

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LIDIANE PESCKE PEREIRA

COMPARAÇÃO ENTRE LEITES ESTÁVEL E INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NA
PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO GRANA: AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA,
SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DURANTE A MATURAÇÃO

PONTA GROSSA

2025

LIDIANE PESCKE PEREIRA

COMPARAÇÃO ENTRE LEITES ESTÁVEL E INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NA
PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO GRANA: AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA,
SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DURANTE A MATURAÇÃO

Tese apresentada para obtenção de título de doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem

PONTA GROSSA

2025

P436 Pereira, Lidiane Pescke
Comparação entre leites estável e instável não ácido na produção de queijo tipo grana: avaliações físico-química, sensorial e microbiológica durante a maturação / Lidiane Pescke Pereira. Ponta Grossa, 2025.
115 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem.

1. Cálcio iônico. 2. Contagem - células somáticas. 3. Instabilidade - leite. 4. Lina. 5. Queijos maturados. I. Salem, Renata Dinnies Santos. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

LIDIANE PESCKE PEREIRA

“Comparação entre leites estável e instável não ácido na produção de queijo tipo Grana: Avaliações físico-química, sensorial e microbiológica durante a maturação”

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG-PR

Documento assinado digitalmente
 **RENATA DINNIES SANTOS SALEM**
Data: 29/04/2025 21:10:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG-PR - Presidente

Documento assinado digitalmente
 **AILTON CESAR LEMES**
Data: 30/04/2025 09:24:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ailton Cesar Lemes - UFRJ-RJ - Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUTTIERRES GOMES**
Data: 30/04/2025 18:15:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes - UEM-PR - Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente
 **ALINE ALBERTI**
Data: 05/05/2025 16:05:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Aline Alberti - UEPG-PR - Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO NOGUEIRA**
Data: 06/05/2025 16:30:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG-PR - Membro Titular Interno

Ponta Grossa, 25 de abril de 2025.

RESUMO

O leite pode se tornar instável pela redução do pH, causada pela fermentação da lactose, sendo então classificado como leite ácido. Há também casos em que o leite apresenta pH e acidez normais, mas permanece instável, caracterizando-se como leite instável não ácido (LINA). O LINA é rejeitado pelos laticínios, pela alteração na estrutura das micelas de caseína, que desestabilizam com o calor, provocando precipitação das proteínas durante o processamento térmico. Na produção de queijos, a coagulação é necessária, assim, uma menor estabilidade do leite pode não afetar o processo. Na fabricação de queijos duros, é adicionado cloreto de cálcio (CaCl_2) para aumentar o teor de cálcio solúvel no leite, que atua na formação da massa do queijo e, se não adicionado, a coagulação será demorada e incompleta. Assim, o objetivo desse estudo foi elaborar queijos tipo grana com LINA e leite estável, com e sem adição de CaCl_2 , para determinar a influência do LINA nas características físico-químicas e sensoriais e comparar com o queijo produzido com leite estável. No leite, foram realizados o teste do álcool (72, 74 e 76% (v/v)), acidez titulável, contagem bacteriana total, contagem de células somáticas, pH, estabilidade térmica, cálcio total e iônico, proteínas totais, % de gordura e lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e condutividade elétrica nas amostras de LINA e leite estável (LE). Nos queijos, foram determinados o rendimento, características físico-químicas e microbiológicas, cálcio total, índices de maturação, cor, textura e sensorial. O LINA apresentou teor de proteína (3,32 g/100g) e lactose (4,90 g/100g) menor que o LE (3,54 g/100g e 5,21 g/100g respectivamente) e maior teor de gordura (4,32 g/100g), cálcio total (222,5 mg%) e iônico (0,1283 g/L) quando comparado com o leite estável (3,62 g/100g, 163,5 mg% e 0,0824 g/L respectivamente). As características físico químicas foram semelhantes ao LE, tendo diferença somente na condutividade elétrica do leite (5,61 mS no LE e 5,78 mS no LINA) pelo maior teor de cálcio iônico presente nesse leite. O LINA interferiu nas características dos queijos, bem como a adição de CaCl_2 na formulação. Os queijos produzidos com LINA tiveram menores valores de pH (5,19 com CaCl_2 e 5,18 sem CaCl_2) maior acidez (0,98 com CaCl_2 e 0,82 sem CaCl_2) e menores teores de umidade (28,52 com CaCl_2 e 29,27 sem CaCl_2), quando comparados com os queijos produzidos com LE. As características microbiológicas de todos os queijos avaliados estavam dentro do padrão exigido pela legislação. O LINA interferiu no perfil de textura dos queijos deixando-os mais duros quando produzidos com CaCl_2 e com menor dureza quando produzidos sem CaCl_2 . A análise sensorial, mostrou que todos os queijos produzidos obtiveram boa impressão global (notas maiores que 7,0) boa aceitação (acima de 70%) e intenção de compra pelos avaliadores (a maioria dos avaliadores provavelmente comprariam). Sendo assim, conclui-se que o LINA pode ser utilizado para produzir queijos duro tipo grana, e seu maior teor de cálcio iônico pode substituir o CaCl_2 na formulação.

Palavras-chave: Cálcio iônico. Contagem de células somáticas. Instabilidade do leite. LINA. Queijos maturados.

ABSTRACT

Milk can become unstable due to a reduction in pH caused by lactose fermentation, thus being classified as acid milk. There are also cases where milk presents normal pH and acidity but remains unstable, characterizing it as non-acid unstable milk (LINA). LINA is rejected by dairies due to the alteration in the structure of casein micelles, which destabilize with heat, causing protein precipitation during thermal processing. In cheese production, coagulation is necessary, so lower milk stability may not affect the process. In the manufacture of hard cheeses, calcium chloride (CaCl₂) is added to increase the soluble calcium content in milk, which aids in the formation of the cheese mass, and if not added, coagulation will be slow and incomplete. Thus, the objective of this study was to produce grana-type cheeses with LINA and stable milk, with and without the addition of CaCl₂, to determine the influence of LINA on the physicochemical characteristics and whether. In the milk, the alcohol test (72, 74, and 76% (v/v)), titratable acidity, total bacterial count, somatic cell count, pH, thermal stability, total and ionic calcium, total proteins, % of fat and lactose, total dry extract, defatted dry extract, and electrical conductivity were carried out on the samples of LINA and stable milk (LE). In the cheeses, yield, physicochemical and microbiological characteristics, total calcium, ripening indices, color, texture, and sensory evaluation were determined. LINA showed lower protein content (3.32 g/100g) and lactose (4.90 g/100g) compared to LE (3.54 g/100g and 5.21 g/100g respectively) and higher fat content (4.32 g/100g), total calcium (222.5 mg%) and ionic (0.1283 g/L) when compared with stable milk (3.62 g/100g, 163.5 mg% and 0.0824 g/L respectively). The physicochemical characteristics were similar to LE, with the only difference being the electrical conductivity of the milk (5.61 mS in LE and 5.78 mS in LINA) due to the higher ionic calcium content present in this milk. LINA interfered with the characteristics of the cheeses, as well as the addition of CaCl₂ in the formulation. The cheeses produced with LINA had lower pH values (5.19 with CaCl₂ and 5.18 without CaCl₂), higher acidity (0.98 with CaCl₂ and 0.82 without CaCl₂), and lower moisture content (28.52 with CaCl₂ and 29.27 without CaCl₂), when compared to the cheeses produced with LE. The microbiological characteristics of all the evaluated cheeses were within the standards required by legislation. LINA interfered with the texture profile of the cheeses, making them harder when produced with CaCl₂ and less hard when produced without CaCl₂. The sensory analysis showed that all the produced cheeses received a good overall impression (scores higher than 7.0), good acceptance (above 70%), and purchase intention from the evaluators (most evaluators would likely buy them). Thus, it is concluded that LINA can be used to produce hard cheeses of the Grana type, and its higher ionic calcium content can replace CaCl₂ in the formulation.

Keywords: Aged cheeses. Ionic calcium. LINA. Milk instability. Stable milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Queijos cobertos com película especial, durante a maturação.....	40
Figura 2- Fluxograma da fabricação dos queijos.....	41
Figura 3 - Teste do álcool positivo (A) nas concentrações 72, 74 e 76 %, leite caracterizado como LINA. Teste do álcool negativo (B) nas concentrações 72, 74 e 76 %, leite caracterizado como estável.....	47
Figura 4 -Teste do alizarol nas amostras de leite estável acima e no LINA abaixo, mostrando que ambas as amostras não demonstraram acidez elevada (A). Ao lado (B) temos as colorações para um leite alcalino (1), leite normal (2) e leite ácido (3).....	48
Figura 5 - Coloração dos queijos ao longo do período de maturação, utilizando as coordenadas cartesianas L^* , a^* e b^*	68
Figura 6 - Gráficos demonstrando o ângulo HUE encontrados nos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao final do período de maturação (180 dias).....	69
Figura 7. Queijos produzidos com LE com adição de CaCl_2 (a esquerda) e sem adição de CaCl_2 (a direita) após 180 dias de maturação.....	70
Figura 8. Queijos produzidos com LINA com adição de CaCl_2 (a esquerda) e sem adição de CaCl_2 (a direita) após 180 dias de maturação.....	70
Figura 9 - Análise de correspondência múltipla bidimensional dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Evolução do pH dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	57
Gráfico 2 - Evolução da acidez dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	58
Gráfico 3 - Evolução do teor de gordura dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	59
Gráfico 4 - Evolução da umidade dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	60
Gráfico 5- Atividade da água nos queijos durante os 180 dias de maturação.....	61
Gráfico 6 - Extensão da proteólise dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	65
Gráfico 7- Profundidade da proteólise dos queijos durante os 180 dias de maturação.....	66
Gráfico 8 - Pontuações escala do ideal para o atributo maciez e acidez dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2	80
Gráfico 9 - Intenção de compra dos consumidores dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pH, densidade e índice crioscópico do leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).....	50
Tabela 2 - Valores da condutividade elétrica, cálcio total e cálcio iônico do leite cru caracterizado como estável (LE), instável não ácido (LINA).....	51
Tabela 3 - Contagens de células somáticas (CCS) e bacteriana total (CBT) para o leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).....	52
Tabela 4 - Composição do leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).....	53
Tabela 5 - Rendimento e caracterização físico-química dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao final da maturação (180 dias).....	55
Tabela 6 - Análise microbiológica dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) no dia 0 e com 180 dias de maturação.....	64
Tabela 7 - Parâmetros de cor dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao longo do período de maturação.....	67
Tabela 8 - Dureza (N) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 , durante o período de maturação.....	71
Tabela 9 - Coesividade* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 , durante o período de maturação.....	72
Tabela 10 - Adesividade (N.s) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 , durante o período de maturação.....	73
Tabela 11 - Elasticidade* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.....	74
Tabela 12 - Mastigabilidade (N) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 , durante o período de maturação.....	76
Tabela 13 - Resiliência* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.....	78
Tabela 14 – Médias hedônicas para impressão global, sabor e aceitabilidade dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2	79

Tabela 15 - Média da intensidade dos atributos avaliados pelo RATA para os queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_282

Tabela 16 - Médias das notas da Intenção de compra dos consumidores dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_290

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.....	14
3.1.1	<i>Proteínas.....</i>	14
3.1.2	<i>Gorduras.....</i>	15
3.1.3	<i>Lactose.....</i>	16
3.1.4	<i>Minerais.....</i>	16
3.1.5	<i>Enzimas.....</i>	16
3.2	PARÂMETROS DE QUALIDADE DO LEITE.....	17
3.3	FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DO LEITE	21
3.3.1	<i>Espécie, raça e genética do animal</i>	21
3.3.2	<i>Estágio da lactação</i>	22
3.3.3	<i>Fatores nutricionais.....</i>	22
3.3.4	<i>Fatores ambientais</i>	24
3.3.5	<i>Sanidade do rebanho</i>	24
3.4	LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA).....	25
3.4.1	<i>Ocorrência do leite instável não ácido</i>	26
3.4.2	<i>Concentração de cálcio iônico no LINA</i>	27
3.4.3	<i>Influência do leite instável não ácido na indústria</i>	27
3.5	QUEIJO.....	29
3.6	DESNATURAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS	30
3.7	QUEIJOS DUROS TIPO GRANA	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	ANÁLISES DO LEITE	35
4.1.1	<i>Teste do álcool nas concentrações 72, 74 e 76% (v/v).....</i>	35
4.1.2	<i>Teste do Alizarol.....</i>	36
4.1.3	<i>Acidez titulável em graus Dornic</i>	36
4.1.4	<i>Estabilidade térmica</i>	36
4.1.5	<i>Contagem Bacteriana total e contagem de células somáticas do leite</i>	37
4.1.6	<i>pH</i>	37
4.1.7	<i>Cálcio total e cálcio iônico (Ca^{2+})</i>	37
4.1.8	<i>Proteínas totais</i>	38
4.1.9	<i>Teores de gordura (%), lactose (%) e densidade (g/mL)</i>	38
4.1.10	<i>Extrato seco total (%) e extrato seco desengordurado (%)</i>	38
4.1.11	<i>Condutividade elétrica.....</i>	38
4.1.12	<i>Índice crioscópico.....</i>	39
4.2	PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS.....	39

4.3	ANÁLISES DOS QUEIJOS	42
4.3.1	<i>Análises físico-químicas</i>	42
4.3.2	<i>Cálcio total</i>	42
4.3.3	<i>Rendimento</i>	43
4.3.4	<i>Análises microbiológicas</i>	43
4.3.5	<i>Índices de maturação</i>	43
4.3.6	<i>Análise de cor</i>	44
4.3.7	<i>Análise de textura</i>	44
4.3.8	<i>Análise Sensorial</i>	44
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ANÁLISES DO LEITE	47
5.1.1	<i>Teste do álcool nas concentrações 72, 74 e 76% (v/v), teste do alizarol, acidez titulável e estabilidade térmica</i>	47
5.1.2	<i>pH, densidade e Índice crioscópico</i>	50
5.1.3	<i>Condutividade elétrica, cálcio iônico (Ca²⁺) e cálcio total</i>	51
5.1.4	<i>Contagem Bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) do leite</i> ...	52
5.1.5	<i>Composição do leite</i>	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS QUEIJOS.....	54
5.2.1	<i>Rendimento e características físico-químicas</i>	54
5.2.2	<i>Análises microbiológicas</i>	63
5.2.3	<i>Índices de maturação: Extensão e profundidade da proteólise</i>	64
5.2.4	<i>Coloração</i>	66
5.2.5	<i>Perfil de textura</i>	70
5.2.6	<i>Análise Sensorial</i>	78
5.2.6.1	<i>Avaliação da aceitabilidade</i>	75
5.2.6.2	<i>Escala do Ideal</i>	76
5.2.6.3	<i>RATA– rate all that apply</i>	77
5.2.6.4	<i>Intenção de compra</i>	84
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E	
	QUESTIONÁRIO SENSORIAL.....	107

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de leite, sendo os estados de Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul os que destacam como os principais produtores nacionais. No estado do Paraná, a atividade leiteira tem apresentado crescimento contínuo nos últimos anos, consolidando a região Sudoeste, desde 2016, como a principal bacia leiteira estadual e uma das mais relevantes do país. A região dos Campos Gerais demonstra expressiva participação na atividade, com os municípios de Carambeí, Castro e Arapoti figurando entre os maiores produtores de leite no estado. Nesse contexto, o município de Castro (PR) se sobressai como o maior produtor de leite em nível nacional.

Além da alta produção, é indispensável que o leite produzido seja de qualidade e isso exige um controle rigoroso, desde o manejo nutricional dos animais, cuidados durante a ordenha, armazenamento e o transporte do leite até a indústria. Para garantir o máximo de qualidade do leite, o Brasil conta com as Instruções Normativas 76 e 77 de 2018 do Ministério da Agricultura (MAPA), que estabelecem normas para a produção e padrões físico-químicos para o leite cru e industrializado, para parâmetros de pH, acidez, estabilidade ao álcool e ao alizarol, densidade relativa, teor de gordura e proteína, índice crioscópico, contagem de células somáticas (CCS) e a contagem padrão em placas (CPP).

A estabilidade do leite é um dos parâmetros de qualidade exigidos pela legislação e sua avaliação é realizada por meio do teste do álcool. O álcool utilizado no teste promove a desidratação das proteínas, reduzindo a constante dielétrica do meio, levando ao aumento da dissolução de sais e redução da carga negativa das micelas, fazendo com que aumente a precipitação das caseínas. Sendo assim, quando o leite coagula no teste é classificado como instável. A legislação brasileira exige submeter o leite ao álcool 72 °GL e o mesmo não apresentar precipitação para ser aceito.

O leite pode apresentar instabilidade devido à queda de pH, que normalmente ocorre pela fermentação da lactose por micro-organismos mesófilos com produção de ácido láctico; esse leite é chamado de leite ácido. Por outro lado, o leite pode apresentar níveis normais de pH e acidez titulável e mesmo assim apresentar instabilidade; esse leite é chamado de leite instável não ácido ou LINA. A indústria de lácteos rejeita o LINA, pois esse leite não mantém sua integridade quando submetido à elevadas temperaturas durante o processamento térmico, e isso gera prejuízos para a cadeia produtiva e penalizações ao produtor.

O consumo do LINA não é prejudicial à saúde, uma vez que não é um leite adulterado ou contaminado, porém, apresenta alterações físico-químicas que podem comprometer sua estrutura durante o processamento na indústria. A instabilidade do leite pode causar precipitação das proteínas durante o processamento do leite Ultra High Temperature (UHT), aderindo-se aos equipamentos, resultando em elevação dos custos de limpeza e aumento no descarte do leite pela indústria. Estudos mostram que o leite estável apresenta teores de proteína e lactose superiores ao LINA. Por outro lado, o LINA pode apresentar teores de gordura e cálcio iônico superiores ao leite estável, que em algumas situações pode ser desejável para a fabricação de alguns produtos.

Apesar das dificuldades relatadas na literatura quanto à composição físico-química e ao comportamento tecnológico do leite instável não ácido (LINA) durante o processamento industrial, ainda são escassos os estudos relacionados à sua aplicação na elaboração de produtos lácteos. O LINA apresenta composição semelhante à do leite considerado estável e encontra-se em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 76/77 (Brasil, 2018). A instabilidade das micelas da caseína, característica desse tipo de leite, pode não comprometer determinados processos, como a fabricação de queijos, nos quais se emprega pasteurização lenta e adição de enzimas proteolíticas específicas para a formação do coágulo. Assim, o uso de LINA na produção de queijos frescos tem sido apontado como uma alternativa viável. No entanto, inexistem registros na literatura sobre a utilização desse leite na fabricação de queijos maturados. Diante dessa lacuna, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a viabilidade de produção e as características físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e de maturação de queijo duro tipo grana elaborado a partir de leite instável não ácido (LINA).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características físico-químicas, sensoriais e de maturação de queijo duro tipo grana elaborado com leite estável e leite instável não ácido (LINA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o LINA e o leite estável por meio de análises físico-químicas e microbiológicas.
- Produzir queijos duros tipo grana com LINA e com leite estável pasteurizados, adicionados ou não de CaCl_2 .
- Avaliar a influência do CaCl_2 nas características físico-químicas e de maturação dos queijos.
- Determinar o rendimento dos queijos produzidos com LINA e com leite estável.
- Avaliar as características microbiológicas dos queijos produzidos com LINA e comparar com o queijo produzido com leite estável, no início e ao final da maturação.
- Avaliar as características sensoriais dos queijos produzidos com LINA e com leite estável.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

O leite e seus derivados estão entre os alimentos mais consumidos em todo o mundo, pois são altamente nutritivos e essenciais para a nutrição humana (Moura *et al.*, 2017). A composição do leite é de suma importância para a indústria processadora, que depende do conhecimento das suas características físico-químicas para a elaboração de diferentes produtos lácteos, e também para assegurar a sua qualidade (Silva *et al.*, 2019b).

O leite é composto por cerca de 88 g/100 g de água, 3,2 g/100 g de proteína, 3,4 g/100 g de gordura, 4,7 g/100 g de lactose e 0,72 g/100 g de minerais (Wattiaux, 2008). Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de diversas substâncias como lipídeos, proteínas, lactose, enzimas, sais e vitaminas, das quais algumas estão em emulsão como a gordura e as substâncias associadas, outras em suspensão como as caseínas e ligadas a sais minerais, e outras em dissolução como a lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro e sais (Fox *et al.*, 2017).

3.1.1 Proteínas

O leite bovino apresenta, em média, 3,2 a 3,5% de proteína, sendo constituído por compostos nitrogenados, dentre os quais 95% ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não proteicos (Tronco, 2010). As principais proteínas presentes no leite são as caseínas (α , β , κ) e as proteínas do soro (β -lactoglobulina (BLG), α -lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e glicomacropéptídeos (GMP)). As caseínas constituem de 76 a 86% das proteínas presentes no leite, sendo os componentes determinantes do rendimento industrial na produção de queijos e ricota (González *et al.*, 2021). Algumas das principais propriedades tecnológicas do leite (estabilidade ao álcool, ao calor e à coagulação por coalho), são proporcionadas pelas características físico-químicas das micelas de caseína (Fox; Brodtkorb, 2008).

As caseínas são secretadas na forma de micelas, ou seja, grupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons (fosfato e o cálcio) e se encontram em suspensão no leite. Os subgrupos das micelas de caseína são formados principalmente pela α s1-caseína, que é considerada a fração mais susceptível ao efeito de proteases, e a fração α s2-caseína, altamente

hidrofílica e com grande sensibilidade ao cálcio ionizável (Silva *et al.*, 2019b). A fração de β -caseína é mais sensível em baixas temperaturas, tornando-se também susceptível às proteases presentes no leite. A fração considerada menos hidrofóbica, responsável por manter a estabilidade proteica da micela, é a κ -caseína, que sofre menos efeito do cálcio solúvel, em comparação com as demais frações, mantendo assim a estrutura e a repulsão eletrostática entre as micelas em solução no leite (Cruz *et al.*, 2016).

