorção do CO<sub>2</sub> pelo produto. Além disso, retarda a rancificação oxidativa e inibe o crescimento de micro-organismos aeróbios (Church, 1995; Blakinstone, 1999).

### 3.4. Estado do requeijão em atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>) nos dezoito dias.

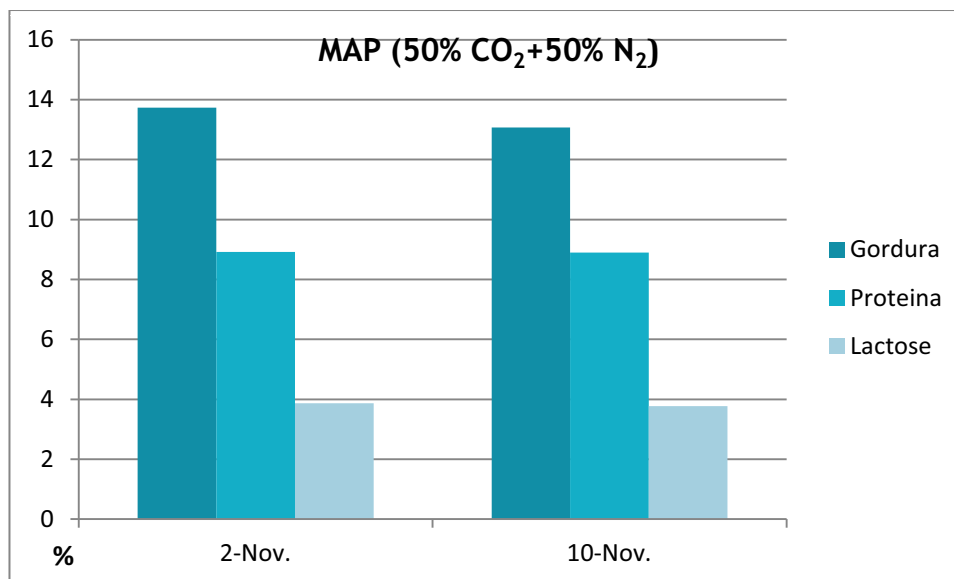
#### 3.4.1. Parâmetros Físico-químicos

Os resultados dos parâmetros físico-químicos relativamente a embalagem atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>) estão representados na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados dos parâmetros físico-químicos relativos à embalagem com atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>)

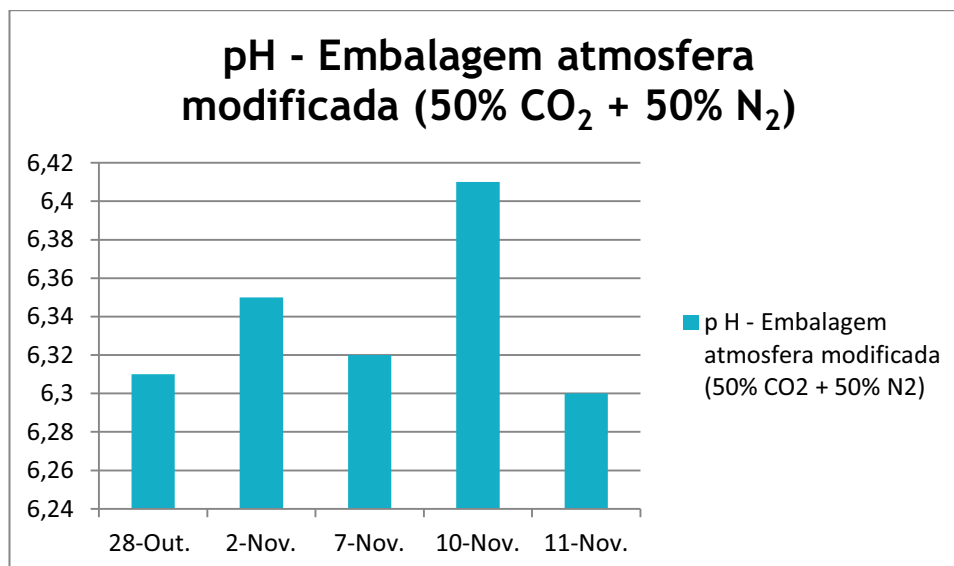
<b>Embalagem atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>)</b>	<b>28-Out.</b>	<b>2-Nov.</b>	<b>7-Nov.</b>	<b>10-Nov.</b>	<b>11-Nov.</b>
<b>Humidade (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Cinza (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Gordura (g/100g)</b>	n.d	<b>13.73</b>	n.d	<b>13.07</b>	n.d
<b>Proteína (g/100g)</b>	n.d	<b>8.92</b>	n.d	<b>8.90</b>	n.d
<b>Lactose (g/100g)</b>	n.d	<b>3.87</b>	n.d	<b>3.77</b>	n.d
<b>Hidratos de carbono (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Valor energético (kJ)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Valor energético (kcal)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>pH</b>	<b>6.31</b>	<b>6.35</b>	<b>6.32</b>	<b>6.41</b>	<b>6.30</b>
<b>Acidez (% Ácido Láctico)</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.09</b>
<b>Glucose (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Frutose (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Sacarose (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Maltose (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Açúcares Totais (g/100g)</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Neste tipo de atmosfera modificada inferimos que os constituintes gordura, proteína e lactose mantiveram os seus valores não havendo uma alteração relevante ao longo do tempo de armazenamento, tal como podemos observar em todos os outros acondicionamentos estudados.