Na solução do leite, estão as proteínas do soro α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que podem ser produzidas na glândula mamária, ou podem passar diretamente do sangue para a glândula mamária, como a albumina sérica e as imunoglobulinas (Brasil, 2015). O leite possui ainda uma fração de nitrogênio-não proteico (NNP), constituindo cerca de 5% da proteína bruta do leite, composta principalmente de ureia (aproximadamente 48%) e em menor quantidade de creatinina, amônia e outros compostos nitrogenados (Silva *et al.*, 2019b).

3.1.2 Gorduras

A gordura faz parte da composição energética do leite e é responsável pelas propriedades físicas, tecnológicas e sensoriais do leite e seus derivados (González *et al.*, 2021). É o componente com maior variação percentual (3 a 6%), que irá depender da raça do animal, época do ano, nutrição e período de lactação dos animais (Nekrasov *et al.*, 2018). As gorduras presentes no leite são compostas por moléculas orgânicas apolares (insolúveis em água), formadas a partir de ácidos graxos (-COOH) e álcool (-OH) (Nelson; Cox, 2014). As células epiteliais mamárias que formam os alvéolos são responsáveis pela síntese da gordura do leite, que é feita a partir de substâncias extraídas do sangue (González; Silva, 2017), sendo secretada na forma de glóbulos, compostos principalmente de triglicerídeos (Argov *et al.*, 2014).

As gorduras do leite apresentam alguns ácidos graxos benéficos à saúde, como o ácido oleico e os isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), que estão associados à redução do colesterol e efeitos anticarcinogênicos (Kratz *et al.*, 2013). Maiores níveis de gordura no leite são buscados pelos laticínios, pois podem aumentar o rendimento de alguns produtos nobres, como alguns tipos de queijo (González *et al.*, 2021). Nos queijos tipo grana, a gordura ou sua padronização, permitem a obtenção da textura desejada. Nos queijos maturados, as lipases microbianas hidrolisam a gordura, liberando ácidos graxos que conferem sabor e o aroma final ao produto (Wiking *et al.*, 2019).

3.1.3 Lactose

A lactose é o principal carboidrato encontrado no leite, sendo um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose ligada a uma molécula de galactose. Este açúcar possui um papel muito importante na síntese do leite, e sua função está relacionada com a manutenção da osmolaridade e com os processos de produção e secreção (Guinard-Flament *et al.*, 2006). É responsável por atrair a água para o leite (cerca de 50% da pressão osmótica para a síntese do leite), que confere o volume do leite produzido (Boutinaud *et al.*, 2008). A concentração média de lactose no leite varia em torno de 4,7 a 5,2 g/ 100 mL, podendo ocorrer pequenas variações de um animal para outro (Tronco, 2010).

3.1.4 Minerais

Os minerais estão presentes no leite, e são classificados em macrominerais, sendo pertencentes a este grupo o sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio e fósforo, e alguns traços de elementos como ferro, cobre, zinco, manganês, selênio, iodo, cromo, cobalto, molibdênio, flúor, arsênio, níquel, silício e boro (Vahcic *et al.*, 2010). Os minerais são responsáveis por manter o equilíbrio constante do leite, dependendo do pH, temperatura e concentração salina, por isso, mudanças na concentração de sais influenciam em sua estabilidade (Nelson; Cox, 2014).

Os minerais presentes no leite podem estar integrados às micelas da proteína ou isolados em solução, permanecendo em constante equilíbrio na fase solúvel ou livres e na fase coloidal (Ordóñez *et al.*, 2005) representando cerca de 0,6 - 0,8% do peso do leite, sendo o cálcio o mais importante para a saúde humana (Neves, 2021). O cálcio possui funções no organismo humano como a formação e manutenção de ossos e dentes, regulação dos batimentos cardíacos, participação na atividade de algumas enzimas e no ajuste do balanço de íons cálcio, sódio, cloro e magnésio (Philippi, 2014).

3.1.5 Enzimas

As enzimas presentes no leite originadas nas células do tecido mamário, plasma sanguíneo e nos leucócitos do sangue, são catalisadores bioquímicos, ou seja, promovem a hidrólise dos componentes do leite, e a sensibilidade ao calor de algumas enzimas como a

fosfatase alcalina e a lactoperoxidase, é utilizada como controle em tratamentos térmicos como a pasteurização (Sosnowski *et al.*, 2016). A fosfatase alcalina se encontra associada à membrana dos glóbulos de gordura do leite, na interface água/gordura (Fox *et al.*, 2017). Para garantir uma pasteurização efetiva, a atividade desta enzima deve ser diminuída em torno de quinhentas vezes, comparado ao leite cru (Ceni *et al.*, 2016). A lactoperoxidase é a segunda enzima mais abundante no leite bovino, classificada como termoresistente e inativada em temperaturas acima de 80° C por mais de 2,5 segundos, sendo utilizada para monitorar se o leite foi tratado termicamente em temperatura acima da ideal (Lorenzen *et al.*, 2010).

A plasmina é a principal protease presente no leite e é encontrada juntamente com o seu precursor inativo, o plasminogênio. Essa enzima é responsável por degradar β -, α S1- e α S2-caseína, (Ismail; Nielsen, 2010). É classificada como proteinase alcalina e encontra-se associada às frações de caseína, sendo responsável por aproximadamente 90% da proteólise total que ocorre no leite (Draxler; Medcalf, 2015). Os componentes da plasmina interagem entre si e com outros componentes do leite, como a caseína e as proteínas do soro, promovendo ou inibindo a proteólise, dependendo da intensidade do tratamento térmico e das condições de armazenagem do leite (Santos *et al.*, 2018).

A ativação de plasminogênio no leite é promovida principalmente pela presença das células somáticas, presentes na mastite. Os principais ativadores da plasmina são a trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite e aminopeptidases, além das proteases derivadas de células somáticas (Pinto *et al.*, 2016). No leite estável, a relação entre plasmina ativa e plasminogênio é, na maioria dos casos, de 1:5, além disso, estão presentes também substâncias termolábeis inibidoras de plasmina. Como consequência, o potencial de degradação do sistema plasmina-plasminogênio no leite depende do balanço entre enzima ativa e seus precursores e inibidores (Pinto *et al.*, 2016). Qualquer fator que converta o plasminogênio em plasmina resulta na proteólise da caseína, e proporciona um impacto negativo na funcionalidade da proteína do leite. Os constituintes das células somáticas são capazes de realizar esta conversão (Gaucher *et al.*, 2008).

3.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DO LEITE

A qualidade do leite é influenciada por vários aspectos, como fatores zootécnicos associados à nutrição dos animais, manejo, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenamento do leite (Moura *et al.*, 2017). Com o objetivo de

padronizar a produção de leite e garantir o máximo de qualidade, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) por meio das instruções normativas (IN) de nº 76 e 77, estabeleceu normas de produção e padrões físico-químicos do leite, visando melhorias na qualidade do leite cru e industrializado brasileiro (Brasil, 2018).

Pelas normas da IN nº 76, o leite deve apresentar: pH entre 6,6 e 6,8, acidez entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/mL, estabilidade ao alizarol na concentração mínima de 72% (v/v), densidade relativa entre 1,028 e 1,034 g/mL, teor de gordura de no mínimo 3,0 g/100 g e de proteína total de 2,9 g/100 g, índice crioscópico entre -0,530 °H e -0,555 °H, contagem de células somáticas (CCS) de no máximo 500.000 CS/mL e a contagem padrão em placas (CPP) de no máximo 300.000 UFC/mL (Brasil, 2018). O controle da qualidade do leite que chega à plataforma de recepção das usinas de beneficiamento e nos laticínios, além de ser fundamental para garantir a segurança dos alimentos, norteia a forma de processamento dessa matéria-prima (Ciprandi *et al.*, 2012). Existem alguns testes necessários e obrigatórios, que devem ser realizados no leite, que servem para atestar sua qualidade, determinar possíveis adulterações, uso indevido de antibióticos e se o mesmo está apto para ser processado.

Os testes realizados são: análise de temperatura, análise de índice crioscópico, densidade, teor de gordura, pesquisa de fosfatase e peroxidase, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD), neutralizantes de acidez, pesquisa de agentes inibidores do crescimento microbiano e teste do álcool e alizarol (Brasil, 2018). A qualidade e segurança do leite cru refrigerado estão diretamente associadas à rapidez no resfriamento após a ordenha e à manutenção da cadeia fria até o processamento. A temperatura elevada acelera a multiplicação microbiana, causando fermentação, alteração de sabor, aumento da acidez e perda da qualidade (Tronco, 2010). A IN 76 determina que a temperatura no descarregamento nos laticínios não pode ser superior a 7° C (Brasil, 2018).

O índice crioscópico é a medida do ponto de congelamento do leite. Esse teste é utilizado para identificar adulterações no leite por adição de água, já que a temperatura de congelamento do leite é inferior à temperatura de congelamento da água (devido a lactose e sais minerais presentes no leite). Os valores para o índice crioscópico devem estar entre - 0,530 ° H e -0,555 ° H, equivalente a -0,512 ° C e a -0,536 ° C (Brasil, 2018). A densidade é a relação entre a massa e o volume do leite, e normalmente é medida a 15 °C (Paula *et al.*, 2009). A densidade abaixo do mínimo estabelecido pela legislação, indica a adição de substâncias ao leite, como por exemplo água, pois a densidade do leite fica em torno de 1,028 a 1,035 g/cm³ a 15,5 °C, caracterizando-se por ser mais denso que a água. O leite pasteurizado, de acordo com o conteúdo da matéria gorda, é classificado como integral (mínimo de 3,0g/100 g de gordura),

semidesnatado (0,6 a 2,9g/100 g) e desnatado (0,5g/100 g). Se houver padronização, o teor de gordura do leite pasteurizado deve ser indicado no painel principal do rótulo, independentemente da classificação quanto ao teor de gordura (Brasil, 2018).

A pesquisa de fosfatase e peroxidase é realizada para detectar essas duas enzimas que são utilizadas como indicadores de qualidade térmica no leite; Extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) (parâmetros que indicam a densidade nutricional do leite: valores baixos (abaixo de 8,4%) podem indicar adulteração com água); Neutralizantes de acidez (Não são permitidos em leite, pois: Podem ser tóxicos em certas quantidades, alteram o equilíbrio químico do leite podem formar compostos perigosos), pesquisa de agentes inibidores do crescimento microbiano (presença de antibióticos veterinários (como penicilina, tetraciclina, antissépticos e desinfetantes (como formol, peróxido de hidrogênio, hipoclorito e conservantes como água oxigenada e ácido bórico) e teste do álcool e alizarol que é utilizado para detectar se o leite está instável ou seja, se vai talhar ou coagular durante o processamento térmico (ex: pasteurização) (Brasil, 2018).

As enzimas de maior interesse da indústria láctea são a fosfatase alcalina e a peroxidase, que são utilizadas para controlar o grau de aquecimento do leite, já que são eficientes para indicar se o leite passou pelo processo de pasteurização adequado (Tronco, 2010). A fosfatase alcalina é encontrada geralmente no leite cru e é inativada pela temperatura durante o processo de pasteurização a 72°C por 15 segundos. Portanto, se a enzima estiver presente na amostra de leite pasteurizado, indicará que o leite não passou por um tratamento térmico adequado, podendo ter ocorrido mistura ou contaminação com leite cru (Tronco, 2010). O leite com pasteurização adequada apresentará na análise, resultado positivo para peroxidase e negativo para fosfatase (Koblitz, 2011).

Matéria seca total ou extrato seco total (EST) são todos os compostos do leite exceto a água. Existem três formas para determinar o EST: gravimetria, o método de Ackerman, e tabelas. No método gravimétrico uma amostra de leite é desidratada e o extrato seco é pesado. No método de Ackerman são utilizados os valores da densidade e teor de gordura, que são ajustados no disco de Ackermann; os círculos interno e médio correspondem a densidade corrigida e a porcentagem de gordura. Já as tabelas se baseiam na dependência da matéria seca e da relação entre teor de gordura e densidade. O extrato seco desengordurado (ESD), possui todos os compostos do leite com exceção de água e gordura, podendo variar em função do tipo de alimentação oferecida aos animais (Tronco, 2010).

Os neutralizantes de acidez são empregados para mascarar a acidez produzida pelos microrganismos no leite. Seu uso acarreta alterações nos resultados das análises, podendo

indicar baixa acidez, alto pH e teores mais elevados de sódio e lactato. Já os reconstituintes da densidade são substâncias utilizadas para mascarar a adição de água ou de soro de queijo ao leite, sendo eles o cloreto de sódio, açúcar e o amido (Brasil, 2018).

Agentes inibidores do crescimento microbiano, são produtos químicos adicionados para retardar o crescimento dos micro-organismos ou a ação das enzimas com o intuito de aumentar a conservação do leite. Os principais produtos utilizados são formaldeído, peróxido de hidrogênio, ácido bórico, ácido salicílico, hipocloritos e cloraminas, ácido benzoico e bissulfetos. Estas substâncias podem causar efeitos adversos à saúde, além de prejudicar a produção de derivados do leite (Dias; Antes, 2014). O leite cru refrigerado não deve apresentar substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico (Brasil, 2018).

O teste do alizarol possibilita a determinação rápida e aproximada da acidez do leite por colorimetria. Trata-se de uma combinação do teste do álcool, com uma determinação colorimétrica do pH através do indicador alizarina, permitindo observar de forma simultânea a floculação da caseína e a alteração na coloração devido à mudança do pH (Amorim, 2017). No teste do álcool o leite que apresenta acidez titulável de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL de leite deve ser estável em solução alcoólica com 72% de álcool (Brasil, 2018). Esse teste é realizado na propriedade, antes do carregamento do leite, e avalia a estabilidade das principais proteínas lácteas, as caseínas, que são submetidas à desidratação pelo álcool (Zanela *et al.*, 2018), permitindo analisar a capacidade do leite em suportar elevadas temperaturas sem sofrer precipitação (coagulação) simulando o processo ocorrido na indústria (Machado, 2010).

Além de avaliar a estabilidade térmica, o teste também é considerado um indicador indireto da acidez do leite (Fagnani *et al.*, 2016). Resultados positivos ao teste do álcool, na concentração mínima de 72% podem ocorrer devido principalmente à redução de pH e pela fermentação da lactose por micro-organismos mesófilos com a produção de ácido láctico, sendo considerado um leite ácido. Segundo a legislação, este leite não deve ser transportado para a indústria (Brasil, 2018), no entanto, existem algumas situações em que esse resultado pode ser positivo e não indicar acidez no leite, isso ocorre quando tem-se o leite instável não ácido (LINA). O LINA, mesmo não estando ácido, sofre coagulação da caseína quando passa por processos térmicos como pasteurização e UHT, sendo rejeitado pelos laticínios (Neves, 2021).

3.3 FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DO LEITE

As proteínas do leite têm sua estabilidade máxima quando a temperatura, o pH e o equilíbrio eletrostático estão em seus pontos ótimos, tendendo a precipitar ou coagular quando um ou mais destes fatores estão alterados (Beloti, 2015). A micela de caseína possui grupamentos ácidos (COOH) e básicos (NH₃), com uma predominância de ácidos sobre o grupamento amino. Portanto, a carga resultante é negativa, o que gera repulsão entre as micelas, impedindo a agregação das mesmas. Assim, quando o leite coagula no teste do álcool, é porque a estabilidade da estrutura micelar está fraca, e isso pode ocorrer devido a acidez (contaminação) ou algum desequilíbrio no sistema, como por exemplo, o aumento do cálcio iônico do leite (Martins *et al.*, 2015).

Vários fatores podem interferir na qualidade do leite e modificar sua estabilidade, dentre eles estão a espécie, raça e genética do animal, estágio de lactação, e fatores nutricionais como ajuste da dieta às exigências do animal, concentração de cálcio iônico, fatores ambientais como estresse, estação do ano, manejo, sanidade do rebanho e contaminação bacteriana (Fischer *et al.*, 2011).

3.3.1 *Espécie, raça e genética do animal*

As diferenças genéticas entre as raças bovinas podem modificar a composição e a qualidade do leite produzido; estas diferenças podem alterar a estrutura primária das proteínas e resultar em alterações de suas propriedades físico-químicas (Ximenes; Martins, 2018). Ikonen *et al.* (2004) avaliaram os efeitos genéticos sobre as propriedades de coagulação do leite em mais de 4.600 amostras e concluíram que, com a seleção de animais, o leite possuía alto teor de proteína ou caseína, e isso acarretou efeitos positivos sobre a estabilidade do leite.

Jensen *et al.* (2012) realizaram um estudo com animais da raça Jersey e Holandesa, para avaliar a composição e a estabilidade do leite e verificaram variações nos teores de proteína, minerais, produção de leite e nas propriedades de coagulação, indicando que o leite de vacas Jersey apresentou propriedades de coagulação superiores. A maior capacidade de coagulação do leite de vacas da raça Jersey pode ser explicada, segundo os autores, pelo alto teor de proteína total e da fração de κ -caseína que favorece a ocorrência de coagulação (Jensen *et al.*, 2012).

3.3.2 Estágio da lactação

A estabilidade do leite tende a diminuir no final da lactação, principalmente em função do aumento da permeabilidade das junções firmes da glândula mamária (Rosa *et al.*, 2017). As junções firmes da glândula mamária são estruturas celulares responsáveis por manter a barreira seletiva entre o sangue e a luz alveolar na glândula mamária e com o avanço da lactação (especialmente no período final) essas junções tornam-se mais permeáveis, o que pode: Aumentar o conteúdo de sódio e cloreto no leite, reduzir a lactose, elevar o número de células somáticas e alterar o pH do leite (Martins *et al.*, 2015). A perda da integridade dessas junções está relacionada à redução da síntese e secreção de leite, além de favorecer o aumento do transporte de componentes do sangue para o leite, como enzimas, íons e células somáticas, esse processo compromete a composição e estabilidade físico-química do leite, influenciando negativamente sua qualidade e processamento industrial (Stelwagen; Singh, 2013).

Em um estudo realizado por Stumpf *et al.* (2020), avaliando a permeabilidade das junções firmes da glândula mamária em vacas leiteiras, utilizando o teste do álcool na concentração de 50 a 98% (v/v), foi observado que vacas com estágio de lactação avançado, produziram maior porcentagem de leite instável a 63,2% (v/v). Isso ocorre porque, com o aumento da entrada de eletrólitos do sangue para o leite, podem ocorrer mudanças no equilíbrio salino, causando maior influxo de sódio no leite, havendo diminuição dos níveis de lactose causado pelas alterações da permeabilidade das junções firmes da glândula.

3.3.3 Fatores nutricionais

Fatores nutricionais e metabólicos, como o DCAD (diferença cátion-ânion dietética), influenciam diretamente na estabilidade do leite no teste do álcool e durante o aquecimento a 140 °C, que é diminuída linearmente com a redução de DCAD devido a alterações no equilíbrio iônico do leite e as interações entre as proteínas do leite na micela (Martins *et al.*, 2015). Altas concentrações de ânions podem interferir nas interações entre as proteínas do leite, como a caseína, reduzindo a capacidade delas de formar um gel coeso; além disso o aumento de ânions pode alterar o pH do leite, afetando o equilíbrio ácido-base (Mccarthy *et al.*, 2015). Os sais aniônicos são frequentemente utilizados na alimentação de vacas leiteiras para controlar problemas como a hipocalcemia e melhorar a saúde do animal. No entanto, o uso excessivo

pode ter efeitos colaterais como alterar o equilíbrio eletrolítico no leite e desestabilizar as proteínas, afetando a qualidade do leite (Chowdhury *et al.*, 2017).

A degradabilidade da proteína da dieta também pode interferir na estabilidade do leite. Em um estudo realizado por Martins *et al.* (2019) que avaliaram os efeitos do processamento do milho e da proteína degradável na alimentação de vacas leiteiras, foi observado maiores teores de κ -caseína glicolisada, aumento da produção de leite e do conteúdo de caseína total e maior estabilidade do leite ao álcool em animais alimentados com proteína de baixa degradabilidade em relação aos alimentados com proteína de alta degradação.

Li *et al.* (2014) avaliaram o fornecimento de milho e farelo de soja com diferentes processamentos e observaram modificações nas frações de caseína do leite. Animais que receberam milho em flocos apresentaram maior percentual das frações α 1-caseína e animais que receberam dietas com farelo de soja com tratamento térmico, apresentaram frações de α 2-caseína em maior quantidade. Essas mudanças nas frações de caseína presentes no leite podem interferir na estabilidade da micela, já que amostras de leite instável apresentam maiores valores da fração de β -caseína e menores valores de κ -caseína (Barbosa *et al.*, 2012).

Tanto a α S1 quanto a α S2-caseína estão envolvidas na formação da micela da caseína, enquanto a κ -caseína é crucial para estabilizar essas micelas, permitindo que elas se agreguem durante a coagulação. A κ -caseína tem uma porção hidrofílica que ajuda a manter a solubilidade das micelas no leite (Fox *et al.*, 2004). As interações entre essas proteínas podem afetar a textura, a retenção de umidade e a qualidade final do queijo, além disso alterações na proporção dessas caseínas podem influenciar o rendimento e as características sensoriais do produto final (Delley *et al.*, 2015).

Voges *et al.* (2018) verificaram que a utilização de suplementação volumosa na alimentação dos animais (silagem de milho), além da oferta de pastagens de melhor qualidade, com menor teor de FDN (fibra em detergente neutro), influenciaram na menor ocorrência de leite instável. Marques *et al.* (2010) observaram que vacas submetidas a um alto nível de suplementação (aporte de 80% das exigências energéticas e proteicas) apresentaram maior eficiência na melhoria da estabilidade do leite no teste do álcool, quando comparadas com vacas submetidas a um baixo nível de suplementação proteica (20% da exigência).

A suplementação de vacas em lactação com sal aniônico (cloreto de amônio) pode ocasionar aumento nos teores de Ca^{2+} do leite, pois causa diminuição do pH do leite aumentando os teores de cálcio iônico, causando maior instabilidade do leite no teste do álcool. Por esse motivo a suplementação com sal aniônico deve ser realizada apenas no período seco, e não em fase de lactação (Marques *et al.*, 2011).