**Figura 24** - Variação da percentagem de gordura, proteína e lactose ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>).

Na figura 23, podemos observar os valores de pH ao longo do tempo de armazenamento na embalagem MAP (50% CO<sub>2</sub>+ 50% N<sub>2</sub>)



**Figura 25** - Variação do valor de pH ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)

Ao longo do tempo o pH manteve-se constante, embora ligeiramente mais baixo do que nos acondicionamentos atrás referidos. Outros autores observaram um decréscimo do pH chegando aos 4.15/4.47/4.66 (Faber,1991; Fandos *et al.* 2000,

Pintado & Malcata 2000 e Olarte *et al.* 2002) isto pode dever-se ao facto de que a este requeijão não é adicionado leite e também porque é aquecido até ao 95°C o que não acontece nos restantes estudos.

Na figura 26 podemos verificar os valores de acidez ao longo do tempo na embalagem MAP (50%CO<sub>2</sub> + 50%N<sub>2</sub>).

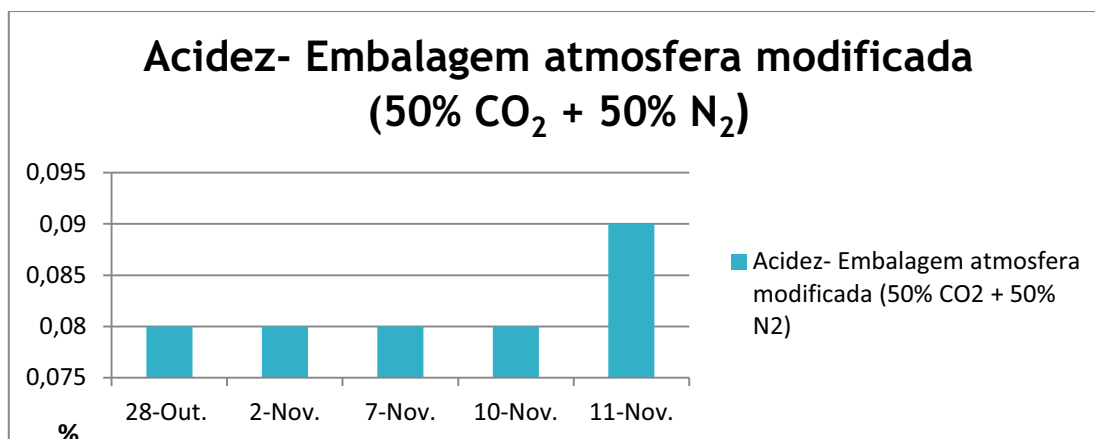


Figura 26 - Variação do parâmetro acidez ao longo do tempo em embalagem com atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)

Relativamente a acidez ao longo do tempo subiu mantendo-se até ao valor de 0,09 % no 18º dia, Pintado e Malcata (2000) na embalagem controlo obtiveram valores de acidez superiores alcançando os 0,49%.

### 3.4.2. Parâmetros Microbiológicos:

Os resultados dos parâmetros microbiológicos relativamente a embalagem atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>) estão representados na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados dos parâmetros microbiológicos referentes à embalagem com atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub>)

Embalagem atmosfera modificada (50% CO <sub>2</sub> + 50% N <sub>2</sub> )	28-Out	2-Nov.	7-Nov.	10-Nov.
Microrganismos psicrótróficos, contagem	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g	<10 ufc/g
Microrganismos a 30 °C, contagem	<4,0 x 10 ufc/g	<4,0 x 10 ufc/g	<4,0 x 10 ufc/g	<4,0 x 10 ufc/g

Este tratamento revelou ser o mais interessante uma vez que o número de microrganismos a 30°C foi inferior a 4 ufc/g e não aumentou ao longo do tempo, o que demonstra que o CO<sub>2</sub> é considerado como o principal elemento das embalagens com atmosfera modificada, pelos seus efeitos bacteriostático e fungicida, Mantilla *et al.*,(2010) referem que o efeito bacteriostático da embalagem em atmosfera

modificada deve-se à ação do CO<sub>2</sub>, que aumenta a fase de adaptação e diminui a taxa de crescimento microbiano.

### 3.5. Teor de Ácidos gordos

Passando à análise do teor de ácidos gordos, na tabela 11 estão representados os ácidos gordos detetados nos diferentes embalamentos.