3.3.4 Fatores ambientais

A temperatura interfere diretamente na produção de leite das vacas, já que o estresse térmico diminui a ingestão de matéria seca, reduz a ruminação e assim prejudica a absorção de nutrientes. Com isso ocorre redução na disponibilidade de nutrientes usados para a síntese de leite, causando alterações em sua composição que podem comprometer a estabilidade (Marchezan; Fialho, 2013). Além disso, o estresse térmico pode induzir a problemas metabólicos como a acidose ruminal e metabólica, podendo aumentar a concentração de Ca^{2+} do leite (Marques *et al.*, 2011).

Estudos mostram que vacas submetidas ao estresse térmico sofrem modificações da atividade dos canais de K^+ nas membranas apicais das células epiteliais mamárias, causando modificação na passagem de componentes para a glândula mamária, reduzindo a síntese de gordura e proteína e alterações nas propriedades de coagulação do leite no processamento de queijo (Silanikove *et al.*, 2009). Para evitar que os animais sejam expostos ao estresse térmico, as instalações devem ser cuidadosamente planejadas para que possam garantir o máximo bem-estar aos animais, garantindo assim, a eficiência da produção de leite (Brigatti, 2014).

3.3.5 Sanidade do rebanho

Para a indústria de queijos, o leite com elevada CCS representa prejuízos consideráveis, pois a síntese de caseína diminui pela redução na capacidade de síntese e secreção da caseína pelo epitélio glandular que está lesionado pelas toxinas bacterianas decorrentes de processos inflamatórios, como a mastite subclínica ou clínica, essas lesões comprometem a capacidade de síntese e secreção de proteínas, em especial da caseína, o que afeta diretamente o aproveitamento industrial do leite, afetando o rendimento (Mattiello *et al.*, 2018). Apesar dos níveis de proteína total serem mantidos, há um aumento dos teores de nitrogênio não caseico, pelo aumento da concentração de proteínas séricas no leite, diminuindo assim o rendimento na fabricação dos queijos (Fox *et al.*, 2017).

Outra enfermidade que pode afetar a estabilidade do leite é a acidose metabólica. Para suprir a demanda de produção de leite, as dietas das vacas leiteiras são incrementadas com grãos, a chamada dieta concentrada. Porém, esse tipo de dieta provoca um aumento na taxa de produção de ácidos no rúmen, causando excesso na taxa de absorção ruminal e de tamponamento, causando a acidose ruminal (Dionissopoulos *et al.*, 2012). A acidose ruminal

pode causar a acidose metabólica, provocando queda do pH do leite, predispondo o leite a maior instabilidade (Fagnani *et al.*, 2014).

3.4 LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA)

A indústria, visando a qualidade dos produtos lácteos, exige qualidade do produtor, quanto aos aspectos da composição do leite, grau de contaminação e estabilidade do leite (Manske *et al.*, 2021). A perda da estabilidade do leite, que resulta em precipitação no teste do álcool, muitas vezes não é acompanhada de acidez, ocorrendo então o leite instável não ácido, o chamado LINA (Zanela, 2018). O LINA apresenta instabilidade em suas proteínas, e é rejeitado pela indústria de lácteos por não manter sua integridade quando submetido à elevadas temperaturas durante o processamento térmico (Goulart *et al.*, 2019).

O teste do álcool tem como finalidade determinar se a estabilidade térmica do leite é suficiente para suportar os processos na indústria, especialmente para o leite UHT (Manske *et al.*, 2020). As proteínas têm sua estabilidade máxima quando a temperatura, o pH e o equilíbrio eletrostático estão em seus pontos ótimos, tendendo a precipitar ou coagular quando um ou mais destes fatores estão alterados e, esta tendência é detectada pelo teste do álcool (Beloti, 2015). Nesse processo o álcool atua como desidratante, simulando as condições de aquecimento, e, se houver floculação do leite, pode ser um indício de acidez e/ou instabilidade da proteína (Horne, 2016). No teste do álcool, são misturadas partes iguais de leite e de álcool na concentração mínima de 72%, e se ocorrer coagulação, significa que o leite não está apto para o tratamento térmico (Brasil, 2018).

Quando o álcool atua como desidratante, ocorre redução dielétrica do meio, e desta forma, aumento da dissolução de sais e redução da carga negativa de micelas, fazendo com que a precipitação das caseínas seja maior, isto é, quanto mais álcool na solução, mais rápido e visíveis serão os resultados (Fischer, 2011). Assim, quando o leite é submetido ao teste do álcool e perde a estabilidade da caseína, mesmo que mantenha o nível de acidez exigido pela legislação vigente, é considerado como LINA (Fischer *et al.*, 2012). Essa precipitação é associada às alterações na estabilidade das caseínas, às propriedades físico-químicas do leite, como o equilíbrio salino, e a proporção de cátions bivalentes (Fox *et al.*, 2017).

3.4.1 Ocorrência do leite instável não ácido

A ocorrência de LINA tem causa multifatorial, ou seja, existem várias possibilidades que podem originar o leite instável não ácido, porém, não se pode afirmar com precisão a real causa (Faria, 2015). Estudos sobre a ocorrência de LINA vêm sendo realizados em todo o Brasil, e fatores relacionados com a produção de leite, como estação do ano, alimentação, ambiente onde o animal se encontra e a forma de manejo, podem contribuir para a ocorrência do LINA (Zanela *et al.*, 2018).

A incidência de LINA, pode estar relacionada às épocas do ano, ocorrendo especialmente durante as entressafras de pastagens, mas não se limita a isso, já que pode estar associado à dieta alimentar, excesso de cálcio, falta de outros minerais, estágios de lactação e pela genética do animal (Werncke, 2012). Menores índices de ocorrência de LINA foram observados durante o inverno (Marques *et al.*, 2007). A variação na estabilidade da caseína em função da estação do ano pode ser associada a dietas ou pastos ricos em cálcio, com deficiências ou desbalanços minerais (Ca, P, Mg), e a mudanças bruscas da dieta (Martins *et al.*, 2019).

A restrição alimentar, a quantidade e a baixa qualidade nutricional dos alimentos, especialmente os volumosos, podem interferir na síntese de citrato e nos níveis de ureia, cálcio e fósforo no leite, levando a um aumento na instabilidade (Ferrari *et al.*, 2007). A redução no teor de proteína no leite, relacionados com o baixo consumo de matéria seca, falta de proteína degradável e falta de carboidratos não estruturais, podem estar relacionados com a ocorrência do LINA (Martins *et al.*, 2019).

Estudos feitos por Marques *et al.* (2010) concluíram que o rebanho que recebeu alto nível de suplementação alimentar, apresentou maior reação ao teste do álcool, ao contrário do grupo que recebeu um nível baixo de suplemento alimentar. Porém Zanela *et al.* (2006), afirmaram que quanto menor for o suplemento alimentar, maior será a frequência de resultados positivos no teste do álcool, o que também foi observado por Fischer *et al.* (2011), onde afirmam existir influência da alimentação na estabilidade do leite, que é menor quando o rebanho está com restrições alimentares ou em casos de subnutrição. Essa contradição pode ser explicada pela modificação de minerais presentes no leite, já que os mesmos podem alterar a resposta ao teste do álcool (Tronco, 2010).

A incidência de LINA também pode estar relacionada ao ambiente em que os animais estão expostos, pois fatores como mudança de ambiente, isolamento do animal, falta de água, temperatura ambiental inadequada, entre outros fatores relacionados ao bem-estar animal podem gerar estresse, e esta condição de estresse pode ocasionar o LINA (Azambuja *et al.*,

2018). Alterações na estabilidade do leite no teste do álcool têm sido relatadas em vários estados do Brasil, como no Rio Grande do Sul, com resultados positivos para LINA em 55,2% das amostras avaliadas (Marques *et al.*, 2007), em São Paulo em 64,8% (Zanela *et al.*, 2009), 33% no Paraná (Oliveira *et al.*, 2011), 29,03 % em Santa Catarina (Werncke, 2012) e 15,91 % no Rio Grande do Norte (Faria, 2015).

3.4.2 Concentração de cálcio iônico no LINA

A concentração de cálcio iônico (Ca^{2+}) é um dos principais fatores relacionados com a instabilidade da caseína, quando o leite é submetido ao teste do álcool (Neves, 2021). Quando o pH do leite está normal (6,6 - 6,8), as micelas de caseína ficam negativamente carregadas, sendo essas cargas de fundamental importância para sua estabilização em solução; essas cargas são controladas pela quantidade de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio livre (Silva *et al.*, 2019b). Quando aumenta o nível de cálcio total no leite, aumenta a quantidade de íons de Ca^{2+} , causando redução das cargas negativas das micelas, diminuindo a repulsão eletrostática entre elas, causando precipitação (Philippe *et al.*, 2003).

As α e β -caseínas são sensíveis ao Ca^{2+} , já a κ -caseína é estável na presença de Ca^{2+} , pois é uma glicoproteína que possui apenas um grupo fosfoserina em sua estrutura, tendo um papel na estabilidade da micela (Walstra, 1999). Mas, quando aumenta a concentração de Ca^{2+} , ocorre um colapso da camada de κ -caseína, reduzindo a carga da micela, causando a precipitação do fosfato de cálcio (O'Connell *et al.*, 2006). O excesso de cálcio diminui a solubilidade das proteínas em água. O excesso de sais minerais domina as cargas do solvente, representado pela água, diminuindo conseqüentemente o número de cargas disponíveis para se ligarem à proteína (soluto), aumentando a interação soluto/soluto, ocasionando a precipitação das proteínas (Holt, 2004).

3.4.3 Influência do leite instável não ácido na indústria

O leite instável ao teste do álcool, mesmo não estando ácido, sofre coagulação da caseína quando o leite passa por processos térmicos. Esta ocorrência causa prejuízos significativos para a cadeia produtiva do leite, pois a indústria rejeita o LINA, e este é descartado, gerando prejuízos econômicos aos produtores e também à indústria (Rosa *et al.*, 2017). O impacto da incidência do LINA é negativo para todos os envolvidos na cadeia

produtiva do leite, pois o produtor tem prejuízos econômicos ao ter o leite descartado, além da perda dos investimentos realizados na alimentação dos animais, tempo e mão de obra (Azambuja *et al.*, 2018). Para a indústria, o impacto também é negativo, já que sem a matéria prima inicial, não há produção e, por consequência, não há lucro (Marques *et al.*, 2007).

A indústria rejeita o LINA pois ele pode ocasionar impregnação do leite nas placas do pasteurizador, devido à precipitação da caseína, acarretando custos adicionais para a empresa, já que será necessário realizar limpeza e higienização adicional de todos os equipamentos (Rosa *et al.*, 2017). Além do gasto adicional com a higienização, o produto resultante desse processo é um leite gelatinoso, que não é aceito pelos consumidores e acaba sendo perdido (Mendes *et al.*, 2018).

A utilização de leite instável também pode ocasionar prejuízos como menor rendimento no processamento industrial, pois o LINA pode apresentar menores teores de lactose e proteína, comprometendo a produção de alguns derivados (Fischer *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2011) avaliaram a composição e características físico-químicas do LINA e observaram que as amostras positivas ao teste do álcool nos períodos de baixa precipitação, apresentaram menores concentrações de proteína e lactose, quando comparados ao leite estável.

Apesar dos problemas relatados pela literatura utilizando o LINA na indústria, ainda há poucos estudos relacionados com sua utilização para a fabricação de produtos lácteos. Marques *et al.* (2007) afirmam que a composição do LINA é similar ao leite estável, e está de acordo com os padrões da IN 76 e 77, podendo ser utilizado para a fabricação de produtos lácteos (Brasil, 2018). Na produção de queijos e iogurte, em que a coagulação e a formação de géis são necessárias, uma menor estabilidade do leite não prejudica o processo, e o LINA pode ser utilizado para a fabricação desses produtos (Tsioulpas *et al.*, 2007).

Ribeiro *et al.* (2006) avaliando a utilização de LINA e leite estável para a fabricação de iogurte batido, não encontraram diferenças no tempo de fermentação, viscosidade e pH das amostras aos 30 dias, demonstrando que o leite considerado instável ao teste do álcool, pode ser utilizado na fabricação de iogurte. Goulart *et al.* (2019) avaliaram a produção de queijo fresco com leite estável e LINA, e observaram que os parâmetros físico-químicos: pH, acidez, umidade e matéria seca dos queijos não diferiram entre si. Além disso, os autores relataram que o queijo fresco produzido com LINA apresentou rendimento semelhante ao queijo fresco produzido com leite estável.

3.5 QUEIJO

O queijo é um alimento lácteo fermentado, produzido de formas variadas em todo o mundo, e acredita-se que tenha se originado a cerca 8.000 anos, sendo primeiramente formulado com o objetivo de conservar os principais constituintes do leite, e atualmente o queijo é consumido e apreciado pelo seu elevado valor nutricional e sabor característico (Fox *et al.*, 2017). Por sua composição ser rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, o queijo é considerado um alimento nobre (Orlandini *et al.*, 2020). A classificação dos queijos baseia-se em várias características, entre elas, o tipo de leite utilizado, tipo de coagulação, consistência da massa, teor de gordura, tipo de casca e o tempo de cura (Perry, 2004).

Queijo é o produto fresco ou maturado obtido pela separação parcial do soro do leite, leite reconstituído ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas, bactérias específicas, ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de especiarias, condimentos, aditivos, substâncias aromatizantes e corantes. Os queijos podem ser frescos ou maturados; o queijo fresco é o produto que está pronto para o consumo logo após a sua fabricação e o queijo maturado é aquele que passa por reações bioquímicas e físicas necessárias para fornecer as características da sua variedade (Brasil, 1996).

A Portaria nº 146 de 1996, também classifica os queijos de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, recebendo as denominações: extra gordo ou duplo creme: quando apresentam no mínimo 60 %; gordos: quando apresentam entre 45 e 59,9 %; semigordos: quando apresentam entre 25 e 44,9 %; magros: quando apresentam entre 10 e 24,9 %, e desnatados: quando apresentam menos de 10 % de matéria gorda no extrato seco. Segundo a legislação, os queijos também podem ser classificados quanto ao teor de umidade, que pode ser: baixa, média, alta e até muito alta umidade, tendo os queijos de baixa umidade (queijo de massa dura) teores de umidade de até 35,9 %; queijos de média umidade (queijo de massa semidura) umidade entre 36 e 45,9 %; queijos de alta umidade (massa branda ou “macios”), umidade entre 46 e 54,9 % e queijos de muita alta umidade (massa branda ou “mole”) não inferior a 55% (Brasil, 1996).

Na produção de queijos, a atenção principal da indústria baseia-se na qualidade e no rendimento do produto, uma vez que a maximização do aproveitamento da matéria-prima definirá a eficiência produtiva da atividade (Barbosa, 2020). Dessa forma, o rendimento e a

qualidade dos produtos lácteos são dependentes da composição e das especificidades tecnológicas empregadas ao leite, sendo as proteínas os componentes que apresentam maior influência (Brasil, 2015). A fabricação de queijos envolve alguns procedimentos gerais e outros que são específicos para cada tipo de queijo. O leite utilizado na produção de queijos frescos tem, obrigatoriamente, que ser pasteurizado; já para aqueles que passam por um período de maturação antes de serem consumidos (Mínimo 60 dias), o leite pode ser utilizado cru, dependendo do tipo de queijo (Brasil, 2018).

A tecnologia de fabricação de queijos compreende quatro etapas básicas. A primeira etapa é a coagulação do leite, que pode ser feita diretamente pela microbiota do leite, adição de cultivo bacteriano ou coagulação enzimática; após um período de tempo, o leite fermentado transforma-se na coalhada (Rosa *et al.*, 2017). A segunda etapa é o corte da coalhada, para liberação do soro. Na terceira etapa a massa obtida é colocada em formas e prensada, ou não (isso irá depender do tipo de queijo que será fabricado). Na última etapa o queijo é salgado e, em seguida, embalado. No caso de queijos que necessitam de maturação, esta pode ser feita antes ou após a embalagem. Em alguns casos, o queijo é deixado maturar por um certo período, e depois embalado e levado para completar a maturação, e em outros casos o queijo é embalado somente após completar a maturação (Silva, 2005).

3.6 DESNATURAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas e para a fabricação de queijos é necessário provocar a desestabilização dessas proteínas para que ocorra a formação do coágulo (Merheb-Dini, 2010). As proteínas presentes no leite são as caseínas, que são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6 e estão presentes na forma de micelas, cuja principal função é fluidizar as moléculas de caseína e solubilizar cálcio e fosfato (Farrell *et al.*, 2006). A desestabilização da estrutura micelar das caseínas do leite pode ocorrer por acidificação (coagulação ácida) ou por proteólise (coagulação enzimática) (Fox; Brodtkorb, 2008).

Na coagulação enzimática, as micelas de caseína são coaguladas pela ação do coalho, cuja principal enzima é a quimosina. Esse tipo de coagulação é dividida em duas fases: hidrólise da proteína estabilizadora da micela de caseína, a kappa-caseína (κ -cas), agregação, e gelificação das micelas modificadas pelo coalho (Fox *et al.*, 2017). As moléculas de κ -cas

formam a camada superficial da micela de caseína estabilizando esta partícula, essa caseína possui grande sensibilidade à quimosina, sendo hidrolisada quando se adiciona o coalho ao leite. A hidrólise ocorre especificamente na ligação entre os aminoácidos fenilalanina na posição 105 (Phe105) e metionina na posição 106 (Met106) (Fox; Brodtkorb, 2008).

Após a hidrólise da κ -cas, a região N-terminal da molécula, chamada de para- κ caseína se mantém ligada à micela, enquanto a região C-terminal, ou o glicomacropeptídeo (também conhecido como caseinomacropeptídeo) é liberado no soro (Walstra, 1999). Esse peptídeo liberado da micela é hidrofílico e altamente carregado eletrostaticamente, conferindo estabilidade às micelas por repulsão eletrostática, impedindo que se agreguem. Além disso, esse peptídeo se projeta na superfície da micela e contribui com a estabilidade coloidal por meio de repulsão estérica (Dalglish, 2011).

Queijos produzidos por coagulação enzimática representam cerca de 75% do total de queijos produzidos no mundo, e incluem o Muçarela, Prato, Minas Frescal, Emental, Gorgonzola, Camembert, Provolone, Parmesão, entre outros (Fox *et al.*, 2017). Alguns queijos feitos com coagulação enzimática podem ser consumidos ao final da fabricação, e outros são maturados por períodos que podem variar de 3 semanas a mais de 2 anos, sendo a duração da maturação inversamente relacionada ao teor de umidade da variedade do queijo (Khattab *et al.*, 2019).

Os géis obtidos tanto por coagulação ácida quanto por coagulação enzimática são estáveis cineticamente se não sofrerem nenhuma perturbação, mas ao quebrá-los, a rede de caseínas se contrai e expulsa a fase aquosa do gel, o soro. Esse processo, conhecido como dessoragem, permite o controle do teor de umidade e dos parâmetros microbiológicos e bioquímicos do queijo (Walstra, 1999). Após a dessoragem, o queijo (dependendo de sua variedade) é salgado com a finalidade de aumentar sua conservação e melhorar as suas propriedades sensoriais (Fox *et al.*, 2017).

3.7 QUEIJOS DUROS TIPO GRANA

Os queijos duros tipo grana têm origem na Itália, no vale do Pó, e são fabricados desde 1.200 d.C. (Dutra, 2017). São divididos em dois grandes tipos de queijos duros, ambos elaborados com leite bovino e de renome mundial: o *Grana Padano* e o *Parmigiano Reggiano* (Furtado, 2017). A denominação *Parmigiano* deu origem aos termos: Parmesão, *Parmesan* e *Parmesano*, que são utilizadas no mundo inteiro, já que as denominações *Parmigiano*

Reggiano, bem como *Grana Padano*, possuem proteção internacional, e só podem ser usadas dentro dos estritos limites geográficos determinados pela lei italiana, em consonância com outras exigências legais referentes ao processo de elaboração (Furtado, 2011b).

Uma das características dos queijos Grana italianos é a sua textura, conhecida por “Grana”, que se apresenta quando a peça é quebrada ao meio. Essa textura é resultado do período de maturação, que pode chegar a dois anos, além de outros fatores como a consistência do coágulo, tamanho do grão no corte, teores de umidade e gordura da massa (Furtado, 2011a). Os queijos duros tipo grana produzidos no Brasil consistem em uma adaptação dos queijos Grana italianos, o *Parmigiano Reggiano* e *Grana Padano*, que embora sejam fabricados em grande escala no país, com raras exceções, distanciaram-se do modelo original italiano, não só quanto às características de sabor, aroma e textura, mas também em relação ao tamanho, sendo normalmente fabricados em formas de 4 a 7 kg, em contraste com os 35 kg em média, observados nos queijos originais italianos (Furtado, 2011b).

De acordo com Portaria MA - 353, de 04/09/1997, o queijo duro tipo grana é um produto obtido pela coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas, podendo ter umidade máxima de 35,9 % (m/m), quando completamente maturado, classificado como semigordo com 25 a 44,9 % (m/m) de gordura no extrato seco (GES), feito com massa pré-cozida e prensada. Seu tempo de maturação deve ser de no mínimo seis meses, podendo ultrapassar dois anos. Possui consistência dura e textura compacta, granulosa, com crosta firme, lisa e sem olhaduras; sua cor é ligeiramente amarelada e sabor levemente picante e salgado. Seu odor é suave, agradável e característico, devendo ser armazenado em temperatura não superior a 18 °C, com formato cilíndrico podendo pesar entre 4 e 8 kg (Brasil, 1997).

O método de fabricação do queijo duro tipo grana no Brasil difere do modelo tradicional italiano, sobretudo quanto ao tipo de leite utilizado. Nos queijos italianos, como o *Parmigiano Reggiano* e o *Grana Padano*, a legislação exige o uso exclusivo de leite cru bovino, proveniente de vacas alimentadas sob normas específicas, respeitando rígidos critérios de qualidade. Já no Brasil, a produção do queijo tipo grana pode utilizar diferentes formas de leite, como: Leite cru bovino, leite pasteurizado ou leite reconstituído (proveniente de pó de leite ou concentrado) (Brasil, 2018). Essa flexibilidade impacta diretamente nas características sensoriais, estruturais e microbiológicas do produto final, podendo resultar em queijos com perfis diferentes dos tradicionais italianos, tanto em textura e sabor, quanto em qualidade de maturação e valor agregado (Fox *et al.*, 2017). No Brasil, faz-se a padronização da gordura do leite, enquanto para a fabricação do *Grana Padano* e *Parmigiano Reggiano* italianos se faz o

desnate natural, conhecido como processo de *affioramento*, no qual o leite passa por um prolongado repouso, e a gordura em suspensão (devido à sua menor densidade em relação aos demais componentes), tende a separar-se, formando uma camada espessa de creme na parte superior do leite, que é retirada (Furtado, 2011a; Neviani *et al.*, 2013).

O queijo duro tipo grana é produzido com leite semidesnatado, onde o teor de gordura impacta bastante na textura. Normalmente trabalha-se com leite com teor de gordura variando de 2,1 a 2,3 % (m/v). Para padronização dos queijos, trabalha-se com a relação gordura/caseína, fixando-a para o ano todo. Essa relação não deve ser superior a 0,9-1,0, o que indica, para um leite com 2,3 % de caseína, um teor de gordura entre 2,2 e 2,3 % (m/v) (Furtado, 2011a). Durante o processamento, a temperatura da coagulação é de 35 °C e atinge 54 °C durante o cozimento. As bactérias ácido-láticas termofílicas *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, desenvolvem-se e permanecem viáveis após este estágio, dentro da coalhada, inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas e outros microrganismos indesejáveis (Monfredini *et al.*, 2012).

Após a salga e a secagem, se inicia o processo de maturação do Parmesão, que deve ter uma duração mínima de seis meses, sendo esta etapa importante para o desenvolvimento do sabor, conservação e características finais do produto. A temperatura de conservação deverá ser de 10 a 15 °C, realizando a viragem periódica dos queijos para que a maturação ocorra de forma homogênea (Brasil, 1997). As bactérias ácido-láticas termofílicas produzem enzimas que atuam sobre a lactose, gordura e nas proteínas presentes no leite durante o período de maturação, e isso potencializa os atributos sensoriais de textura, aroma e sabor, que são característicos desse tipo de queijo; além disso também auxilia na estabilidade físico-química e no desenvolvimento das características do queijo Parmesão (Barros *et al.*, 2011).

A legislação exige que o queijo duro tipo grana seja maturado pelo tempo necessário para que sejam obtidas as suas características específicas, e esse tempo deve ser de pelo menos seis meses para queijos de 4 a 10 kg de peso, 8 meses para queijos entre 10 e 20 kg e 12 meses para os queijos de mais de 20 kg (Brasil, 1997). A composição do queijo duro tipo grana combinada com condições ambientais presentes na fase de maturação (temperatura e umidade) podem favorecer o desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície do produto, e isso é indesejável já que reduz consideravelmente sua qualidade, pois esses fungos produzem micotoxinas no queijo, tornando-o impróprio para o consumo humano (Reps, 2002).

Na fase de maturação é comum serem observadas micro trincas na casca do queijo, e isso contribui para a entrada e a proliferação de fungos (Paula *et al.*, 2009). Para solucionar esse problema são adotadas algumas medidas para a prevenção dessas rachaduras no queijo, como

por exemplo a utilização de óleos, principalmente de linhaça ou algodão, que são aplicados na superfície das peças, para reduzir as micro rachaduras e consequentemente a contaminação pelos fungos (Souza, 2014). Por ter casca dura, o queijo duro tipo grana dispensa embalagem se for comercializado a peça inteira, porém, se o queijo for comercializado ralado ou em fatias, ele deve ser embalado, preferencialmente com embalagens a vácuo, utilizando películas de plástico para evitar a oxidação da gordura do produto. Após a embalagem, os queijos devem ser mantidos sob refrigeração para inibir o desenvolvimento de microrganismos e aumentar o seu tempo de prateleira (Brasil, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual de Ponta Grossa, na Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais (ETLQueijos). O leite estável (LE) e LINA utilizados como matéria prima para a elaboração dos queijos foram provenientes de vacas da raça Holandesa e mestiças da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, localizada na estrada Ponta Grossa/Itaiacoca, km 07.

Para obter o LINA foram coletados 50 mL de leite de cada vaca, antes da ordenha matinal de rotina. As amostras foram submetidas ao teste do álcool 72, 74 e 76 %, e as que mostraram grumos no leite nessas concentrações alcoólicas, foram consideradas positivas para LINA.

Os reagentes, cultura láctea, formas e equipamentos utilizados para a fabricação dos queijos e demais análises foram provenientes do Programa de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Estadual de Ponta Grossa (PROAP-UEPG), dos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (CTA), Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU), Fundação ABC e Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos (LACQSA) da Universidade Federal do Paraná.

4.1 ANÁLISES DO LEITE

Foram realizadas as seguintes análises nas amostras de LE e LINA:

4.1.1 *Teste do álcool nas concentrações 72, 74 e 76% (v/v)*

O teste do álcool foi realizado por meio da mistura de partes iguais de leite e solução alcoólica (2 mL) em uma placa de Petri com fundo escuro, o que facilita a observação do resultado. O leite utilizado foi refrigerado a 7 °C, conforme recomendado para a preservação de suas características físico-químicas. A interpretação do teste seguiu os seguintes critérios: Resultado positivo: ocorreu precipitação da caseína, evidenciada pela formação de grumos ou flocos visíveis, indicando instabilidade proteica do leite; Resultado negativo: ausência de precipitação, caracterizando leite estável ao álcool e, portanto, adequado ao processamento térmico. Para estabelecimento do nível de instabilidade, foi repetido o teste utilizando diferentes

concentrações de álcool, 72, 74 e 76 %. O nível de instabilidade foi definido como a menor concentração de álcool necessária para se obter resultado positivo (precipitação) (Zanela *et al.*, 2018).

4.1.2 Teste do Alizarol

O teste do alizarol foi realizado pela mistura de partes iguais de leite e de solução alcoólica contendo o indicador de pH alizarina (*1,2-dihidroxiantraquinona*) em volume total de 2 mL, utilizando-se uma placa de Petri com fundo escuro para melhor visualização do resultado. O leite estava previamente refrigerado a 7 °C, conforme os padrões recomendados (Brasil, 2018). A interpretação dos resultados foi feita com base nas alterações de cor e formação de grumos, de acordo com a Instrução Normativa nº 76/2018 (Brasil, 2018): Cor vermelho-tijolo, sem grumos: leite com acidez normal e estável à solução alcoólica a 72% v/v; Cor vermelho-tijolo, com grumos: leite com acidez normal, porém instável à solução alcoólica a 72% v/v, caracterizando um caso de Leite Instável Não Ácido (LINA); Cor amarela ou marrom claro, ambas com grumos: leite com acidez elevada e instável à solução alcoólica a 72% v/v e cor lilás a violeta, com ou sem grumos: leite com reação alcalina, sugerindo possível presença de neutralizantes ou ocorrência de mastite (Brasil, 2018).

4.1.3 Acidez titulável em graus Dornic

Para cada amostra de leite, foi transferido 10 mL de leite em um erlenmeyer e adicionado três gotas de fenolftaleína a 1% e submetido a titulação, com a solução de NaOH N/9. Cada 0,1 mL de NaOH N/9 gasto na escala do acidímetro de Dornic correspondeu a 1 ° D (0,01 % de ácido láctico) (Brasil, 1981).

4.1.4 Estabilidade térmica

Foi pipetado 2 mL de leite em um tubo de ensaio e, com o auxílio de um bico de Bunsen foi realizada a cocção da amostra de leite até levantar fervura três vezes. Após este procedimento, a amostra fervida foi colocada em uma placa de Petri onde foi verificada a presença de grumos. Na presença de grumos a amostra foi considerada positiva para LINA ao teste, do contrário, a amostra foi considerada negativa (Brasil, 2006).

4.1.5 Contagem Bacteriana total e contagem de células somáticas do leite

A contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) foi realizada pelo laboratório da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) por contagem em contador eletrônico pela citometria de fluxo (Marca Bentley, modelo Somacount FC).

4.1.6 pH

Foi medida a atividade de íons hidrogênio na amostra utilizando um pHmetro de bancada. As calibrações foram realizadas com soluções ácida (pH 4,0), alcalina (pH 10,0) e neutra (pH 7,0) (Brasil, 1981). O resultado foi obtido por leitura direta no aparelho da marca SIMPLA, modelo PH 140.

4.1.7 Cálcio total e cálcio iônico (Ca^{2+})

A determinação do cálcio total foi realizada por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado (Marca Spectro, modelo Arcos (SOP)) seguindo os métodos adotados pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O cálcio iônico foi determinado por potenciometria (Barros *et al.*, 2011). O potenciômetro utilizado foi da marca THERMO ORION, com um eletrodo de íon seletivo para cálcio e outro eletrodo de referência, com leitura direta em g/L. Para a sensibilização dos eletrodos mergulhou-se por no mínimo 4 horas em solução de Ca^{2+} padronizada (10^{-2} M ou 100 ppm).

Para calibração dos eletrodos utilizaram-se soluções padronizadas preparadas nas seguintes concentrações, a partir de: 0,1 M Ca = 4 g/L Ca; 0,01M Ca = 0,4 g/L Ca e 0,001M Ca = 0,04 g/L Ca. Em 10 mL de cada solução foi adicionado 0,2 mL de ISA (*Ionic strenght adjustor*) solução de ajuste iônico de KCl. 10 mL de leite e 0,2 mL de ISA foram homogeneizados e posteriormente imersos dos eletrodos na amostra. As análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

4.1.8 Proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais, foi utilizado o método Kjeldahl utilizando o fator de conversão de 6,38 (equação 01), de acordo com a AOAC (2016), onde:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{K \times V \times \text{Fator} \times 6,38}{P} \quad (01)$$

Onde:

$K = Fc \times 0,0014 \times 100$

Fc = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N

P = massa da amostra em gramas

V = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação

4.1.9 Teores de gordura (%), lactose (%) e densidade (g/mL)

Uma amostra de 10 mL de leite foi coletada para avaliar o teor de gordura, lactose e densidade, através do Analisador de Leite Master Classic AKSO®.

4.1.10 Extrato seco total (%) e extrato seco desengordurado (%)

O extrato seco total (%) e extrato seco desengordurado (%) do leite foram analisados segundo a metodologia de Brasil (2006).

4.1.11 Condutividade elétrica

Para a realização do teste de condutividade elétrica (CE), foi utilizado aproximadamente 60 mL de leite. As amostras foram submetidas à leitura no analisador ultrassônico de leite da marca Entelbra, modelo Lactoscan SA, sendo os resultados mensurados e expressos por miliSiemens (mS) (Souza *et al.*, 2019).

4.1.12 Índice crioscópico

O índice crioscópico foi medido no Crioscópio Eletrônico ITR (Brasil, 2006); ambas as análises foram realizadas na Fundação ABC, na cidade de Castro/PR.

4.2 PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS

A produção do queijo duro tipo grana foi realizada na planta piloto da Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais (ETLQueijos), pertencente ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), conforme o fluxograma apresentado na figura 2. Foram feitas duas bateladas de queijos com LE e duas bateladas de queijos com LINA.

Foram realizadas duas bateladas para cada tipo de leite (padrão e LINA), a fim de avaliar o efeito da adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) na coagulação e no desempenho tecnológico do leite. Para o leite padrão, a primeira batelada foi produzida com a adição de 50 mL de solução de CaCl_2 a 50% por 100 litros de leite (Formulação padrão utilizada na ETLQueijos), a segunda batelada foi produzida sem a adição de CaCl_2 . Para o leite classificado como LINA (Leite Instável Não Ácido), a primeira batelada foi elaborada com a adição de 40 mL de solução de CaCl_2 a 50% por 100 litros de leite (Formulação padrão da ETLQueijos), a segunda batelada, igualmente, foi preparada sem adição de CaCl_2 .

Os queijos com LINA e LE foram produzidos em dias diferentes devido a disponibilidade dos equipamentos da planta de queijos e a disponibilidade do LINA. Na linha de produção do queijo 72 litros de leite LINA com 3,0 % de gordura, pH 6,71, e 76 litros de leite estável com 3,0 % de gordura, pH 6,8, foram submetidos a pasteurização lenta (63 °C por aproximadamente 30 minutos) e resfriados até atingir 35°C. Em seguida foram distribuídos em dois tanques (36 litros de LINA e 38 litros de leite estável em cada tanque).

Em um dos tanques contendo LINA, foram adicionados 14,4 mL de solução 50% de CaCl_2 , e em um dos tanques contendo LE, adicionou-se 15,6 mL de solução 50% de CaCl_2 . Em seguida foram adicionadas nos dois tanques a cultura láctea/fermento (*S. thermophilus* + *L. helveticus* + *L. bulgaricus*, CHR Hansen®) seguindo indicação do fabricante (0,54 g no LINA e 0,6 g no LE). Após esse tempo foi adicionado o coalho líquido (CHR Hansen® (32,4 mL no LINA e 35 mL no LE) em temperatura de 32 ° C com tempo de coagulação de 40 minutos.

Após a formação da coalhada, a massa foi cortada em grãos com 0,5 cm. A primeira mexedura foi realizada sem aumento da temperatura e na primeira dessoragem foi retirado 40% do soro. O primeiro aquecimento foi lento, até 45 °C por aproximadamente 15 min (1 °C a cada 3 minutos). O segundo aquecimento foi feito até 50 °C, até que os grãos atingiram o ponto (grão mais duros, bem dessorados e brilhantes), não ultrapassando 53-54 °C. Na segunda dessoragem foi retirado o restante do soro e realizada a pré-prensagem da massa no tanque.

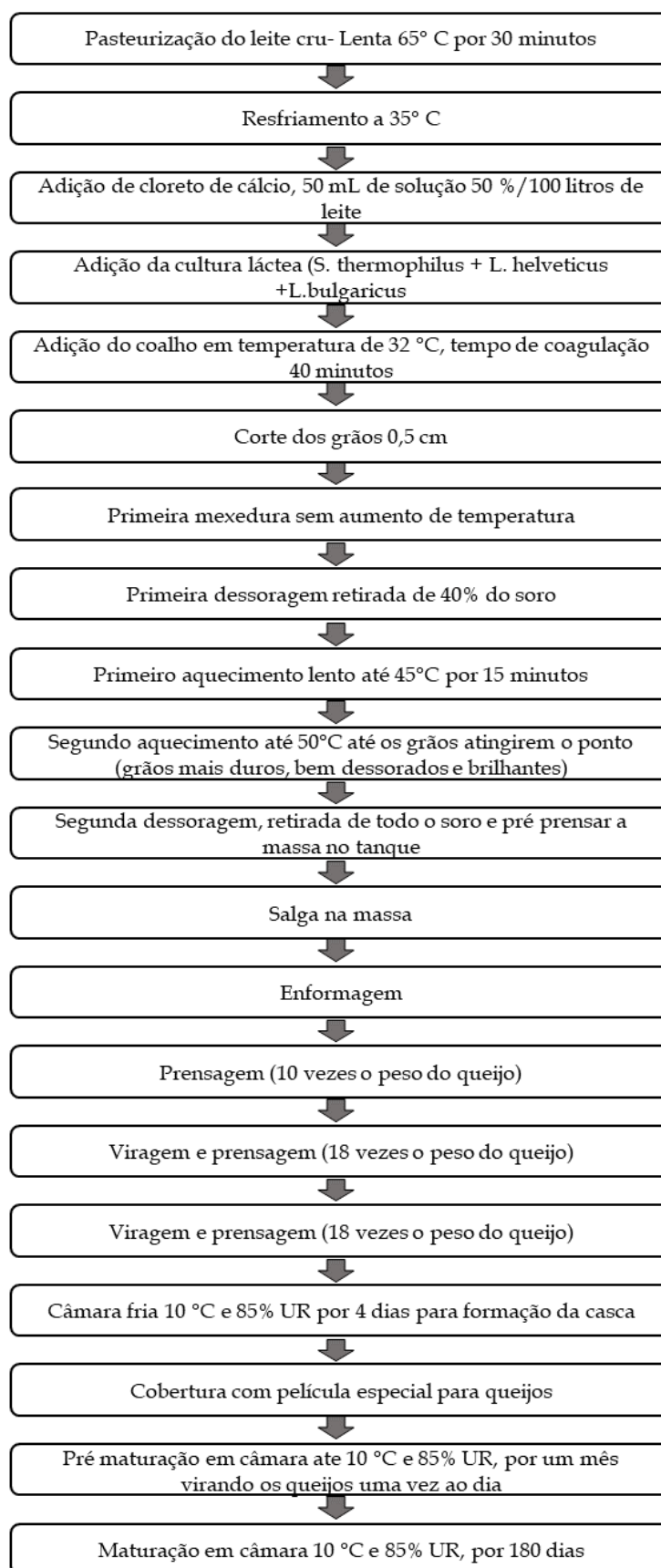
A salga foi feita na massa, utilizando 300 g de NaCl/100 L de leite, totalizando 108 g de sal na massa de queijo feito com LINA e 114 g de sal na massa de queijo feito com LE. Após a salga, a massa foi enformada em formas de 1,5 kg cada com 15 cm de diâmetro e 15 cm de altura. Após enformagem, foi realizada a prensagem (10 vezes o peso do queijo) durante 2 horas, após a prensagem foi feita a viragem e a prensagem (18 vezes o peso do queijo) por 4 horas, após esse tempo foi feita nova viragem e prensagem (18 vezes o peso do queijo) por 18 horas. Após esse processo, os queijos seguiram para a câmara fria 10 °C/85 % UR por 4 dias para formação da casca. Após a formação da casca os queijos foram cobertos com cobertura Cobertura vinílica para queijos Lacto-Lab, com natamicina 1200 mg/kg (Figura 1). Os queijos foram pré-maturados em câmara com 10 °C e 85% de umidade relativa, por 30 dias, virando o queijo 1 vez ao dia. Após esse período os queijos completaram a maturação sem necessidade de viragem. O tempo total de maturação foi de 180 dias.

Figura 1- Queijos cobertos com película especial durante a maturação.



Fonte: A autora.

Figura 2- Fluxograma da fabricação dos queijos.



Fonte: A autora

4.3 ANÁLISES DOS QUEIJOS

Os queijos foram avaliados a cada 30 dias, durante o tempo de maturação (dias 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), quanto aos parâmetros de umidade, cinzas, proteínas, gordura, pH, acidez titulável, nitrogênio total, cálcio total, rendimento, parâmetros microbiológicos, atividade da água, cor, textura, índices de maturação (extensão e profundidade da proteólise). Para a amostragem, os queijos foram fracionados em partes que englobaram casca e centro. A análise sensorial foi realizada após 180 dias de maturação, onde os queijos foram fracionados em cubos utilizando somente o centro.

4.3.1 Análises físico-químicas

O teor de umidade foi mensurado pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105 °C e o percentual de cinzas em mufla a 550 °C de acordo com Brasil (2006). O percentual de gordura foi determinado pelo butirômetro de Gerber, conforme descrito por IAL (2008). O pH foi medido pelo método potenciométrico (Marca Simpla, modelo PH 140) e a acidez titulável, expressa em ácido láctico (% m/m), conforme descrito por Brasil (2006).

O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método Kjeldahl, usando o fator de conversão de 6,38 para o cálculo da proteína total (Brasil, 2006). A atividade de água foi determinada a 25 °C por medida instrumental em equipamento Aqualab série 3 (modelo TE, Decagon Devices), como citado por Cichoski *et al.* (2008). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Cálcio total

A determinação do cálcio total nos queijos foi realizada por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado (Marca Perkin Elmer, modelo Optima 3000 DV) seguindo os métodos adotados pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.3.3 Rendimento

O rendimento dos queijos foi calculado após a produção, relacionando a massa de queijo produzida em relação à 100 litros de leite (kg queijo/100 litros de leite) (equação 02).

$$\text{Rendimento (kg queijo/100 litros de leite)} = \frac{\text{massa de queijo obtida}}{\text{massa de leite utilizada}} \quad (02)$$

4.3.4 Análises microbiológicas

A qualidade microbiológica dos queijos foi avaliada no início e no final do tempo de maturação (180 dias) acordo com metodologia descrita por APHA (2001). Foram avaliadas a presença de *E.coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

4.3.5 Índices de maturação

Para a avaliação da proteólise foram realizadas análises periódicas de nitrogênio total (NT) conforme Brasil (2006), nitrogênio não proteico em TCA 12 % (NNP) e nitrogênio não caseinoso pH 4,6 (NNC) de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1995). Com a realização das análises de NT, NNP e NNC, foram calculados o índice de extensão de proteólise e o índice de profundidade de proteólise. As análises foram realizadas em triplicata. Os índices foram calculados conforme as equações 03 e 04 (Wolfschoon, 1983; Pizaia, 2003; Andreatta, 2006):

$$\text{Índice de extensão da proteólise (\%)}: \quad (03)$$

$$\text{IEP} = \frac{\text{NNC}}{\text{NT}} \times 100$$

$$\text{Índice de profundidade da proteólise (\%)}: \quad (04)$$

$$\text{IPP} = \frac{\text{NNP}}{\text{NT}} \times 100$$

4.3.6 *Análise de cor*

A cor do centro do queijo foi avaliada durante a maturação utilizando o colorímetro MiniScan EZ (Hunter Lab, Reston, Virgínia, EUA), considerando os parâmetros L^* , a^* e b^* . Foram calculados o Croma e ângulo Hue ($^\circ$ Hue) de acordo com Judacewski *et al.* (2016).

4.3.7 *Análise de textura*

O perfil de textura das amostras foi avaliado no texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, Reino Unido) usando o probe cilíndrico P36/R. As amostras foram cortadas nas dimensões de 20 mm x 20 mm (diâmetro $\times$ altura), e submetidas à compressão dupla a 30% da altura original, com velocidade de teste de 0,8 mm/s, a 20 $^\circ$ C (Bertolino *et al.*, 2011). Os parâmetros considerados foram dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e resiliência.

4.3.8 *Análise Sensorial*

A análise sensorial foi realizada ao final do período de maturação (180 dias), no laboratório de análise sensorial do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, mediante aprovação do Comitê de Ética de Pesquisas com Seres Humanos (6.114.924). Compareceram 106 avaliadores não treinados entre estudantes, funcionários e pessoas que tiveram disponibilidade para participar da análise. Ao chegar ao laboratório cada avaliador foi orientado a apontar a câmera do seu celular para um QRcode, o qual era direcionado ao termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa e ao questionário (APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E QUESTIONÁRIO SENSORIAL), ambos respondidos utilizando o celular de cada avaliador.