Tabela 11 - Resultados dos três embalamentos relativamente ao parâmetro Teor de ácidos gordos

Tipo de ácido	Embalagem Controlo	Embalagem ATM (30%CO <sub>2</sub> + 70%N <sub>2</sub> )	Embalagem ATM (50%CO <sub>2</sub> +50%N <sub>2</sub> )
Ácido Butanóico C <sub>4:0</sub>	0,56±0,15 <sup>a</sup>	0,35±0,07 <sup>a</sup>	0,35±0,07 <sup>a</sup>
Ácido Caprónico C <sub>6:0</sub>	0,7±0,2 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
Ácido Caprílico C <sub>8:0</sub>	1,16±0,05 <sup>b</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,75±0,07 <sup>a</sup>
Ácido Cáprico C <sub>10:0</sub>	4,60±0,17 <sup>b</sup>	3,65±,07 <sup>a</sup>	3,75±0,35 <sup>a</sup>
Ácido Láurico C <sub>12:0</sub>	3,16±0,05 <sup>a</sup>	2,95±0,07 <sup>a</sup>	2,95±0,2 <sup>a</sup>
Ácido Mirístico C <sub>14:0</sub>	9,43±0,05 <sup>a</sup>	9,55±0,07 <sup>a</sup>	9,5±0,28 <sup>a</sup>
Ácido Pentadecílico C <sub>15:0</sub>	0,9 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>
Ácido Palmítico C <sub>16:0</sub>	27,6 ±0,15 <sup>a</sup>	27,95± 0,21 <sup>b</sup>	27,70± 0,14 <sup>b</sup>
Ácido Margárico C <sub>17:0</sub>	0,9 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>
Ácido Esteárico C <sub>18:0</sub>	0,30 <sup>a</sup>	0,35± 0,07 <sup>a</sup>	0,35± 0,07 <sup>a</sup>
Ácido Oleico C <sub>18:1</sub>	13,13± 0,15 <sup>a</sup>	13,35± 0,07 <sup>a</sup>	13,45 ±0,07 <sup>a</sup>
Ácido Linoleico C <sub>18:2</sub>	26,43± 0,24 <sup>a</sup>	26,85± 0,35 <sup>a</sup>	26,95± 0,35 <sup>a</sup>
Ácido Linolenelaídico C <sub>18:2</sub>	2,6 ±0,05 <sup>a</sup>	2,7± 0,14 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>
Ácido Estearidónico C <sub>18:4</sub>	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>
Ácido Gadoleico C <sub>20:1</sub>	0,5 <sup>a</sup>	0,45± 0,07 <sup>a</sup>	0,45± 0,07 <sup>a</sup>
Ácido Eicosadienónico C <sub>20:2</sub>	0,06± 0,05 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Ácido Eicosatrienónico C <sub>20:3</sub>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
Ácido Araquidónico C <sub>20:4</sub>	0,2 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>
Ácido docosadienónico C <sub>22:2</sub>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
Ácido docosapentaenónico C <sub>22:5</sub>	0,2 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>
Ácido docosa-hexaenónico	0,2 <sup>a</sup>	0,15± 0,07 <sup>a</sup>	0,15± 0,07 <sup>a</sup>
Ácido nervónico C <sub>24:1</sub>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>

(a,b) Média dos valores que na mesma linha apresentam letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância

Estabelecendo a comparação do perfil de ácidos gordos dos três tipos de embalagem verifica-se que existem diferenças significativas relativas ao ácido palmítico, cáprico e pentadecílico. O ácido palmítico encontra-se em maior quantidade em embalagem com atmosfera modificada 30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub> com uma percentagem de 27,95% do que na atmosfera controlo que possui 27,6%. O ácido cáprico possui maior percentagem na embalagem controlo com 4,60% enquanto nas embalagens com atmosfera o valor ronda os 3,70%.

Já o ácido pentadecílico possui maior percentagem nas embalagens com atmosfera modificada com os valores de 1,0 e na embalagem controlo com percentagem de 0,9%.

Os ácidos gordos presentes em maior quantidade são o ácido palmítico com uma percentagem de aproximadamente 28% e o ácido linoleico com uma percentagem de aproximadamente 27%. Os resultados obtidos por Malcata *et al.* (2000) corroboram estes resultados

## 4. Análise Sensorial

A prova de consumidores foi realizada com o objetivo de perceber se a nível sensorial havia alteração ao longo do tempo nos diferentes tipos de acondicionamento. As provas acima mencionadas foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da CATAA, em ambiente controlado com dez indivíduos. Para a realização da prova de consumidores foram efetuados alguns procedimentos preliminares como: seleção de consumidores, verificação dos critérios de qualidade da amostra e preparação da mesma bem como a preparação da sala de prova.

Para a realização da prova as amostras foram mantidas a uma temperatura de 3-4 °C, sendo que cerca de 30 minutos antes do seu início pesaram-se 20g de requeijão de cada amostra e foram colocados em pratos conservando a temperatura até serem servidos aos consumidores.

A sala de prova é composta por 10 cabines e antes do começo da prova colocou-se, em cada cabine, um copo com água e um guardanapo, uma esferográfica e a ficha de prova). Quando o provador terminava a prova ligava a luz verde e a amostra e a ficha de prova correspondente a cada amostra era recolhida.

Na primeira fase os provadores avaliaram apenas a amostra controlo. Na segunda fase (9 dias depois) os provadores avaliaram as 3 amostras T0: Controlo, T1: 30% de CO<sub>2</sub> + 70% de N<sub>2</sub>, T2: 50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub> e avaliaram novamente 9 dias depois ou seja aos 18 dias. Os consumidores avaliaram vários atributos, nomeadamente, o aspeto, a cor, a textura o sabor e a apreciação global, numa escala hedónica de 1 a 9 pontos em que 1 significava extremamente desagradável e 9 extremamente agradável (Anexo 1) A terminologia descritiva desenvolvida para a ficha da análise descritiva quantitativa

envolveu os descritores/atributos sensoriais utilizados também por Noronha *et al.*,(2005).