Os avaliadores foram direcionados para cabines individuais sob luz branca em temperatura ambiente (aproximadamente 25 $^\circ$ C). Todos os participantes responderam perguntas quanto a idade, gênero, grau de escolaridade, região de residência, renda familiar, frequência de consumo de queijo duro e locais de compra do queijo. Além disso também responderam quanto às características dos queijos utilizando a escala hedônica, escala do ideal e intenção de compra. Quatro amostras de queijo duro tipo grana foram disponibilizadas em

copos plásticos descartáveis de 50 mL, cortadas em cubos de aproximadamente de 2 cm, codificadas com números aleatórios de 3 dígitos, sendo os códigos: 145, 204, 256 e 301 correspondentes às formulações LE com CaCl₂ (queijo produzido com leite estável com adição de CaCl₂), LE sem CaCl₂ (queijo produzido com leite estável sem adição CaCl₂), LINA com CaCl₂ (queijo produzido com LINA com adição de CaCl₂) e LINA sem CaCl₂ (queijo produzido com LINA sem adição de CaCl₂), respectivamente. Todos os avaliadores receberam um copo de água para limpar o paladar entre as amostras.

Para avaliar o índice de aceitabilidade (IA) dos queijos, foi utilizada a equação 05 (Dutcosky, 2019):

$$IA (\%) = A \times 100/B \quad (05)$$

Onde:

A= Nota média obtida para o produto

B= Nota máxima dada ao produto

Para avaliação dos atributos de impressão global e sabor, foi utilizada a escala hedônica de 9 pontos (1= Desgostei extremamente, 2= Desgostei muito, 3= Desgostei moderadamente, 4= Desgostei ligeiramente, 5= Indiferente, 6= Gostei ligeiramente, 7= Gostei moderadamente, 8= Gostei muito e 9= Gostei extremamente). Para avaliar a maciez e a acidez dos queijos, foi utilizada a escala do ideal de 5 pontos (1= Abaixo do ideal, 2= Pouco abaixo do ideal, 3= Ideal, 4= Pouco acima do ideal e 5= Acima do ideal) (Dutcosky, 2019).

Foram levantados atributos que correspondem a características sensoriais do queijo duro tipo grana pela equipe de pesquisa, baseada nas características dos queijos duros tipo grana comerciais, sendo elas: cor amarela, massa homogênea, odor adocicado, odor picante, odor de manteiga, sabor adocicado, sabor característico de queijo duro, sabor amanteigado, gosto residual ácido, gosto ácido, gosto doce, gosto amargo, dureza, gorduroso, textura granular. Esses atributos foram disponibilizados na ficha sensorial para os avaliadores realizarem o teste RATA (*Rate All That Apply*) (Apêndice A) no qual os mesmos assinalaram todos os atributos que perceberam nas amostras, e atribuíram notas de 1 a 9 para avaliar a intensidade de cada atributo percebido em cada amostra, sendo 1= Extremamente fraco, 2= Muito fraco; 3= Moderadamente fraco; 4= Ligeiramente fraco; 5= Neutro; 6= Ligeiramente intenso; 7= Moderadamente intenso; 8= Muito intenso e 9= Extremamente intenso.

Para avaliar a atitude do consumidor em uma situação hipotética de compra dos queijos, foi utilizada uma escala de intenção de compra de cinco categorias, com os termos: decididamente eu não compraria= 1, provavelmente eu não compraria= 2, talvez sim/talvez

não= 3, provavelmente eu compraria= 4 e decididamente eu compraria= 5 (Dutcosky, 2019). Todos os dados obtidos foram tabulados em planilhas no Excel.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, sendo realizado teste de Levene para avaliar sua homogeneidade, considerando paramétrico o valor de $p > 0,05$. Em seguida, os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), considerando valor de $p \leq 0,05$, complementada com o teste de comparação de médias de Fischer LSD, considerando um valor significativo de $p < 0,05$. As amostras de leite estável e LINA foram avaliadas pelo Teste t de Student ($p < 0,05$). Os dados da análise sensorial foram analisados pela análise de variância (ANOVA), considerando valor de $p \leq 0,05$, complementada com o teste de Tukey e Soccoott- Knott, considerando um valor significativo de $p < 0,05$. Os dados das análises físico-químicas e microbiológicas do leite e dos queijos foram analisados pelo software Statistica StatSoft 10 e os dados obtidos na análise sensorial, foram analisados pelo software estatístico SASM-Agri e XLStat.

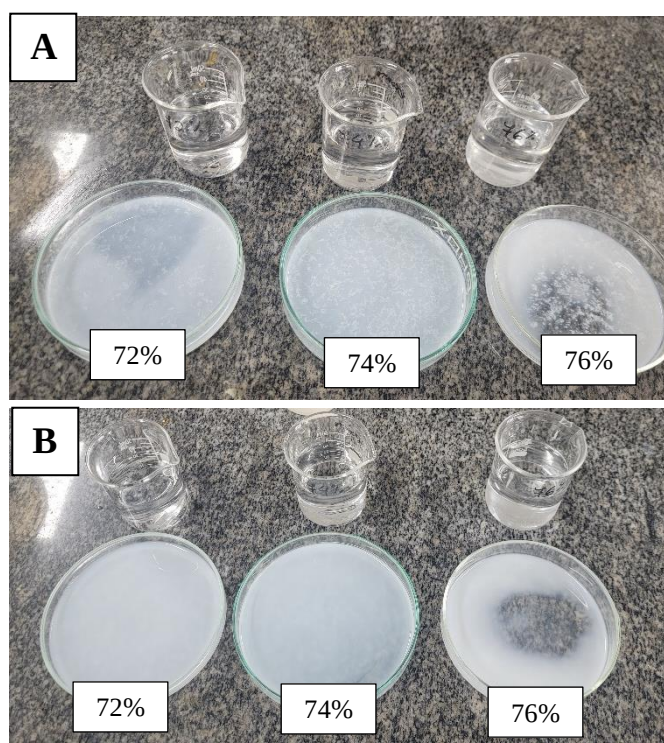
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DO LEITE

5.1.1 Teste do álcool nas concentrações 72, 74 e 76% (v/v), teste do alizarol, acidez titulável e estabilidade térmica

Nas amostras LINA foi observado resultado positivo para o teste do álcool nas concentrações 72, 74 e 76 %, pois apresentou grumos (Figura 3 A). Já para as amostras de leite estável (LE), o resultado foi negativo nas mesmas concentrações de álcool, não apresentando grumos (Figura 3 B).

Figura 3- Teste do álcool positivo (A) nas concentrações 72, 74 e 76 %, leite caracterizado como LINA. Teste do álcool negativo (B) nas concentrações 72, 74 e 76 %, leite caracterizado como estável.



Fonte: A autora.

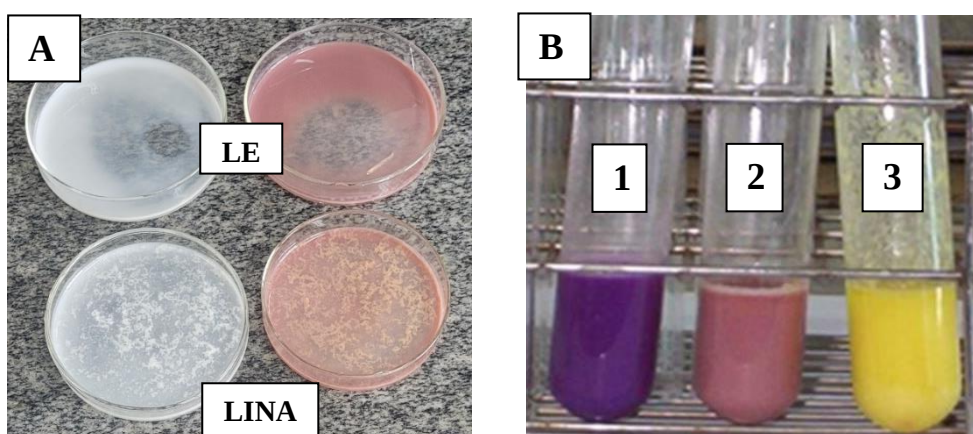
O teste do álcool tem a finalidade de pré-determinar se a estabilidade térmica do leite é suficiente para suportar o processamento, como a pasteurização e o processo de *ultra high temperature* (UHT), pois são processos que exigem que o leite seja submetido ao aumento de temperatura. As proteínas possuem estabilidade máxima quando o pH, temperatura e o

equilíbrio eletrostático estão em seus pontos ótimos, podendo coagular e/ou precipitar quando um ou mais fatores mencionados estiverem alterados, e estas alterações são detectadas pelo teste do álcool (Beloti, 2015).

O leite instável não ácido (LINA) é classificado como sendo aquele que se apresenta instável (precipitação da caseína) na presença do álcool a 72 % sem apresentar acidez titulável acima de 18 °D (Zanela *et al.*, 2018), ou seja apresenta perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool, com precipitação dessa proteína, porém, sem haver acidez elevada no leite. A perda da estabilidade da fração proteica do LINA pode estar relacionada com um desequilíbrio no sistema, como por exemplo, o aumento do cálcio iônico do leite, que reduz as cargas negativas das micelas de caseína e causa repulsão eletrostática, diminuindo a resistência durante o contato com o álcool ou durante os tratamentos térmicos (Martins *et al.*, 2015).

Complementar ao teste do álcool nas propriedades leiteiras, antes do carregamento do leite, é realizado o teste do alizarol, que consiste no mesmo princípio do teste do álcool, porém, com um indicador de pH, alizarina, que de forma indireta indica em qual faixa de pH o leite se encontra. A figura 4 (A) mostra os resultados para o teste do álcool e alizarol realizadas nesse trabalho, sendo as amostras na parte superior da figura correspondentes ao LE e as na parte inferior correspondentes ao LINA. A Figura 4 (B) mostra como o teste indica um leite alcalino (1), normal (2) e ácido (3). Pode-se perceber que ambas as amostras dos leites utilizados nesse trabalho se encontravam sem acidez elevada, pois apresentaram coloração vermelho tijolo.

Figura 4- Teste do alizarol (A) nas amostras de LE e LINA, e (B) colorações características para leite alcalino (1), leite normal (2) e leite ácido (3).



Fonte: A autora.

A acidez do leite exerce influência direta sobre a coagulação, bem como sobre a estrutura e a textura da coalhada formada durante a fabricação do queijo. De forma geral, níveis mais elevados de acidez favorecem a formação de uma coalhada mais firme e compacta, em virtude da maior desnaturação das proteínas e da redução da repulsão eletrostática entre as

micelas de caseína (Fox et al., 2017). Por outro lado, níveis mais baixos de acidez tendem a gerar uma coalhada mais delicada e menos firme, podendo comprometer o rendimento e a textura final do queijo (Bonfim *et al.*, 2020). A textura da coalhada é crucial para determinar a textura final do queijo (Mamede *et al.*, 2010). A acidez do leite também contribui para o perfil de sabor do queijo. Queijos produzidos a partir de leite mais ácido podem ter um sabor mais pronunciado, enquanto queijos de leite menos ácidos podem ser mais suaves (Fox *et al.*, 2004).

Segundo a Instrução Normativa nº 76 e 77 de 26 de novembro de 2018 (Brasil, 2018) o leite deve apresentar acidez titulável entre 14 e 18 °D (ou 0,14-0,18 g de ácido láctico/100 mL de leite). Nas amostras de LINA foi observado o valor de 15 °D e no LE o valor de 14,9 °D para acidez titulável, mostrando que ambos estão dentro dos valores estabelecidos pela legislação; além disso os valores não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Os parâmetros dos testes do álcool, alizarol e acidez titulável permitiram a classificação das amostras de leite como leite estável (estabilidade ao álcool ≥ 72 °GL e acidez entre 0,14 e 0,18 g/100 mL) e leite instável não ácido (LINA) (estabilidade ao álcool < 72 °GL e acidez entre 0,14 e 0,18 g/100mL). Os resultados demonstram, no que se refere ao grau de estabilidade média ao álcool, que os valores encontrados para LINA e LE são diferentes indicando que, por este teste, pode-se caracterizar o leite como estável ou instável não ácido. Entretanto, para determinar se o leite é instável não ácido, deve-se realizar o teste de acidez para confirmar se o leite se encontra dentro das normas permitidas pela legislação, visto que quando o leite se encontra ácido (valores acima de 18 °D), o teste do álcool mostra-se positivo.

As amostras de LE não apresentaram grumos após a fervura no teste de estabilidade térmica; já nas amostras de LINA, foram observados grumos, indicando que o leite se apresentou instável quando submetido ao processamento térmico. Esse resultado está em conformidade com os resultados de trabalhos de Manske *et al.* (2021), Goulart *et al.* (2019), Martins *et al.* (2019) e Zanela (2018) que também demonstraram que o LINA apresenta precipitação da caseína, quando submetido ao tratamento térmico.

A precipitação ocorre porque a micela de caseína possui grupamentos ácidos (COOH) e básicos (NH₃), com uma predominância de ácidos sobre os grupos amino, portanto, a carga resultante é negativa. Assim, quando a estabilidade da estrutura micelar está fraca, e isso pode ocorrer devido algum desequilíbrio no sistema, como por exemplo, o aumento do cálcio iônico do leite (Martins *et al.*, 2015), acaba gerando atração entre as micelas, ocasionando agregação das mesmas, por isso observa-se a presença de grumos no leite (Zanela *et al.*, 2018).

5.1.2 pH, densidade e Índice crioscópico

Segundo Instrução Normativa n° 76 e 77 de 26 de novembro de 2018 (Brasil, 2018) o pH do leite bovino pode variar de 6,6 a 6,8. Quando os valores de pH do leite estão abaixo do intervalo estabelecido pela legislação, isso pode indicar falhas na higiene durante a ordenha e/ou armazenamento em temperatura inadequada, resultando em um aumento da acidez do leite (Tronco, 2010). O pH do leite exerce influência direta sobre diversos aspectos da fabricação de queijos, como a textura, a microbiota e a maturação (Fox *et al.*, 2017). As reações enzimáticas catalisadas pelo coalho e pelas enzimas microbianas são dependentes do pH, o que afeta: O tempo de coagulação, a sinérese (expulsão de soro) e a desmineralização da massa caseosa. Alterações no pH também influenciam a atividade microbiológica durante a maturação, interferindo no desenvolvimento de características sensoriais como sabor, aroma e consistência (Zanela; Ribeiro, 2018). Os leites utilizados nesse trabalho apresentaram valores de pH em conformidade com a legislação, e também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si (Tabela 1).

Tabela 1- Valores de pH, densidade e índice crioscópico do leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).

Parâmetros Analíticos	LE	LINA	IN n° 76
pH*	6,8 ^a ±0,01	6,71 ^a ±0,03	6,6 a 6,8
Densidade (g/mL)	1,030 ^a ±0,01	1,031 ^a ±0,02	1,028 a 1,034
Índice crioscópico (° H)	-0,548 ^a ±0,02	-0,549 ^a ±0,00	-0,530 a -0,555

* Adimensional. Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste t ($p > 0,05$).

IN: Instrução Normativa n° 76 de 26 de novembro de 2018, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado.

O LINA e o LE avaliados nesse trabalho apresentaram valores próximos quanto a densidade, sem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) e ambos estavam em conformidade com a legislação. A densidade do leite influencia diretamente na quantidade de queijo que pode ser produzida a partir de uma quantidade específica de leite, ou seja, reflete diretamente no rendimento do queijo; sendo assim leites mais densos tendem a produzir mais queijo, uma vez que contêm mais sólidos (Silva *et al.*, 2019). A densidade do leite também pode afetar a textura final do queijo por conter mais gordura e proteína, e tende a resultar em queijos

mais cremosos e com textura mais firme (Castanheira, 2012).

O índice crioscópico fornece uma indicação do teor de sólidos totais no leite. Isso inclui não apenas a gordura, proteínas e lactose, mas também minerais e outros componentes. Um índice crioscópico mais alto geralmente indica um leite com maior concentração de sólidos, o que pode influenciar a quantidade e a qualidade do queijo produzido (Oliveira, 2020). Além disso, pode influenciar a textura e a consistência final do queijo, pois afeta a quantidade de sólidos que permanecem no queijo após a remoção do soro (Castanheira, 2012). Conforme o apresentado na Tabela 1, o índice crioscópico do LINA e do LE se mostraram semelhantes e sem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$), além disso ambos estavam em conformidade com a legislação para esse parâmetro (Brasil, 2018).

5.1.3 Condutividade elétrica, cálcio iônico (Ca^{2+}) e cálcio total

A Tabela 2 mostra as médias e desvio padrão da condutividade elétrica, cálcio total e cálcio iônico do LE e do LINA. A condutividade elétrica do leite pode ser utilizada para verificar a qualidade e a composição do leite, pois está relacionada à concentração de íons dissolvidos, especialmente os eletrólitos como sais de cálcio, magnésio, potássio e sódio (Panchal *et al.*, 2016). Neste trabalho foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a condutividade elétrica do LE e LINA (5,61 mS e 5,78 mS respectivamente), que pode ser explicada pela quantidade de cálcio iônico (Ca^{2+}) presente no LINA que também foi maior. O cálcio iônico que está presente na forma de Ca^{2+} no leite, contribui para a condutividade elétrica porque os íons carregados são capazes de transportar corrente elétrica (Nienaber *et al.*, 2004), e quando se mede a condutividade elétrica do leite, observa-se a capacidade dos íons no leite de conduzir essa corrente.

Tabela 2 - Valores da condutividade elétrica, cálcio total e cálcio iônico do leite cru caracterizado como estável (LE), instável não ácido (LINA).

Parâmetros Analíticos	LE	LINA
Condutividade elétrica (mS)	5,61 ^a ± 0,10	5,78 ^b ± 0,01
Cálcio iônico (g/l)	0,082 ^a ± 0,11	0,128 ^b ± 0,09
Cálcio total (m%)	163,5 ^a ± 0,25	222,5 ^b ± 0,25

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo Teste t ($p < 0,05$).

O Ca^{2+} no leite pode interferir na condutividade elétrica ao competir por sítios de ligação

ou ao interagir com outros íons presentes, como potássio (K^+), sódio (Na^+), e magnésio (Mg^{2+}) (Ribeiro *et al.*, 2006). A presença desses íons influencia a mobilidade dos elétrons livres no leite, afetando assim sua condutividade elétrica (Panchal *et al.*, 2016). Em resumo, o Ca^{2+} no leite influencia a condutividade elétrica devido à sua capacidade de ionizar-se e interagir com outros íons presentes no leite, afetando assim a mobilidade dos íons livres e, consequentemente, a capacidade do leite de conduzir eletricidade.

Barbosa *et al.* (2009) em um estudo utilizaram 29 vacas Jersey, distribuídas em grupos de acordo com o tempo de lactação, mediram as concentrações de Ca^{2+} presentes no LINA e verificaram valores maiores de Ca^{2+} no LINA. Marques *et al.* (2011) em seu estudo, também observaram que existe maior quantidade de Ca^{2+} no LINA quando comparado ao LE.

5.1.4 Contagem Bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) do leite

A legislação permite o valor máximo de células somáticas (CCS) de $5,0 \times 10^5$ células/mL (500 mil células/mL), e de contagem bacteriana total (CBT) até 300.000 UFC/mL (Brasil, 2018). Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a CCS e CBT do LE e LINA (Tabela 3). Esse resultado era esperado, visto que a CCS está relacionada com a sanidade do animal (presença de mastite) e CBT com a higiene durante a ordenha e temperatura de armazenamento do leite, não sendo uma alteração do LINA. Os dois leites apresentaram valores dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Tabela 3 - Contagens de células somáticas (CCS) e bacteriana total (CBT) para o leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).

	LE	LINA	IN nº 76 e 77
CCS (Células/mL)	$4,88 \times 10^5 \pm 0,20$	$4,90 \times 10^5 \pm 0,01$	$5,00 \times 10^5$
CBT (UFC/mL)	$210.000 \pm 0,03$	$212.000 \pm 0,02$	300 mil

Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste t ($p > 0,05$).

IN: Instrução Normativa nº 76 e 77 de 26 de novembro de 2018, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado.

Goulart *et al.* (2019) quando compararam a CCS do LE e LINA, também não observaram diferenças estatísticas significativas. Os valores de CCS e CBT são parâmetros de extrema importância para a determinação da qualidade do leite e sua aptidão para o

processamento industrial. Na produção de queijos, um alto valor de CCS (valores superiores a $6,0 \times 10^5$ células/mL) causa o aumento da lactoperoxidase e plasmina, enzimas antimicrobianas responsáveis por inibir a multiplicação dos microrganismos da cultura láctea (Sobral *et al.*, 2017). Além disso também podem atuar na matriz proteica do gel, deixando-a extremamente frágil, possibilitando perdas de caseína, gordura e extrato seco para o soro, o que reduz a firmeza da coalhada, influenciando o rendimento e causando defeitos de textura, que podem inviabilizar a produção e a comercialização do produto (Oliveira, 2019).

Estudos realizados por Summer *et al.* (2015), avaliando queijo *Parmigiano Reggiano* produzido com leite em diferentes níveis de CCS, mostraram uma perda significativa de rendimento quando o valor de CCS no leite estava acima de 300.000 células/mL, chegando à diferença de 15 % a menos no rendimento, quando comparado ao queijo produzido com leite com CCS abaixo de 300.000 células/mL. Além de influenciar nas características de textura e rendimento, altos valores de CCS e CBT também podem influenciar no sabor, pois provocam o aumento do nível da enzima lipase, que causa degradação dos ácidos graxos deixando o leite e seus derivados com sabor rançoso (Melo *et al.*, 2022).

5.1.5 Composição do leite

A composição do leite está descrita na Tabela 4. Os teores de proteína e lactose apresentaram-se significativamente ($p < 0,05$) menores e de gordura maior no LINA quando comparado ao LE; extrato seco total e desengordurado não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Composição do leite cru caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA).