No atributo textura a escala era 1 mole e 9 dura. Nessa mesma ficha de prova os consumidores responderam a 3 questões abertas sobre a cor, o aroma e o sabor que identificavam. Antes da realização da prova, os requeijões foram submetidos à pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* pelo método automatizado mini VIDAS, atendendo aos critérios de segurança previstos no Regulamento (CE) N° 2073/2005 de 15 de novembro alterado pelo Regulamento (CE) N° 1441/2007 de 5 de dezembro em alguns pontos.

Relativamente aos atributos cheiro e sabor estes dependem basicamente das características das matérias-primas utilizadas na sua formulação, e na forma como interagem entre si no produto. As alterações no sabor e cheiro podem alertar o consumidor para um pior estado de salubridade de um determinado alimento.

A textura é um atributo com bastante importância nos alimentos sólidos, uma vez que traduz várias propriedades mecânicas, geométricas e de superfície que resultam da interação molecular entre os diferentes constituintes do alimento e que são percecionáveis principalmente pelo tato, mas também pela visão e pela audição.

A cor é um aspeto muito importante uma vez que pode influenciar a perceção do consumidor na aceitação do queijo (Valente, 2012).

Nas tabelas seguintes estão representadas as médias da pontuação atribuída, na prova de consumidores, aos diferentes atributos avaliados nos diferentes acondicionamentos ao longo do tempo.

### **Embalagem controlo:**

Nas tabelas 12, 13 e 14, estão representadas as médias da pontuação, na prova de consumidores. Considerando a escala hedónica sendo 1- extremamente desagradável e 9 extremamente agradável. Obtivemos os seguintes resultados:

**Tabela 12** - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor no dia 0 em embalagem controlo

<b>Controlo- dia 0</b>	<b>Cheiro</b>	<b>Sabor</b>
<b>X±δ</b>	8,17±0,18	7,75±1,4
<b>Mínimo</b>	9	4
<b>Máximo</b>	7	7

Tabela 13 - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem controle

Controlo- 9º dia	Cheiro	Sabor
<b>X±δ</b>	6,36±1,2	6,45±1,21
<b>Mínimo</b>	4	4
<b>Máximo</b>	8	8

Tabela 14 - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 18º dia em embalagem controle.

Controlo - 18º dia	Cheiro	Sabor
<b>X±δ</b>	6,36±1,2	6,45±1,2
<b>Mínimo</b>	4	4
<b>Máximo</b>	8	8

Os resultados apresentados nas tabelas associados aos parâmetros cheiro evidenciam que a média desceu ao longo do tempo de armazenagem assim como no parâmetro sabor embora considere-se agradável em todos os dias. Todos os provadores identificaram o sabor láctico nos três dias. Nas tabelas 15, 16 e 17, estão representadas as médias da pontuação, na prova de consumidores em relação ao parâmetro textura. Considerando a escala hedónica sendo 1- Mole e 9 - dura.

Tabela 15 - Pontuação atribuída ao descritor textura no dia 0 em embalagem controle

Controlo - dia 0	Textura
<b>X±δ</b>	3,08±0,66
<b>Mínimo</b>	2
<b>Máximo</b>	4

Tabela 16 - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem controle

Controlo 9º dia	Textura
<b>X±δ</b>	4,45±1,6
<b>Mínimo</b>	2
<b>Máximo</b>	8

Tabela 17 - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem controle

Controlo 18º dia	Textura
<b>X±δ</b>	4,45±1,6
<b>Mínimo</b>	2
<b>Máximo</b>	8

Observou-se que o requeijão endureceu ligeiramente com o decorrer do tempo embora se considere mole. Este parâmetro apresenta um desvio padrão relativamente alto pois temos respostas um pouco dispersas, uma justificação possível para este facto será a mudança na escala que pode ter levado os provadores ao engano, pois passou-se de uma escala em que 1- extremamente desagradável e 9- extremamente agradável para a escala da textura em que 1- Mole e 9- dura. No parâmetro cor em onze pessoas, dez consideraram o requeijão cor branca no decorrer do tempo e apenas uma considerou cor amarela em todos os dias.

Em relação a apreciação global em que a escala designava-se por: 1- não gosto e 9 – gosto muito obtiveram-se os seguintes resultados:

**Tabela 18** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global no dia 0 em embalagem controlo

<b>Controlo - dia 0</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	8.00±1,03
<b>Mínimo</b>	6
<b>Máximo</b>	9

**Tabela 19** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem controlo

<b>Controlo 9º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	6,55±1,5
<b>Mínimo</b>	4
<b>Máximo</b>	9

**Tabela 20** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global no 18º dia em embalagem controlo

<b>Controlo 18º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	6,8±1,13
<b>Mínimo</b>	5
<b>Máximo</b>	9

No geral os provadores gostaram do requeijão, embora preferissem o requeijão do dia. Em suma relativamente a embalagem controlo todos os atributos apresentaram pontuação positiva nos diferentes dias de armazenamento na escala hedónica de 9 pontos.