Parâmetros Analíticos	LE	LINA	IN n° 76
Proteínas (g/100g)	3,54 ^a ± 0,00	3,32 ^b ± 0,01	> 2,9g/100g
Lactose (g/100g)	5,21 ^a ± 0,02	4,90 ^b ± 0,10	> 4,3g/100g
Gordura (g/100g)	3,62 ^b ± 0,10	4,32 ^a ± 0,06	> 3,0g/100g
Extrato seco total (g/100g)	12,21 ^a ± 0,12	12,26 ^a ± 0,10	> 11,4g/100g
Extrato seco desengordurado (g/100g)	8,53 ^a ± 0,01	8,52 ^a ± 0,04	> 8,4g/100g

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo Teste t ($p < 0,05$).

IN: Instrução normativa N° 76 e 77 de 26 de novembro de 2018, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado.

Estudos realizados por Marques *et al.* (2007) compararam LINA vindos da região sul e noroeste do Rio Grande do Sul (RS) e observaram que nos leites produzidos na região sul do RS, houve uma diminuição significativa de proteína e lactose e aumento do teor de gordura. Já na região noroeste, observaram redução significativa nos teores de proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado, mas não houve variação significativa no percentual de gordura entre o leite estável e o LINA.

Abreu *et al.* (2008) avaliaram a composição química do leite em uma propriedade no extremo oeste de Santa Catarina e não observaram diferença nos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado, entre LINA e leite estável. Assim não se pode afirmar que as diferenças encontradas nas amostras de leite sejam relacionadas ao LINA, pois vários fatores podem interferir na composição do leite, como dieta, período de lactação, raça, idade, clima, saúde do animal, etc. (Barbosa *et al.*, 2012; Ciprandi *et al.*, 2012; Zanela *et al.*, 2009). Além disso, nesse estudo e nos estudos relatados, nenhum aponta valores dos constituintes do LINA fora dos padrões exigidos pela legislação (IN 76 e IN 77).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS QUEIJOS

5.2.1 Rendimento e características físico-químicas

O rendimento do queijo é um termo que define a quantidade de queijo expresso em quilogramas, obtido a partir de 100 kg de leite, ou a quantidade de litros necessária para se produzir 1 kg de queijo. Existem fatores que influenciam no rendimento, os principais são os teores de proteína e gordura (Souza, 2014). Os queijos produzidos com LINA com CaCl_2 tiveram o maior rendimento entre todos os queijos avaliados (Tabela 5), ou seja, necessitaram de uma menor quantidade de litros de leite para produzir 1 kg de queijo, já os queijos produzidos com LE sem CaCl_2 tiveram o menor rendimento. As variações ocorrem principalmente pela composição do leite utilizado, pois de acordo com Souza *et al.*, (2014) a transição dos componentes do leite para o queijo é de 73% para as proteínas, 85,33% para gordura e 53,30% para extrato seco total. Observa-se que o teor de gordura do LINA utilizado no processamento do queijo foi maior e significativamente ($p < 0,05$) diferente do teor de gordura do LE, assim este componente em maior quantidade no LINA pode ter colaborado para o maior rendimento.

Tabela 5 - Rendimento e caracterização físico-química dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao final da maturação (180 dias).

Parâmetros Analíticos	LE		LINA	
	Com CaCl_2	Sem CaCl_2	Com CaCl_2	Sem CaCl_2
Rendimento (L/kg)	10,88	12,75	10,61	12,32
pH*	5,30 ^a $\pm 0,00$	5,31 ^a $\pm 0,20$	5,19 ^b $\pm 0,01$	5,18 ^b $\pm 0,10$
Acidez %	0,57 ^c $\pm 0,01$	0,49 ^d $\pm 0,08$	0,98 ^a $\pm 0,05$	0,82 ^b $\pm 0,02$
Gordura %	32,5 ^a $\pm 0,10$	26,5 ^b $\pm 0,05$	32,0 ^a $\pm 0,05$	28,0 ^a $\pm 0,20$
Umidade %	30,69 ^a $\pm 0,20$	30,52 ^a $\pm 0,07$	28,52 ^c $\pm 0,20$	29,27 ^b $\pm 0,50$
Atividade da água	0,860 ^a $\pm 0,07$	0,854 ^b $\pm 0,10$	0,806 ^c $\pm 0,30$	0,806 ^c $\pm 0,10$
Cinzas %	4,08 ^a $\pm 0,10$	4,30 ^a $\pm 0,07$	4,23 ^a $\pm 0,20$	4,44 ^a $\pm 0,03$
Proteínas %	41,5 ^a $\pm 0,03$	40,2 ^a $\pm 0,30$	40,7 ^a $\pm 0,04$	40,7 ^a $\pm 0,20$
Nitrogênio total %	6,50 ^a $\pm 0,50$	6,46 ^a $\pm 0,51$	7,01 ^a $\pm 0,60$	7,01 ^a $\pm 0,09$
Cálcio total %	1,14 ^b $\pm 0,01$	1,35 ^a $\pm 0,09$	1,41 ^a $\pm 0,20$	1,41 ^a $\pm 0,10$

* Adimensional. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

Observou-se que a concentração de caseína no leite teve impacto direto na formação da coalhada e no rendimento final. Pois a estrutura do coalho depende da formação de uma rede proteica capaz de reter umidade e sólidos e em amostras com maior concentração de caseína, a formação da coalhada foi mais eficiente, resultando em uma massa mais firme e com maior retenção de constituintes do leite (Silva *et al.*, 2019a), o que pode ter refletido em um maior volume e peso do queijo produzido.

Além disso, a gordura do leite desempenhou papel relevante tanto nas características sensoriais do produto quanto no seu rendimento (Lazzarotto, 2013). Foi evidente que leites com maior teor de gordura originaram queijos com textura mais macia e sabor mais pronunciado, além de apresentarem maior rendimento, uma vez que a gordura foi eficientemente retida na matriz da coalhada durante a coagulação e essa retenção contribuiu significativamente para o peso final do queijo.

Lazzarotto (2013) ao desenvolver queijo fresco com leite estável e LINA encontrou rendimento de 13,17 L/kg e 13,20 L/kg, respectivamente, e não encontrou diferença significativa entre o rendimento dos produtos processados com as duas matérias-primas. Resultados semelhantes foram observados por Abreu (2008) que não observaram diferenças no

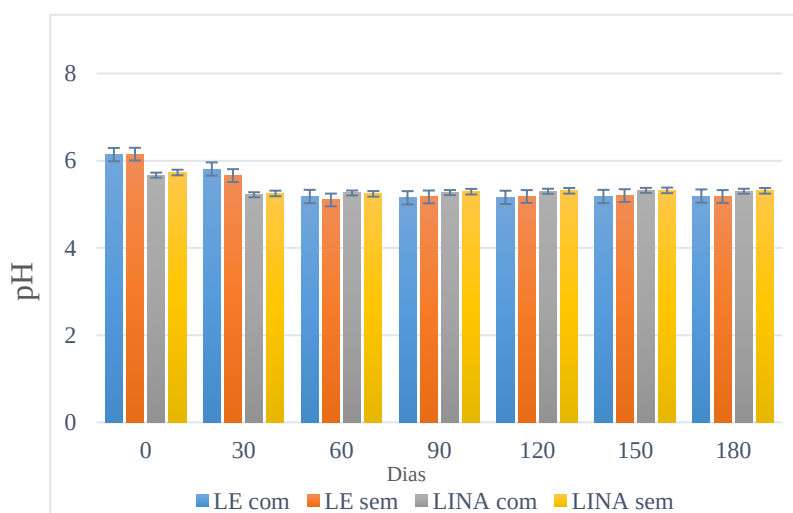
rendimento de queijo prato produzido com LINA. Silva *et al.* (2019a) encontraram rendimentos inferiores na produção de queijo muçarela com LINA, diferindo dos resultados encontrados nesse estudo com queijo duro, onde o queijo produzido com LINA com CaCl_2 teve maior rendimento.

Neste trabalho pode-se observar que a adição de CaCl_2 influenciou no rendimento dos queijos. Os queijos que foram produzidos utilizando CaCl_2 , apresentaram valores maiores de rendimento, tanto no LE quanto no LINA. A utilização do CaCl_2 tem por objetivo a reconstituição do cálcio solúvel que é insolubilizado devido ao tratamento térmico empregado ao leite durante a pasteurização (Ménard *et al.*, 2014). O CaCl_2 auxilia na coagulação promovendo uma coalhada mais firme e compacta, além de prevenir perdas de sólidos no soro, reduzir o tempo de coagulação e melhorar a expulsão do soro (Nassu; Lima, 2006, Matos *et al.*, 2015).

Quando se compara o rendimento dos queijos sem CaCl_2 produzidos com LINA com os queijos produzidos com LE, pode-se observar (numericamente) que os queijos obtidos a partir do LINA tiveram um maior rendimento, que pode ter ocorrido devido ao maior teor de cálcio total e cálcio iônico encontrados neste leite. A maior quantidade de cálcio iônico pode ter contribuído para uma melhor coagulação, já que o cálcio auxilia a estabilização da estrutura das micelas de caseína. Além disso, a quantidade de cálcio no leite influencia a quantidade de soro que é liberada durante a produção de queijo. Um leite com níveis adequados de cálcio tende a reter mais umidade e sólidos no queijo, aumentando o rendimento (Ménard *et al.*, 2014).

Comparando os queijos produzidos com LE com e sem CaCl_2 (Gráfico 1) em relação aos valores de pH, pode-se observar que no dia 0 não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre eles (5,67 e 5,73 respectivamente), o mesmo podendo ser observado entre o LINA com e sem CaCl_2 (6,14 e 6,15 respectivamente). Porém, quando são comparados os queijos produzidos com LE com os queijos produzidos com LINA, observa-se diferenças significativas no pH ($p < 0,05$) tendo os queijos fabricados com LE com e sem CaCl_2 valores mais baixos, ou seja, mais ácidos que os queijos fabricados com LINA. A partir dos 60 dias até o final da maturação, os valores se inverteram e os queijos produzidos com LINA passaram a ser mais ácidos quando comparados com os queijos fabricados com LE.

Gráfico 1 - Evolução do pH dos queijos durante os 180 dias de maturação.



Fonte: A autora

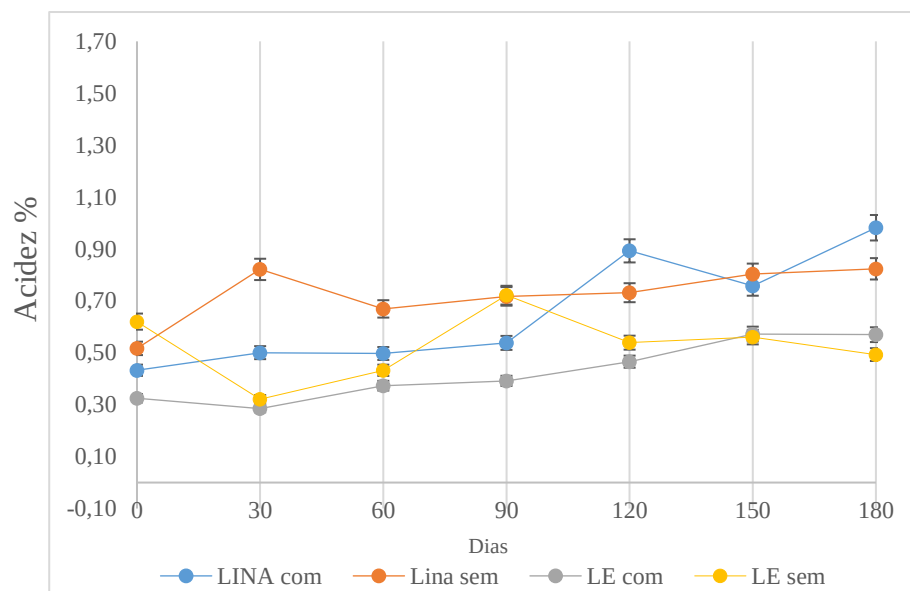
Houve diferenças significativas para os queijos avaliados também em relação ao tempo ($p < 0,05$). Ambos os queijos produzidos com LE e LINA mostraram variações significativas no pH no dia 0 e 30 de maturação, e em todos os queijos houve queda nos valores de pH, que diferiu dos demais períodos, mostrando um pH mais elevado, mas após os 30 dias de maturação os valores se mantiveram estáveis tendo pouca variação até o final da maturação.

As alterações de pH nos queijos durante a maturação ocorrem principalmente devido a reações bioquímicas e microbiológicas que transformam os componentes do leite ao longo do tempo e essas mudanças são naturais e desejáveis nos queijos maturados, pois estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de textura, sabor, aroma e segurança microbiológica (Fox *et al.*, 2017). Durante a fermentação inicial, bactérias lácticas (como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) fermentam a lactose em ácido lático, o que reduz o pH (torna o queijo mais ácido), essa acidificação ajuda a inibir patógenos e controlar a microbiota (Ribeiro *et al.*, 2021). A proteólise, que é um processo que ocorre naturalmente em queijos maturados, também é responsável pelas alterações de pH (Zheng *et al.*, 2018). Durante a maturação, enzimas como a quimosina, peptidases microbianas ou do leite, degradam as proteínas (Principalmente caseína), essa degradação libera aminoácidos e compostos básicos (Aminas), que elevam o pH gradualmente, especialmente nas partes mais internas do queijo (Ribeiro *et al.*, 2021).

Os queijos produzidos com LINA mostraram uma maior acidez titulável ($p < 0,05$) ao final do período de maturação quando comparados com os produzidos com LE, e todos os queijos diferiram entre si ($p < 0,05$) para o teor de acidez titulável durante todo o período de maturação (Gráfico 2). Apesar das variações na acidez titulável entre os queijos, os valores

encontrados estão dentro do esperado para queijos duros, onde a acidez titulável pode atingir até 1,5% ao final da maturação (Furtado, 2011b).

Gráfico 2 - Evolução da acidez dos queijos durante os 180 dias de maturação.



Fonte: A autora

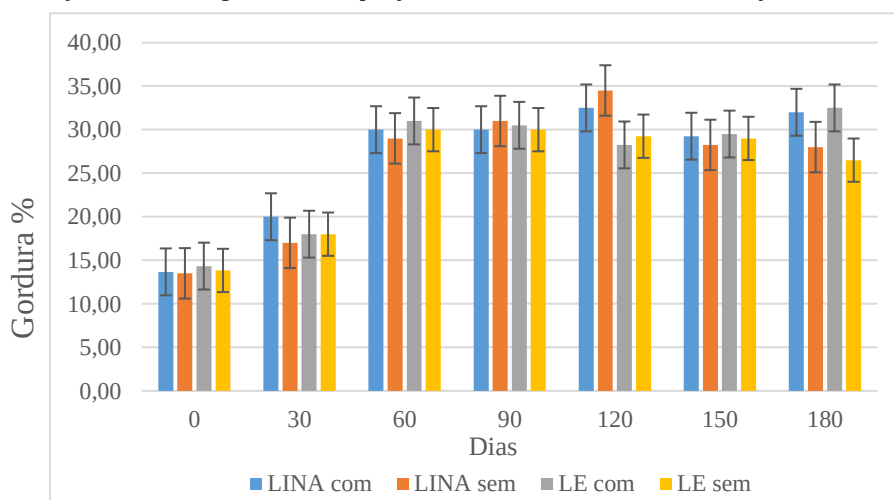
A acidez do queijo é responsável por garantir o desenvolvimento da microbiota láctica e manter efetivas as diferentes reações enzimáticas durante a maturação (O'callaghan *et al.*, 2017). A produção de ácido láctico afeta algumas características do queijo por meio da influência na sinérese do grão, retenção de cálcio que pode afetar a textura do queijo e também pode inibir alguns tipos de bactérias não desejáveis durante a maturação, o que é considerado benéfico na produção de queijos (Burgé *et al.*, 2020). Além disso, uma maior acidez pode realçar sabores e proporcionar um perfil gustativo mais complexo, enquanto queijos menos ácidos tendem a ser mais suaves e cremosos; a acidez também influencia a textura e a percepção sensorial global do queijo (Mason *et al.*, 2015).

Observou-se que os queijos elaborados com leite instável não ácido (LE) sem adição de CaCl_2 apresentaram teor de gordura significativamente inferior aos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 5). Esse resultado sugere que a ausência de cloreto de cálcio comprometeu a eficiência da coagulação, impactando diretamente a retenção de gordura na matriz da coalhada. (Da Silva *et al.*, 2023). O processo de coagulação é crucial para a incorporação e retenção dos glóbulos de gordura no queijo. Quando a coagulação ocorre de forma deficiente, há maior tendência de perda de gordura no soro, o que reduz o teor lipídico do produto final (Gullón *et*

al., 2019). Nesse contexto, a ausência de CaCl_2 , pode ter agravado a fragilidade da rede de caseína, dificultando a formação de uma coalhada coesa e estável, favorecendo a liberação de gordura durante o corte e dessoragem.

A evolução do teor de gordura em função do tempo de maturação está demonstrada no Gráfico 3. Pode-se perceber que o teor de gordura variou entre os queijos avaliados com o passar do tempo de maturação e houve diferenças significativas ($p < 0,05$) também em relação ao tempo. Isso pode ter ocorrido devido à heterogeneidade entre as peças de queijo, e além disso, à medida que o queijo matura, a perda de umidade pode concentrar a gordura, aumentando a sua proporção em relação ao peso total. Apesar do menor teor de gordura observado nos queijos elaborados sem a adição de CaCl_2 , todas as amostras analisadas permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, sendo, portanto, classificadas como queijos semigordos, conforme definido pela legislação brasileira (Brasil, 1997).

Gráfico 3 - Evolução do teor de gordura dos queijos durante os 180 dias de maturação.



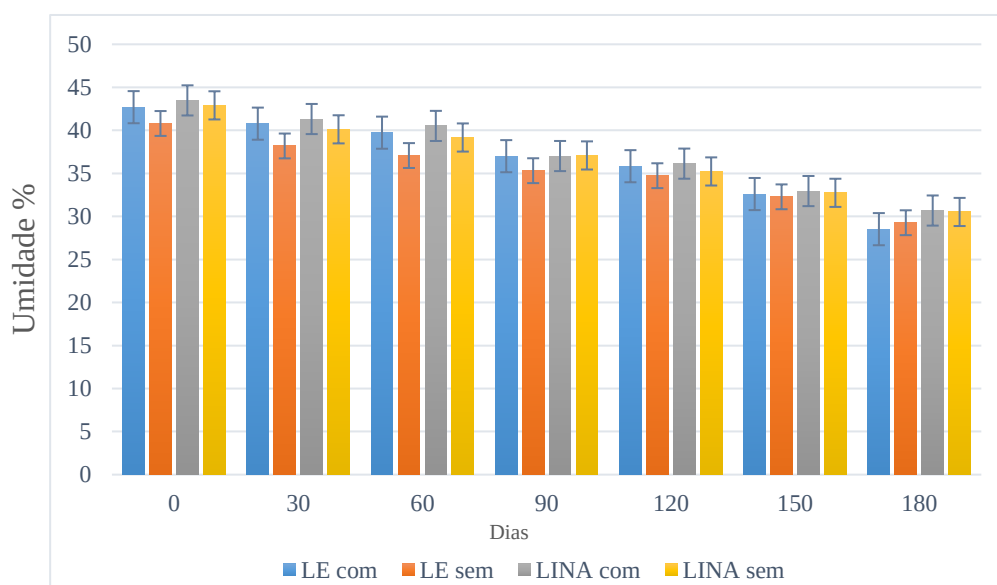
Fonte: A autora.

Os valores encontrados para umidade ao final do período de maturação encontram-se na Tabela 5. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os queijos produzidos com LE com e sem CaCl_2 , mas houve diferenças quando comparados com os queijos produzidos com LINA com e sem CaCl_2 e também entre os queijos produzidos com LINA com e sem CaCl_2 , sendo observada uma menor umidade nos queijos fabricados com LINA com CaCl_2 .

O Gráfico 4 apresenta a evolução do teor de umidade ao longo do tempo de maturação, evidenciando diferenças significativas ($p < 0,05$) tanto entre os tipos de queijo avaliados quanto

ao longo do período de maturação. A redução da umidade ao longo do tempo é um comportamento esperado, uma vez que a maturação promove alterações físico-químicas na estrutura proteica e lipídica da matriz do queijo, facilitando a migração e liberação da água contida na massa. Durante esse processo, ocorrem dois mecanismos principais de perda de umidade: a desidratação superficial, que resulta da evaporação direta de água na interface entre o queijo e o ambiente, e a desidratação capilar, caracterizada pela migração da umidade das camadas internas para a superfície por ação de tensões capilares, impulsionada pelo gradiente de umidade. Ambos os fenômenos atuam em conjunto, sendo influenciados por fatores como temperatura, umidade relativa do ambiente, ventilação e tempo de exposição (Fox *et al.*, 2017).

Gráfico 4 - Evolução da umidade dos queijos durante os 180 dias de maturação.



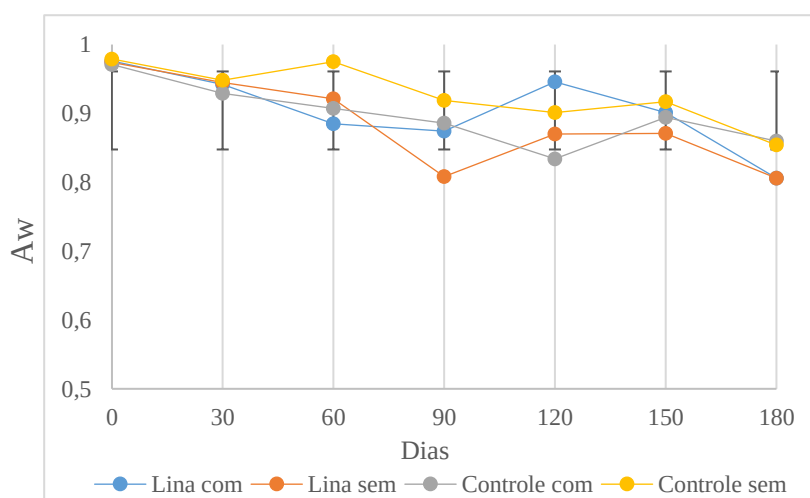
Fonte: A autora.