### **Embalagem em atmosfera modificada (30% CO<sub>2</sub> + 70% N<sub>2</sub>)**

Nas tabelas 21 e 22, estão representadas as médias da pontuação, na prova de consumidores relativamente ao cheiro e sabor. Considerando a escala hedónica sendo 1- extremamente desagradável e 9 extremamente agradável. Obtivemos os seguintes resultados:

**Tabela 21** - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (70% N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>) 9º dia</b>	<b>Cheiro</b>	<b>Sabor</b>
<b>X±δ</b>	7,18±1,25	7,00±1,34
<b>Mínimo</b>	5	4
<b>Máximo</b>	9	8

**Tabela 22** - Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor no 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (70% N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>) 18º dia</b>	<b>Cheiro</b>	<b>Sabor</b>
<b>X±δ</b>	6,70±0,95	6,4±1,4
<b>Mínimo</b>	5	4
<b>Máximo</b>	8	9

Observou-se que no descritor cheiro a média desceu significativamente ao longo do tempo de armazenagem assim como no descritor sabor embora considere-se agradável todos os dias. Todos os provadores identificaram o sabor láctico nos dois dias.

Na tabela 23 e 24 encontram-se representados, os resultados em relação ao descritor textura, considerando a escala sendo 1- Mole e 9 – dura

**Tabela 23** - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (70% N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>) 9º dia</b>	<b>Textura</b>
<b>X±δ</b>	4,73±1,70
<b>Mínimo</b>	2
<b>Máximo</b>	7

**Tabela 24** - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (70% N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>) 18º dia</b>	<b>Textura</b>
<b>X±δ</b>	5,10±1,96
<b>Mínimo</b>	3
<b>Máximo</b>	8

Observou-se que a massa do requeijão endureceu ligeiramente com o decorrer do tempo embora se considere mole. O alto valor de desvio padrão deve-se provavelmente ao facto dos provadores terem percebido mal a escala uma vez que mudou neste atributo. No parâmetro cor em onze pessoas, dez consideraram o requeijão cor branca no decorrer do tempo e apenas uma considerou cor amarela em todos os dias.

Em relação a apreciação global em que escala designava-se por: 1- não gosto e 9 – gosto muito obtiveram-se os seguintes resultados:

**Tabela 25** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP 70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub> 9º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	6,73±1,55
<b>Mínimo</b>	4
<b>Máximo</b>	9

**Tabela 26** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP 70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub> 18º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	6,4±1,4
<b>Mínimo</b>	4
<b>Máximo</b>	9

Relativamente à apreciação global os provadores preferiram o requeijão no 9º dia de armazenamento os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos na embalagem controlo.

Resumidamente relativamente a embalagem MAP 70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub> todos os atributos apresentaram pontuação positiva nos diferentes dias de armazenamento na escala hedónica de 9 pontos.

### **Embalagem em atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>)**

Na tabela 27 e 28, encontram-se os resultados acerca dos atributos cheiro e sabor. Considerando a escala sendo 1- extremamente desagradável e 9- extremamente agradável.

**Tabela 27-** Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (50%CO<sub>2</sub> + 50%N<sub>2</sub>) 9º dia</b>	<b>Cheiro</b>	<b>Sabor</b>
<b>X±δ</b>	7,09±1,04	6,82±1,32
<b>Mínimo</b>	5	4
<b>Máximo</b>	8	8

**Tabela 28 -** Pontuação atribuída aos descritores cheiro e sabor ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (50%CO<sub>2</sub> + 50%N<sub>2</sub>) 18º dia</b>	<b>Cheiro</b>	<b>Sabor</b>
<b>X±δ</b>	6,9± 1,10	5,50±2,36
<b>Mínimo</b>	6	2
<b>Máximo</b>	9	9

Houve uma maior preferência pelo requeijão no 9º dia em termos de sabor e cheiro, embora os provadores considerassem agradável em ambos os dias. Todos os provadores identificaram o sabor láctico nos dois dias.

Em relação ao parâmetro textura, a tabela 29 representa os resultados, considerando a escala sendo 1- Mole e 9 – dura.

**Tabela 29-** Pontuação atribuída ao descritor textura ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (50%CO<sub>2</sub> + 50%N<sub>2</sub>) 9º dia</b>	<b>Textura</b>
<b>X±δ</b>	4,09±1,22
<b>Mínimo</b>	2
<b>Máximo</b>	6

**Tabela 30** - Pontuação atribuída ao descritor textura ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP (50%CO<sub>2</sub> + 50%N<sub>2</sub>) 18º dia</b>	<b>Textura</b>
<b>X±δ</b>	4,90±1,72
<b>Mínimo</b>	3
<b>Máximo</b>	8

Em relação a este parâmetro os provadores consideraram que o requeijão no 18º dia endureceu ligeiramente relativamente ao requeijão no 9º dia. A discrepância nos resultados foi alto devido possivelmente ao facto de a escala ter mudado neste atributo.

Em relação a apreciação global, a tabela 31 e 32 apresenta os resultados. A escala designava-se por: 1- não gosto e 9 – gosto muito obtiveram-se os seguintes resultados.

**Tabela 31** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 9º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP 50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub> 9º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	6,82±1,9
<b>Mínimo</b>	3
<b>Máximo</b>	9

**Tabela 32** - Pontuação atribuída ao parâmetro apreciação global ao 18º dia em embalagem com atmosfera modificada (50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub>)

<b>MAP 50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub> 18º dia</b>	<b>Apreciação global</b>
<b>X±δ</b>	5,9±1,9
<b>Mínimo</b>	4
<b>Máximo</b>	9

Em relação à apreciação global os provadores gostaram mais do requeijão no 9º dia embora considerassem também agradável no 18º dia. Por último relativamente a embalagem MAP 50%N<sub>2</sub>+50%CO<sub>2</sub> todos os atributos apresentaram pontuação positiva nos diferentes dias de armazenamento na escala hedónica de 9 pontos. Resultados semelhantes foram obtidos por Pintado e Malcata (2000) que evidenciaram que os resultados a nível sensorial foram muito próximos nos diferentes tratamentos e todos aceitáveis

Em síntese não houve por parte dos provadores uma preferência relativamente aos três tratamentos uma vez que todos os resultados são acima da aceitabilidade. Note-se que Caro *et al.* não consolidam os mesmos resultados, porque a partir dos 14 dias apenas o tratamento 50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub> alcançaram resultados aceitáveis, evidentemente nos outros tratamentos (controlo e 70%N<sub>2</sub>+30%CO<sub>2</sub>) para além da aceitabilidade a nível sensorial ser negativa a partir dos 14 dias houve crescimento microbiano. Papaioannou et al., (2005) concluiu que o tratamento (50%CO<sub>2</sub>+50% N<sub>2</sub>) é o mais eficaz embora tenha obtido também resultados aceitáveis nos restantes tratamentos.

## 5. Considerações finais

Tendo em conta que o principal objetivo seria perceber se o requeijão, ao sair da queijaria, com dezoito dias ainda se encontraria em perfeitas condições verificaram-se as seguintes conclusões:

Em primeiro lugar, não foram detetados microrganismos patogénicos no requeijão, em nenhum dos lotes submetidos ao estudo. O requeijão produzido pela queijaria Henrique Santiago Lda., e os ensaios obedecem à legislação vigente relativamente às características microbiológicas dos produtos à base de leite. O resultado para a contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem de microrganismos a 30°C apresentaram resultados que comprovam boas práticas de higiene após o fabrico do requeijão.

Na embalagem com atmosfera modificada (50%CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>) a contagem de microrganismos a 30°C manteve-se ao longo do tempo, apresentando no 18º dia um valor de 4 ufc/g o que confirma que o CO<sub>2</sub> tem de facto um efeito bacteriostático.

O requeijão do dia de fabrico (T0), apresentou valores médios de 72,62% de humidade e 11,97% de gordura, 9,67% de proteína e 1,09 de cinzas. Estes resultados estão fora dos limites especificados para o Requeijão da Beira Baixa de Origem Protegida. Provavelmente, estes resultados devem-se ao facto de o requeijão comercializado na queijaria em estudo apresentar-se com algum soro (travia) deste modo, as propriedades nutricionais serão sempre diferentes do requeijão que é totalmente escorrido. Não foram visíveis descidas consideráveis no pH no decorrer do tempo nas diferentes embalagens ao longo do tempo, efetivamente o pH manteve-se entre 6,30 e 6,50.

Relativamente à avaliação sensorial, isto é, à prova de consumidores, constatou-se que todos os atributos avaliados obtiveram, na escala hedónica de 9 pontos, pontuação sempre positiva.

Perante os resultados obtidos a queijaria pode perfeitamente manter o requeijão durante 18 dias na câmara de refrigeração uma vez que, ao longo do tempo e nas condições descritas, o requeijão manteve praticamente as suas condições iniciais. Embora na embalagem com atmosfera modificada 50%CO<sub>2</sub>+50%N<sub>2</sub> se tivesse constatado que a percentagem superior de CO<sub>2</sub> inibiu o crescimento de microrganismo a 30°C, não é de todo justificável o investimento na compra de uma termoseladora pois os resultados nas restantes embalagens foram semelhantes.

## 6. Perspetivas futuras

Tendo em conta as reflexões anteriores, seria oportuno a elaboração de um novo estudo numa outra perspetiva, tendo em conta as diferentes temperaturas do requeijão ao longo do tempo para, desta forma, assegurar que o cliente/consumidor quando adquirisse o requeijão, este estivesse em perfeitas condições. É ainda de referir, que Pintado e Malcata (2000), evidenciaram nos seus trabalhos que há impacto nas características do requeijão quando há oscilações de temperaturas mesmo em atmosfera modificada.

Poderá ser interessante efetuar um estudo do impacto da adição de diferentes percentagens de leite e perceber, assim, se influência ou não na textura e no rendimento do requeijão.

Durante a preparação das amostras, utilizou-se a varinha mágica o que deixou o requeijão com um aspeto e textura muito agradáveis, sem os grânulos característicos ficando uma espécie de mousse, seria igualmente, interessante tentar estabilizar essa textura e, assim, comercializar o requeijão com um aspeto sugestivo e apelativo.