A atividade microbiológica durante a maturação também contribui para a redução da umidade, seja pelo metabolismo de substratos que liberam compostos voláteis, seja pela produção de enzimas que alteram a estrutura da matriz, facilitando a saída de água (Gullón *et al.*, 2019). Apesar da variação observada entre as amostras, todos os queijos mantiveram-se dentro do intervalo de 28 a 32% de umidade, conforme estabelecido pela legislação vigente para produtos classificados como queijo duro, atendendo, portanto, aos padrões exigidos para essa denominação. (Brasil, 1997).

A atividade de água (A_w) para os queijos produzidos com LINA com e sem CaCl_2 foram

semelhantes e sem diferença significativa ($p>0,05$), mas quando comparados com os queijos produzidos com LE com e sem CaCl_2 , os resultados se mostraram estatisticamente diferentes ($p<0,05$), tendo uma maior atividade nos queijos LE com CaCl_2 (Tabela 5). Durante a maturação, a atividade de água manteve-se dentro do esperado, ou seja, maior no dia zero onde os queijos encontravam-se mais úmidos, e diminuindo com o passar do tempo, já que os queijos perderam umidade no decorrer do processo de maturação (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Atividade da água nos queijos durante os 180 dias de maturação.



Fonte: A autora.

A A_w é um fator intrínseco fundamental para os microrganismos, pois dependem da água livre presente no queijo para se desenvolverem, sendo assim é a A_w que determina quais microrganismos podem se desenvolver (Neto, 2013). Um nível adequado de umidade permite o crescimento de bactérias e fungos benéficos, que contribuem para o sabor e a textura do queijo. Em níveis muito altos ou baixos, o crescimento de patógenos pode ser inibido ou promovido, afetando a segurança do produto (Leggieri *et al.*, 2018).

A maturação do queijo é um processo complexo, marcado por uma série de reações bioquímicas que transformam a matriz do leite em um produto com características sensoriais e físico-químicas únicas. Essas reações envolvem a atuação de enzimas endógenas (naturais do leite), enzimas adicionadas durante a fabricação (como a quimosina) e enzimas produzidas por microrganismos, cuja atividade é fortemente influenciada pela atividade de água (Falcão *et al.*, 2018). Durante a maturação, a perda de umidade pode alterar a A_w e, consequentemente, afetar a textura e o sabor do queijo, sendo assim os queijos maturados tendem a ter uma A_w mais baixa (Garrido *et al.*, 2017).

A proteólise, é uma das principais vias bioquímicas envolvidas. Inicia-se com a quebra da caseína, especialmente da α 1-caseína, liberando peptídeos e aminoácidos livres, esses compostos são essenciais para o desenvolvimento do sabor umami, adocicado ou amargo, dependendo de sua composição e concentração. Aminoácidos como a leucina, isoleucina e tirosina também servem de substrato para reações secundárias que geram compostos voláteis, como álcoois, ácidos e aldeídos, fundamentais para o perfil aromático do queijo (Fox et al., 2017). Simultaneamente, ocorre a lipólise, que consiste na quebra dos triglicerídeos do leite, liberando ácidos graxos livres. Esses ácidos, especialmente os de cadeia curta e média (como butírico, caproico e caprílico), estão diretamente relacionados ao aroma característico de queijos maturados. Em alguns casos, esses ácidos ainda passam por transformações microbianas que originam compostos como cetonas, lactonas e ésteres, intensificando o aroma (Falcão *et al.*, 2018).

A perda progressiva de umidade durante a maturação reduz a A_w do produto, o que influencia diretamente a atividade microbiana e enzimática. Uma A_w mais baixa inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis, favorecendo a estabilidade do produto, mas também modula a velocidade das reações bioquímicas, alterando a textura (tornando-a mais firme e quebradiça) e concentrando compostos de sabor (Garrido *et al.*, 2017). A diminuição da A_w ao longo da maturação não apenas preserva o queijo, mas também regula a intensidade e o perfil das reações bioquímicas, sendo determinante para o desenvolvimento das características sensoriais finais do produto (Fox et al., 2017).

O sal e a umidade da câmara de maturação regulam a atividade de água do queijo durante a estocagem, o que tecnologicamente se tornam fatores importantes a serem controlados, pois quanto maior a umidade, maior a A_w do queijo e mais acelerado pode ser o processo de maturação (Wemmenhove *et al.*, 2016). Diversos estudos sugerem que a A_w até 0,800 é limitante para o desenvolvimento da maioria dos fungos deteriorantes (Forsythe, 2010; Jay, 2005; Franco; Landgraf, 2004), sendo assim os valores encontrados nesse estudo estão próximos desse limite.

A película aplicada no queijo influencia diretamente a atividade de água (A_w), desempenhando um papel importante na retenção de umidade, na taxa de desidratação e na dinâmica da maturação, pois forma uma barreira semipermeável na superfície do queijo, o que reduz a taxa de evaporação da água para o ambiente. Isso retarda a queda da A_w , especialmente nas etapas iniciais da maturação, ajudando a manter condições ideais para a atividade enzimática e microbiana controlada (Wemmenhove *et al.*, 2016). Ao limitar a desidratação superficial, a película promove uma maturação mais uniforme, evitando a formação de casca muito seca ou endurecida (caso comum em queijos maturados sem proteção). Isso permite uma difusão mais

equilibrada de enzimas e produtos da proteólise e lipólise, influenciando positivamente o sabor e a textura (Falcão *et al.*, 2018).

Os valores da porcentagem de cinzas, proteínas totais e nitrogênio total (Tabela 5) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre os queijos analisados. Para teor de cálcio, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) comparando queijos produzidos com LINA com e sem CaCl_2 e o queijo produzido com LE com CaCl_2 (Tabela 5). Porém, o queijo produzido com LE sem CaCl_2 apresentou o menor teor de cálcio quando comparado com os demais queijos. Esse menor teor pode ter ocorrido pela falta do CaCl_2 na formulação do queijo, visto que ele auxilia na coagulação, e uma coagulação mais eficiente, tende a reter mais minerais, incluindo o cálcio, na coalhada. O teor de cálcio no queijo duro tipo grana geralmente varia entre 800 a 1.200 mg/100 g, essa quantidade irá depender de fatores como formulação, método de produção e a composição do leite utilizado (Calvo *et al.*, 2017).

Os queijos produzidos com LINA sem adição de CaCl_2 podem ter apresentado valores semelhantes aos queijos que foram produzidos com CaCl_2 devido ao cálcio total e iônico em maiores quantidades em sua composição, auxiliando na coagulação e retraindo mais cálcio na coalhada, consequentemente tendo um teor maior no queijo ao final da maturação.

5.2.2 Análises microbiológicas

Instrução Normativa N° 60, De 23 de Dezembro de 2019, estabelece os limites de tolerância e padrões microbiológicos sanitários para queijo de acordo com a umidade desse alimento. Microrganismos indesejados podem afetar o sabor, a textura e a aparência do queijo, comprometendo sua aceitação pelo consumidor (Motta *et al.*, 2019). O controle garante que apenas microrganismos benéficos, como culturas starter, estejam presentes, contribuindo para a fermentação adequada, desenvolvimento de sabor, produção de queijos de alta qualidade e seguros para o consumo (Bertozzi *et al.*, 2018). Os resultados das análises microbiológicas dos queijos encontram-se na Tabela 6, e encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

Tabela 6 - Análise microbiológica dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) no dia 0 e com 180 dias de maturação.

	LE dia 0	LINA dia 0	LE 180 dias	LINA 180 dias	IN 60
	Com e sem CaCl ₂	Com e sem CaCl ₂	Com e sem CaCl ₂	Com e sem CaCl ₂	
<i>E.coli</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>Salmonella Sp</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>S. aureus</i>	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

* Instrução Normativa N° 60, De 23 de Dezembro de 2019 padrões microbiológicos para alimentos.

5.2.3 Índices de maturação: Extensão e profundidade da proteólise

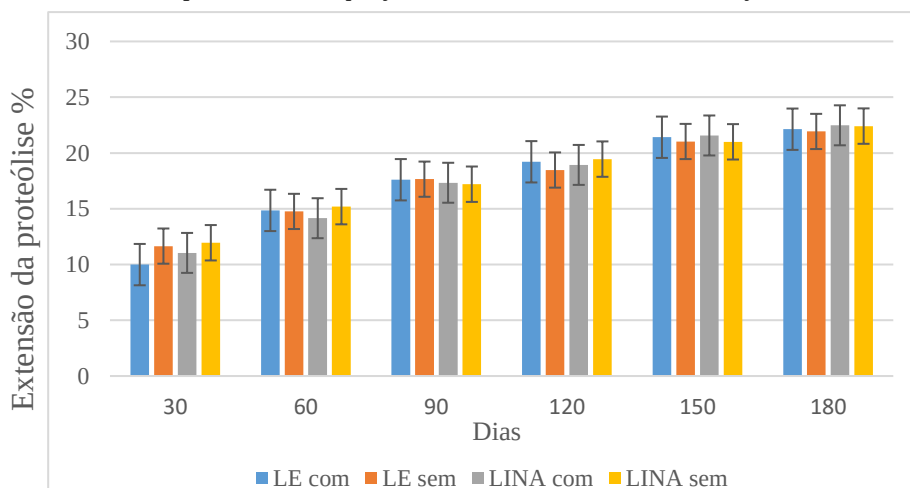
A proteólise é um dos principais processos que ocorrem durante a maturação do queijo, e diferentes variedades de queijo apresentam diferentes graus de proteólise (Gänzle *et al.*, 2015). A proteólise nos queijos é o processo de degradação das proteínas do leite em peptídeos e aminoácidos, que ocorre durante a maturação; esse processo é crucial para o desenvolvimento de sabor, textura e aroma dos queijos (Fox *et al.*, 1998). A degradação das proteínas afeta a textura dos queijos, tornando-os mais macios ou mais duros, dependendo do tipo de queijo e das condições de maturação (Fox *et al.*, 2017). O controle da proteólise é importante para garantir a qualidade do queijo, evitando o desenvolvimento de sabores indesejados ou a degradação excessiva que irá comprometer a textura (Cottam *et al.*, 2020).

O índice de extensão da proteólise (IEP) é quantificado pelas substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo de maturação e são expressas como percentual do nitrogênio total. Quanto maior o IEP, maior é a extensão da proteólise, e um IEP elevado geralmente indica um queijo mais maduro, com desenvolvimento de sabores e aromas mais complexos, resultantes da ação das enzimas e microrganismos durante a maturação (Madrigal *et al.*, 2011). O IEP pode ser utilizado como um indicador da qualidade do queijo, pois a proteólise influencia diretamente a textura, o sabor e a aceitabilidade do produto final (Fox *et al.*, 2017).

O Gráfico 6 mostra a evolução da extensão da proteólise. Pode-se perceber que houve pequenas diferenças, porém, significativas ($p < 0,05$) em todas as amostras analisadas em todo o período de maturação. Aos 30 dias de maturação o maior valor de IEP foi observado nos queijos produzidos com LINA sem CaCl₂ ($11,95\% \pm 0,01$), e o menor valor nos queijos produzidos

com LE com CaCl_2 , ($9,99\% \pm 0,01$). E ao final do período de maturação (180 dias) os maiores valores foram observados nos queijos produzidos com LINA com CaCl_2 ($22,48\% \pm 0,01$) e os menores valores nos queijos produzidos com LE sem CaCl_2 ($21,93\% \pm 0,01$).

Gráfico 6 - Extensão da proteólise dos queijos durante os 180 dias de maturação.

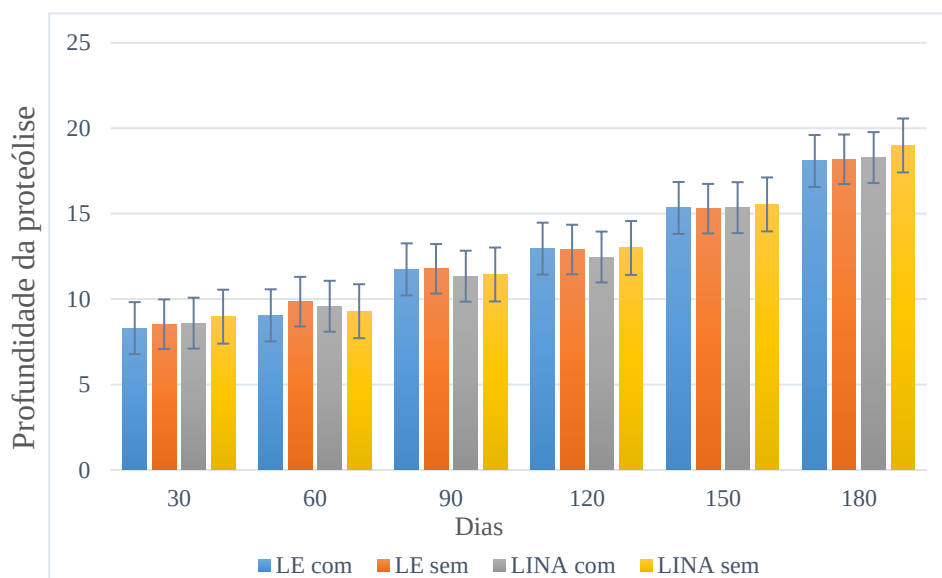


Fonte: A autora.

A composição do leite, principalmente quanto ao teor de proteínas, gorduras e caseínas influencia como as proteínas se degradam durante a maturação, sendo assim afetam diretamente na extensão da proteólise do queijo (Rivera *et al.*, 2010). As diferenças no teor de umidade e atividade de água são conhecidas por afetar significativamente a atividade proteolítica, uma vez que a atividade enzimática tem ligação direta com esses dois elementos (Fox *et al.*, 2017).

O Índice de Profundidade da Proteólise (IPP) indica o quão profundamente as proteínas do queijo foram degradadas em peptídeos e aminoácidos e refere-se à quantidade de nitrogênio que está presente em frações mais solúveis, resultantes da degradação das proteínas (Fox *et al.*, 2017). Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras analisadas e também em relação ao tempo (Gráfico 7), tendo o maior valor de IPP aos 30 dias nos queijos produzidos com LINA sem CaCl_2 ($8,97\% \pm 0,01$), e o menor valor ($8,30\% \pm 0,01$) nos queijos produzidos com LE com CaCl_2 . Ao final do período de maturação (180 dias) os maiores valores foram observados nos queijos produzidos com LINA sem CaCl_2 ($18,99\% \pm 0,01$) e os menores valores nos queijos produzidos com LE com CaCl_2 ($18,08\% \pm 0,01$).

Gráfico 7 - Profundidade da proteólise dos queijos durante os 180 dias de maturação.



Fonte: A autora.

Durante a maturação espera-se que ocorra um aumento na extensão e na profundidade da proteólise, e a hidrólise das proteínas gera peptídeos e aminoácidos que contribuem para o sabor complexo do queijo duro tipo grana; essa transformação é crucial para o desenvolvimento de sabores ricos e umami (Bertola *et al.*, 2020). A degradação das proteínas resulta em uma textura mais quebradiça e granulosa, característica do queijo duro tipo grana (Pagnoni *et al.*, 2020). Os produtos da proteólise também afetam o aroma do queijo, com compostos voláteis sendo liberados, o que contribui para o perfil aromático do queijo. Sendo assim queijos maturados por mais tempo tendem a apresentar maior degradação proteica, resultando em sabores mais intensos e texturas aprimoradas (Campanelli *et al.*, 2021).

5.2.4 Coloração

A cor faz parte dos aspectos físicos dos queijos, e é um atributo relevante por ser o fator inicial de escolha feita pelo consumidor (Silva, 2023). A cor influencia a percepção sobre a qualidade e frescor do queijo (D'agaro *et al.*, 2019). Um queijo com uma cor vibrante pode ser mais atraente e desejável, além disso a cor pode afetar as expectativas do consumidor em relação ao sabor, pois queijos mais escuros podem ser percebidos como mais maturados ou intensos enquanto os mais claros como queijos mais novos e suaves (Pereira *et al.*, 2023). Foram avaliados os parâmetros L^* , a^* , b^* , chroma e ângulo hue (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros de cor dos queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) ao longo do período de maturação.

		Período de Maturação (Dias)						
		0	30	60	90	120	150	180
L*	LE com	90,6 ^{Aa}	86,3 ^{Ba}	85,0 ^{Ca}	84,3 ^{Da}	83,2 ^{Ea}	82,4 ^{Fa}	81,7 ^{Ga}
	LE sem	89,1 ^{Ab}	86,0 ^{Bb}	85,2 ^{Cb}	84,4 ^{Db}	83,1 ^{Eb}	82,1 ^{Fb}	80,9 ^{Gb}
	LINA com	88,8 ^{Ac}	88,5 ^{Bc}	87,1 ^{Cc}	86,2 ^{Dc}	85,3 ^{Ec}	84,8 ^{Fc}	83,2 ^{Gc}
	LINA sem	91,0 ^{Ad}	89,7 ^{Bd}	89,4 ^{Cd}	87,4 ^{Dd}	85,9 ^{Ed}	84,9 ^{Fd}	83,5 ^{Gd}
a*	LE com	1,35 ^{Ga}	2,48 ^{Ea}	2,16 ^{Fa}	2,90 ^{Ca}	2,73 ^{Da}	2,96 ^{Ba}	4,27 ^{Aa}
	LE sem	1,92 ^{Gb}	2,29 ^{Fb}	2,72 ^{Eb}	3,42 ^{Cb}	3,26 ^{Db}	6,77 ^{Ab}	6,01 ^{Bb}
	LINA com	2,79 ^{Gc}	2,48 ^{Fc}	3,83 ^{Dc}	3,13 ^{Ec}	4,05 ^{Bc}	4,03 ^{Cc}	5,02 ^{Ac}
	LINA sem	2,61 ^{Ed}	2,24 ^{Dd}	2,53 ^{Cd}	3,57 ^{Bd}	3,57 ^{Bd}	3,55 ^{Bd}	5,08 ^{Ad}
b*	LE com	19,8 ^{Ga}	26,5 ^{Fa}	30,5 ^{Ca}	29,8 ^{Da}	31,9 ^{Ba}	29,4 ^{Ea}	34,6 ^{Ab}
	LE sem	22,8 ^{Gb}	23,9 ^{Fb}	30,2 ^{Db}	32,4 ^{Cb}	27,4 ^{Eb}	32,4 ^{Bb}	34,9 ^{Ab}
	LINA com	20,8 ^{Gc}	26,5 ^{Fa}	33,8 ^{Cc}	34,6 ^{Bc}	31,2 ^{Ec}	31,6 ^{Dc}	35,1 ^{Aa}
	LINA sem	17,2 ^{Fd}	28,1 ^{Ec}	28,9 ^{Dd}	32,0 ^{Cd}	35,7 ^{Bd}	35,1 ^{Ad}	35,0 ^{Aa}
Chroma	LE com	19,8 ^{Ga}	26,6 ^{Fa}	30,6 ^{Ca}	29,9 ^{Ea}	32,0 ^{Ba}	29,6 ^{Da}	34,9 ^{Aa}
	LE sem	22,89 ^{Gb}	24,07 ^{Fb}	30,3 ^{Db}	32,57 ^{Bb}	27,56 ^{Eb}	33,1 ^{Cb}	35,5 ^{Ab}
	LINA com	21,0 ^{Ec}	26,6 ^{Da}	34,1 ^{Bc}	34,8 ^{Bc}	31,5 ^{Cc}	31,9 ^{Cc}	40,0 ^{Ac}
	LINA sem	17,4 ^{Ed}	28,2 ^{Dc}	28,9 ^{Dd}	32,2 ^{Cd}	35,9 ^{Bd}	35,2 ^{Bd}	34,9 ^{Ad}
Hue °	LE com	86,1 ^{Aa}	84,7 ^{Da}	85,9 ^{Ba}	84,4 ^{Ea}	85,1 ^{Ca}	84,2 ^{Da}	82,9 ^{Fa}
	LE sem	85,2 ^{Ab}	84,5 ^{Bb}	84,9 ^{Bb}	83,9 ^{Cb}	83,2 ^{Cb}	78,2 ^{Db}	80,2 ^{Eb}
	LINA com	82,4 ^{Cc}	84,7 ^{Aa}	83,5 ^{Bc}	84,8 ^{Ac}	82,6 ^{Cc}	82,7 ^{Cc}	82,8 ^{Cc}
	LINA sem	81,4 ^{Dd}	85,4 ^{Ac}	85,0 ^{Ad}	83,6 ^{Cd}	84,3 ^{Bd}	84,2 ^{Bd}	81,6 ^{Dd}

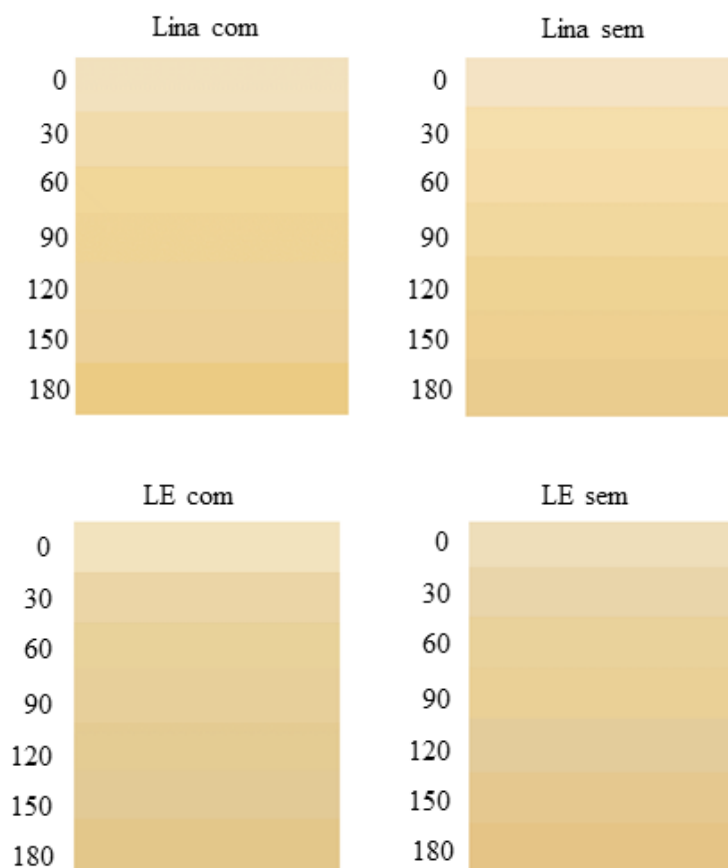
Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD (p<0,05). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD (p<0,05).