## Referências bibliográficas

Affertsholt-Allen T. Market (2009) developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. IDF Symposium "Lactose and its Derivatives." Moscow

ALFA-LAVAL, 1990. Manual de indústrias lácteas. Segunda Edição. AMV Ediciones

Almeida, J. L.; Oliveira, M. J.; Amaral, M. S.; Rodrigues, R. M.; Sampaio, F. F.; Branco, J. F.; Melo, A. A. Guerra, J. (2005). Boas práticas de fabrico em queijarias tradicionais. Escola Superior Agrária de Coimbra. Coimbra, Portugal, pp. 27-32.

AOAC (1990). Method nº 935.42. Ash of Cheese. Gravimetric method. Association of official Analytical

AOAC (2005). Method nº 920.123. Determination of the total nitrogen content of hard, semihard

Associação de Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco. (2011). Requeijão da Beira Baixa, denominação da origem Protegida . Castelo Branco: Associação de Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco.

Chandan, Ramesh; Kilara, Arun (2011). Dairy Ingredients for Food Processing. Ames : Blackwell Publishing Ltd chemists, Washington.

CIAA, 2010. Data & trends of the European Food and Drink Industry-2009. Confederation de Industries Agro-Alimentaires de l'Union Européenne, Bruxelas.

Coles,R; McDowell, D;Kirswan, M.J. Food Packaging Technology. Head of supply and packaging division. Oughery College,. Northern Ireland

Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T. e Bava, U. (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*. 145: 4366–4374.

Costa D. C. (2011). Caracterização e tratamento de efluentes resultantes da actividade de produção de queijos. Lisboa : Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Ellis, M.J. Shelf life evaluation of foods. London: Black Academic & Professional, 1996. 321p.

Ferreira, W., Sousa, J.C. (2000). Microbiologia. (Lisboa). Lidel.

Finne, G. (1982) Modified – and controlled – atmosphere storage of muscle foods. *Food technology* 36, 128-133

Floros,J. D.; Matsos, K. I. (2005) Introduction on modified atmosphere packaging. *Innovations in food packaging* pp159-172, Elsevier Ltd.

Fonseca, V.D., Haminiuk, C.W.I., Izydoro, D.R., Waszczynskyj, N., Scheer, A.D. e Sierakowski, M.R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 777-783.

Fonseca, V.D., Haminiuk, C.W.I., Izydoro, D.R., Waszczynskyj, N., Scheer, A.D. e Sierakowski, M.R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 777-783.

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

Gregorio, J.P.P., 2010. Medição do desempenho de abastecimento Agro-industrial, Departamento de Economia, Gestão e Engenharia Industrial. Universidade de Aveiro, Aveiro.

- Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M.J.J., Johnston, J.M., Badger, T.M., (2001) Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 10, 555–558.
- ISO 5534 (2004) Cheese and processed cheese -- Determination of the total solids content. International Organization for Standardization
- ISO 7218:2007- Microbiologia de alimentos e alimentação animal – Requisitos e orientação para exames microbiológicos.
- Khoshgozaran, S.; Azizi, M. H.; Fallah, N. B. (2012) Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. *Dairy Science and Technology*, v. 92, p. 1–24.
- Madureira, A.R., Soares, J.C., Pintado, M.E., Gomes, A.P., Freitas, A.C. e Malcata, F.X. (2008). Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI (R) L26. *Dairy Science & Technology*. 88: 649-665
- Mattoso J et al. (1997) Portugal – O sabor da terra. Círculo de Leitores/Pavilhão Lisboa. de Portugal/Expo'98,
- Mantilla, S. P. S.; Santos, E.B.; Vital, H. C.; Mano, S. B., Freitas, M. Q.; Franco, R. M. (2010) Efeito combinado da embalagem em atmosfera modificada e radiação gama na microbiologia e na aceitação sensorial de filés de peito de frango resfriados. *Biotemas*, v.23, n.2, p.149-155, Brasil
- MAOTDR (março 2007) ,Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do desenvolvimento Regional. Estrategia nacional para os efluentes Agro-pecuario e Agro-indústria. Lisboa: Maiadouro
- Merck (2000). *Microbiology Manual*. 12th Edition. French & European Pubns. Darmstadt, Germany.
- Mestrado, Universidade do Minho, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia
- Mulvihill, D. M. (1991). Trends in the production and utilization of dairy protein products: production. *Food Research Quarterly*, 51,145-157. Mundi Prensa.
- Noronha, J. F.; Santos, C.; Malta, M. C.; Azevedo, H. P.; Henriques, C. S.; Madaleno, J. P.; Cabral, A. C.; Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra
- NP 2105 (1983). Determinação do teor de matéria gorda. Técnica de Van Gulik. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 2105 (1983). Determinação do teor de matéria gorda. Técnica de Van Gulik. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade.
- Nunes, E. (2009) Qualidade de mandioquinha-salsa minimamente processada e armazenada sob atmosfera modificada. *Ciência Rural*, v. 39, n. 7, p. 2185-2190, Brasil
- Papaoannou, G., Chouliara, I., Karatapanis, A.E., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2007) Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging. *Int. Dairy J.*;17:358–364.
- Phillips, C. A. (1996) Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 31, n. 6, p. 463-479
- Philson, S.B. e Llinás, M. (1982). Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry*. 257: 8081-8085.
- Pintado, M. E. and Malcata, F. X. (2000). Characterization of whey cheese packed under vacuum. *Journal of Food Protection*. 63, 216-221

Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., & Malcata, F. X. (1996). Characterization of Requeijaão and technological optimization of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering*, 30, 363-76.

Pintado, M. E., Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (2001) Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International*. 7: 105-116.

Pintado, M.E. e Malcata, F.X. (1999). Estudos descritivos e tecnológicos sobre Requeijão: caracterização e conservação. *Boletim de Biotecnologia*. 62: 19-25.

Pintado, M.E. e Malcata, F.X. (2000). Optimization of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão. *Food Research International*. 33: 821-832.

Pintado, M.E., Silva, J.A. e Malcata, F.X. (1996). Characterization of Requeijão and Technological Optimization of its Manufacturing Process. *Journal of Food Engineering*. 30: 363-376.

Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A. (2002) *Microbiology*. 5th Edition, The McGraw-Hill Companies. New York, USA.

processed cheese by kjeldahl analysis. Association of official Analytical chemists, Washington.

R.P.F. Guiné, E. Costa, S. Santos, A.C. Correia, P.M.R. Correia, L.(2012). Food product development: whey cheese with pumpkin jam. *Academic Research International*, 2 (1), pp. 52-59

Regulamento (CE) Nº 1441/2007 de 5 de Dezembro. *Jornal oficial da União Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CE) Nº 510/2006 de 20 de Março. *Jornal oficial da União Europeia*. Bruxelas.

Requeijão da Beira Baixa DOP - Caderno de Especificações. (2011). Associação de Produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco. Castelo Branco, Portugal.

Robinson, R.K. (1994). *Modern Dairy Technology: Advances in Milk Products*. Vol. 1, 2nd Edition. Elsevier. New York, USA.

Rodrigues, L. (2001). Valorização da fracção proteica do soro de queijo. Tese de

Sarantopoulos, C. I. G. L. (1997) Embalagens para vegetais minimamente processados – Fresh Cut. *Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens*, v. 9, n. 5, p. 4,.

Silverstick, M.; Rosnes, J.T.; Kleiberg, G.H. (2002) Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 68, p. 1467 - 1468,.

Souza, J.P; Jong, E.V.; Goulart, H.H.R. (2001) Aumente o tempo de conservação dos alimentos e obteba mais lucros. Porto Alegre: Imprensa livre, 112p.

Tavares, T.G. e Malcata, F.X. (2011). The Portuguese Paradox: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chemistry*. 131: 727-729.

Tranjan, B. C. et al (2009). Development of Whey Goat Beverages. *International Journal of Dairy Technology*, v. 62, n. 3, p. 438-443

Vodret, A. (1970). La ricotta pecorina sarda. *Scienza et Tecnica Lattiero-Casearia*, 21, 310-313.

Walker, S., (1996). The principles and practice of shelf life prediction for microorganisms. In: Man. C. & Jones, A. – Shelf life evaluation of foods. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-7514-0033-5. pp. 40-51.

Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglea, P. (Coord.) (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed.; versão digital. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1020 p.

## ANEXO





CENTRO DE APOIO  
TECNOLÓGICO  
AGRO ALIMENTAR

Data: \_\_\_\_\_

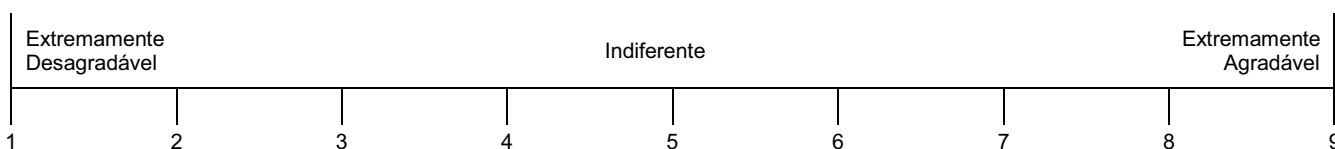
Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Observe a amostra e identifique a cor:

Amarelo       Branco       Outra(s): \_\_\_\_\_

Antes de provar, **circunde** na seguinte escala o número que melhor representa a sua sensação.

**Cheiro**



Antes de provar consegue identificar algum dos seguintes aromas?

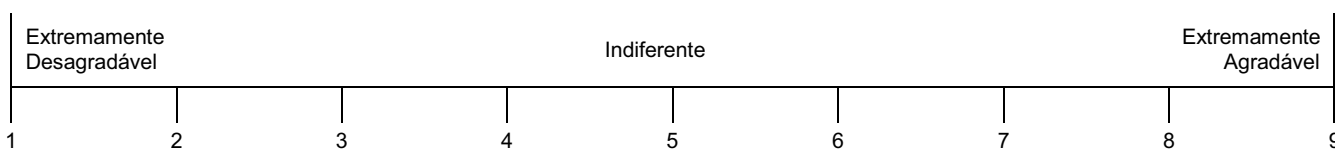
Láctico       Ranço       Outro(s): \_\_\_\_\_

Prove a amostra. **Circunde** nas seguintes escalas o número que melhor representa a sua sensação.

**Textura**



**Sabor**



Consegue identificar algum dos seguintes sabores?

Láctico       Ranço       Amargo  
 Doce       Salgado       Outro(s): \_\_\_\_\_

**Apreciação global**