Os valores de a* e b* são coordenadas cartesianas que definem a porção cromática, o b* varia de +b (amarelo) a -b (azul) e o a* de +a (vermelho) a -a (verde) (Takatsui, 2011). Os resultados indicam que houve diferenças estatísticas (p<0,05) entre todos os queijos avaliados, em todo o período de maturação, porém, essas variações são esperadas pois são leites com composições diferentes. Houve diferenças (p<0,05) também em relação ao tempo de maturação.

Durante a maturação, diferentes bactérias e fungos são responsáveis por transformar os componentes do queijo, como lactose e proteínas, e esses microrganismos podem produzir pigmentos (como carotenoides) que alteram a cor do queijo (Pereira *et al.*, 2023). As enzimas presentes no leite e nos microrganismos hidrolisam proteínas e gorduras, liberando compostos que podem ter cores diferentes. Por exemplo, a lipólise (quebra de gorduras) pode liberar carotenoides, que conferem tons amarelos ou laranja aos queijos (D'Agaro *et al.*, 2019). A exposição ao oxigênio durante a maturação pode causar reações de oxidação que também

afetam a cor do queijo, ou seja, a oxidação de certos lipídios e pigmentos pode resultar em mudanças na coloração (Silva, 2023). As cores formadas utilizando as coordenadas L^* , a^* e b^* durante a maturação encontram-se na Figura 5.

Figura 5 - Coloração dos queijos ao longo do período de maturação, utilizando as coordenadas cartesianas L^* , a^* e b^* .



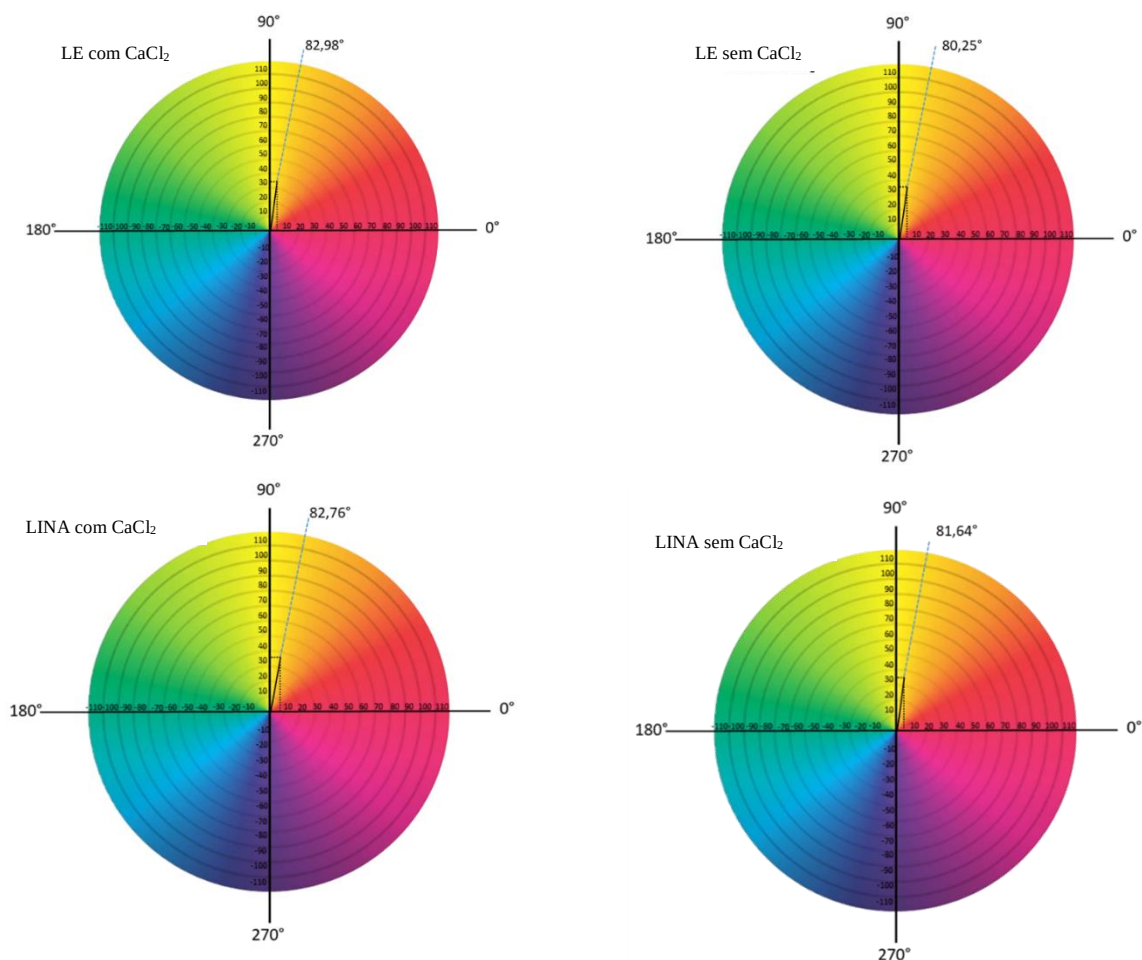
Fonte: A autora.

Todos os queijos ficaram com a coloração esperada para queijos duros tipo grana, cor amarelo-palha, com valores de L^* entre 70 e 90, a^* entre 5 a 10 e b^* de 25 a 35. Essas especificações visam garantir a qualidade e a identidade do produto, promovendo a uniformidade na aparência do queijo (Brasil, 1997).

O ângulo de Hue refere-se à cor percebida em uma escala circular, esse ângulo ajuda a diferenciar entre as diferentes tonalidades de amarelo e suas variações (Mastrorillo *et al.*, 2016). Nos queijos duros tipo grana um ângulo entre 80° e 90° indica que a coloração do queijo é predominantemente amarela, que é a cor esperada para esse tipo de queijo (Guerreiro *et al.*, 2018). Desse modo, os queijos produzidos com LINA e LE com CaCl_2 mostraram o ângulo Hue

mais próximos de 90°, ou seja, mais amarelos, sendo o queijo produzido com LE com CaCl₂ o que apresentou o maior valor (82,98 °), seguido do LINA com CaCl₂ (82,76 ° HUE), LINA sem CaCl₂ (81,64 °) e LE sem CaCl₂ (80,25 °) ao final do período de maturação (Figura 6).

Figura 6- Ângulo Hue para os queijos produzidos com leite caracterizado como estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) ao final do período de maturação (180 dias).



Fonte: A autora.

A cor do queijo duro tipo grana após 180 dias de maturação é um atributo sensorial importante que reflete tanto as transformações bioquímicas ocorridas durante o processo de envelhecimento quanto as condições de processamento e armazenamento (Mastrorillo *et al.*, 2016). Após esse período de maturação, o queijo apresenta, de forma geral, uma coloração amarela intensa, uniforme e opaca, que pode variar em tonalidade dependendo de fatores como tipo de leite, alimentação dos animais, presença de pigmentos naturais (como β -caroteno) e microbiota envolvida no processo de maturação (Pereira *et al.*, 2023). Mesmo apresentando diferenças, todos os queijos avaliados mostraram a cor esperada para queijo duro tipo grana ao

final do período de maturação (entre 80° e 90°) (Figura 7 e 8).

Figura 7. Queijos produzidos com LE com adição de CaCl_2 (a esquerda) e sem adição de CaCl_2 (a direita) após 180 dias de maturação.



Fonte: A autora.

Figura 8. Queijos produzidos com LINA com adição de CaCl_2 (a esquerda) e sem adição de CaCl_2 (a direita) após 180 dias de maturação.



Fonte: A autora.

5.2.5 Perfil de textura

A textura dos queijos é um aspecto fundamental que influencia a percepção de qualidade e a experiência sensorial e pode variar amplamente entre diferentes tipos de queijos (Rosa *et al.*, 2019). As características de textura são determinadas pelas propriedades estruturais da matriz proteica combinadas com os glóbulos de gordura presentes no meio, e dentre os

principais fatores que afetam a textura da maioria das variedades de queijos estão umidade, índice de extensão da proteólise, pH e teor de gordura (Gouin *et al.*, 2016). A textura do queijo duro tipo grana é firme, granulada e quebradiça. Essas características são desenvolvidas ao longo do processo de fabricação e maturação (Bertola *et al.*, 2020).

A Tabela 8 apresenta os valores médios de dureza encontrados nos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA). Pode-se perceber que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos avaliados, sendo o queijo produzido com LINA com CaCl_2 o que se mostrou mais duro; esse queijo foi o que também apresentou menor umidade, o que explica ter apresentado maior dureza. O teor de umidade interfere diretamente na dureza dos queijos, pois a umidade ajuda a manter uma rede proteica mais flexível, e quando a umidade é reduzida, essa rede se torna mais rígida, contribuindo para a dureza. Além disso, a redução da umidade pode favorecer a formação de cristais, como os de tirosina, que aumentam a textura quebradiça e firme (Fox *et al.*, 2004).

Tabela 8 - Dureza (N) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 , durante o período de maturação.

Maturação (dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	14,01 ^{Ga} ±5,09	12,55 ^{Gd} ±3,00	13,29 ^{Gb} ±1,25	12,64 ^{Gc} ±2,11
30	48,35 ^{Fa} ±1,58	34,33 ^{Fc} ±4,53	20,28 ^{Fd} ±2,02	47,69 ^{Fb} ±4,43
60	81,50 ^{Eb} ±3,04	60,96 ^{Ed} ±2,79	70,46 ^{Bc} ±3,09	97,19 ^{Ca} ±3,52
90	95,02 ^{Da} ±0,96	68,47 ^{Dc} ±3,99	37,66 ^{Ed} ±2,82	83,19 ^{Eb} ±2,11
120	108,49 ^{Ca} ±4,42	92,60 ^{Cc} ±1,32	46,82 ^{Dd} ±2,62	93,71 ^{Db} ±3,16
150	112,68 ^{Bb} ±2,73	126,14 ^{Ba} ±3,12	56,23 ^{Cd} ±1,84	100,70 ^{Bc} ±1,25
180	126,64 ^{Ac} ±3,50	143,83 ^{Ab} ±4,21	150,95 ^{Aa} ±4,83	106,99 ^{Ad} ±2,19

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

O queijo que apresentou menor dureza foi o produzido com LINA sem CaCl_2 , esses queijos também apresentaram maior proteólise, o que explica o fato de terem apresentado menor dureza, pois a proteólise corresponde à hidrólise das proteínas em peptídeos menores e aminoácidos. E quando isso ocorre, a rede proteica que dá estrutura ao queijo se torna menos compacta, resultando em uma textura mais macia ao queijo (Bava *et al.*, 2017). Alguns autores observaram a diminuição da dureza devido a uma proteólise mais intensa em diversos tipos de

queijos (Mitchell *et al.*, 1986; Grandisson; Ford, 1986; Arcuri *et al.*, 1990; Rogers; Mitchell, 1994).

Houve diferença ($p < 0,05$) na dureza também em relação ao tempo de maturação. A dureza do queijo tende a aumentar com o tempo de maturação, já que durante a maturação, o queijo perde umidade, resultando em uma textura mais seca e firme (Rosa *et al.*, 2019). Além disso as proteínas do queijo, especialmente as caseínas, passam por mudanças estruturais durante a maturação e essas transformações resultam em uma rede mais densa e firme, contribuindo para o aumento da dureza do queijo (Molina *et al.*, 2017) fazendo com que o queijo duro tipo grana adquira uma textura mais dura e granulada à medida que envelhece (Barros *et al.*, 2011).

Houve diferenças significativas para coesividade entre todos os queijos avaliados ($p < 0,05$) (Tabela 9). O queijo produzido com LE com CaCl_2 foi o que mostrou maior valor para coesividade em 180 dias de maturação, e o menor valor foi observado no queijo fabricado com LINA sem CaCl_2 , indicando que esse queijo se apresentou mais quebradiço que os demais.

Tabela 9 - Coesividade* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.

Maturação (dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	0,70 ^{Aa} ±0,01	0,79 ^{Ab} ±0,04	0,78 ^{Ba} ±0,10	0,78 ^{Aa} ±0,09
30	0,70 ^{Aa} ±0,01	0,68 ^{Eb} ±0,10	0,66 ^{Dc} ±0,20	0,57 ^{Gd} ±0,10
60	0,72 ^{Ea} ±0,02	0,67 ^{Fb} ±0,04	0,72 ^{Aa} ±0,03	0,65 ^{Ec} ±0,01
90	0,77 ^{Ba} ±0,10	0,72 ^{Cb} ±0,04	0,68 ^{Cc} ±0,11	0,66 ^{Dd} ±0,08
120	0,75 ^{Da} ±0,05	0,66 ^{Gb} ±0,05	0,61 ^{Ec} ±0,06	0,69 ^{Bd} ±0,02
150	0,74 ^{Ca} ±0,01	0,70 ^{Db} ±0,02	0,56 ^{Fc} ±0,02	0,63 ^{Fd} ±0,03
180	0,77 ^{Ba} ±0,21	0,75 ^{Bb} ±0,01	0,72 ^{Ac} ±0,15	0,68 ^{Cd} ±0,03

* Adimensional. Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

A coesividade é caracterizada como a extensão com que um queijo pode ser deformado até que haja ruptura em sua estrutura (Fox *et al.*, 2004). Queijos com alta coesividade tendem a ser mais firmes e menos quebradiços, enquanto queijos com baixa coesividade podem se desmanchar ou esfarelar com mais facilidade. A coesividade é afetada por fatores como a composição do leite utilizado para a fabricação do queijo, o processo de fabricação e o grau de

maturação (Kumar *et al.*, 2019).

Houve diferença significativa para coesividade com o passar do tempo durante o período de maturação ($p < 0,05$), em todos os queijos avaliados. Durante a maturação, ocorrem mudanças químicas que afetam a estrutura do queijo. Essas alterações podem afetar a forma como as partículas se ligam, influenciando a coesividade (Fox *et al.*, 1998). Com o passar do tempo é esperado que os queijos duros tipo grana fiquem mais quebradiços, pois uma de suas características é teor de umidade reduzido, tornando assim a estrutura do queijo mais seca e firme, resultando em uma textura quebradiça ou granular (Molina *et al.*, 2017).

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos analisados, e ao final do período de maturação de 180 dias o queijo produzido com LE com adição de CaCl_2 foi o que se mostrou mais adesivo, enquanto o queijo produzido com LE sem adição de CaCl_2 apresentou a menor adesividade (Tabela 10).

Tabela 10 - Adesividade (N.s) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.

Maturação (dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	-0,08 ^{Cb} ±0,05	-0,02 ^{Ad} ±0,02	-0,03 ^{Bc} ±0,01	-0,19 ^{Ba} ±0,28
30	-0,02 ^{Aa} ±0,01	-0,01 ^{Bb} ±0,01	-0,02 ^{Aa} ±0,01	-0,02 ^{Da} ±0,07
60	-0,01 ^{Bb} ±0,30	-0,02 ^{Aa} ±0,01	-0,02 ^{Aa} ±0,20	-0,00 ^{Ec} ±0,04
90	-0,01 ^{Ba} ±0,01	-0,01 ^{Ba} ±0,16	-0,12 ^{Db} ±0,04	-0,03 ^{Ac} ±0,01
120	-0,02 ^{Ad} ±0,01	-0,07 ^{Cb} ±0,03	-0,47 ^{Ca} ±0,21	-0,03 ^{Ac} ±0,02
150	-0,04 ^{Ec} ±0,04	-0,05 ^{Db} ±0,03	-0,03 ^{Bd} ±0,01	-0,09 ^{Ca} ±0,05
180	-0,05 ^{Da} ±0,06	-0,01 ^{Bd} ±0,00	-0,03 ^{Ac} ±0,01	-0,02 ^{Ab} ±0,01

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

A adesividade é definida como o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e outras superfícies em que o alimento entra em contato (Fox *et al.*, 2017), ou seja, é a capacidade do queijo de aderir a outras superfícies, como os dentes, a língua ou outros alimentos. Essa propriedade é importante na experiência sensorial e pode influenciar a percepção de textura e sabor. Assim, queijos com alta adesividade podem ter uma sensação pegajosa ou cremosa na boca, enquanto queijos com baixa adesividade podem ser

mais secos e quebradiços (Kumar *et al.*, 2019). Os queijos duros tipo grana tem uma baixa adesividade, ou seja, devido ao seu baixo teor de umidade e à estrutura densa, esse queijo tende a ser menos adesivo (Guerreiro *et al.*, 2018).

A elasticidade se refere à capacidade do queijo de retornar à sua forma original após esticado ou comprimido (Fox *et al.*, 2004). Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos avaliados (Tabela 11), e o queijo que apresentou maior elasticidade ao final da maturação foi o produzido com LE com CaCl_2 , e o que apresentou menor elasticidade foi o queijo produzido com LINA com CaCl_2 . A elasticidade dos queijos duros tipo grana é geralmente baixa em comparação com queijos mais macios, como muçarela ou queijo coalho por exemplo. É um queijo duro e seco, com baixo teor de umidade, possui uma estrutura densa, ou seja, não é elástico e não retorna à forma original após esticado (Kumar *et al.*, 2019).

Tabela 11 - Elasticidade* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.

Maturação (Dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	0,79 ^{Bd} ±0,01	0,87 ^{Ba} ±0,02	0,85 ^{Ab} ±0,20	0,84 ^{Ac} ±0,02
30	0,79 ^{Ba} ±0,01	0,75 ^{Eb} ±0,04	0,74 ^{Cc} ±0,03	0,68 ^{Bd} ±0,06
60	0,77 ^{Fc} ±0,30	0,74 ^{Fd} ±0,02	0,84 ^{Ba} ±0,02	0,78 ^{Cb} ±0,03
90	0,86 ^{Aa} ±0,01	0,83 ^{Cb} ±0,07	0,76 ^{Dc} ±0,02	0,73 ^{Dd} ±0,08
120	0,80 ^{Ea} ±0,02	0,80 ^{Da} ±0,10	0,72 ^{Eb} ±0,01	0,68 ^{Bc} ±0,03
150	0,85 ^{Db} ±0,02	0,82 ^{Aa} ±0,08	0,69 ^{Fc} ±0,03	0,82 ^{Aa} ±0,00
180	0,86 ^{Ca} ±0,10A	0,82 ^{Ab} ±0,02	0,67 ^{Gc} ±0,05	0,79 ^{Ad} ±0,03

* Adimensional. Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

Houve diferenças significativas em relação ao tempo ($p < 0,05$), nas quais o queijo produzido com leite estável (LE) e adição de CaCl_2 apresentou tendência de aumento da elasticidade ao longo da maturação, alcançando valores superiores ao do dia 0. Por outro lado, os demais queijos apresentaram tendência de redução da elasticidade, como geralmente é esperado em queijos duros durante a maturação (Huang *et al.*, 2016). Esse comportamento atípico observado no queijo com CaCl_2 pode estar relacionado ao papel do cálcio na formação e estabilização da rede proteica durante a coagulação, pois aumenta a concentração de cálcio

iônico, promovendo maior ligação entre as micelas de caseína e formando uma matriz proteica mais coesa. Essa estrutura inicial mais firme pode ter favorecido uma retenção mais eficiente de umidade e gordura, além de oferecer maior resistência à contração da massa durante os primeiros estágios de maturação. Com isso, a perda de elasticidade, normalmente associada à desidratação progressiva e à intensificação da proteólise, pode ter sido atenuada (Molina *et al.*, 2017).

A ação das enzimas proteolíticas sobre essa matriz reforçada pode ter ocorrido de maneira mais controlada, resultando na formação de peptídeos menores e hidrossolúveis que contribuem para uma textura mais flexível, ao invés de quebradiça. A modificação local de propriedades físico-químicas como o pH e a atividade de água (A_w), causada pela presença do cálcio, também pode ter favorecido essa característica. Nos demais tratamentos, especialmente na ausência de CaCl_2 , a formação da coalhada pode ter sido menos eficiente, resultando em uma rede proteica mais frágil e propensa à contração e à perda de umidade. Esse processo favorece o endurecimento da massa e a redução da elasticidade com o tempo, o que está de acordo com a literatura para queijos duros, nos quais a maturação é geralmente acompanhada de maior firmeza e textura mais quebradiça (Huang *et al.*, 2016; Molina *et al.*, 2017).

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos avaliados quanto à mastigabilidade, com destaque para o queijo produzido com leite estável (LE) sem CaCl_2 , que apresentou os maiores valores desse parâmetro ao final da maturação, ou seja, foi o mais fácil de mastigar. Em contraste, o queijo produzido com leite instável não ácido (LINA) sem CaCl_2 apresentou menor mastigabilidade, sendo o mais difícil de mastigar entre os analisados. Também foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo, com tendência geral de aumento da mastigabilidade durante a maturação para todos os queijos.

A mastigabilidade é definida como a energia requerida para mastigar um alimento sólido até o ponto de deglutição, sendo calculada com base na interação entre dureza, coesividade e elasticidade (Guerreiro *et al.*, 2018). No caso de queijos duros como o tipo grana, é esperado que apresentem maior resistência à mastigação devido à sua estrutura compacta e menor teor de umidade (Fox *et al.*, 2017). As diferenças entre os tratamentos podem ser atribuídas principalmente à qualidade da coagulação inicial e ao comportamento da matriz proteica durante a maturação. O queijo LE sem CaCl_2 , apesar de não contar com a adição do sal de cálcio, teve como base um leite estável, o que favoreceu uma coagulação mais natural e uma estrutura proteica menos rígida e mais homogênea. Esse perfil contribui para uma textura mais suave e fácil de romper durante a mastigação.

Por outro lado, o queijo produzido com LINA sem CaCl_2 apresentou uma matriz menos

coesa e mais instável desde a coagulação, resultado da instabilidade proteica do leite. Essa condição pode levar à formação de agregados irregulares de caseína e à maior perda de umidade durante a maturação, fatores que contribuem para uma textura mais seca, compacta e de difícil mastigação (Fox *et al.*, 2017). A tendência de aumento da mastigabilidade ao longo do tempo para todos os queijos avaliados pode estar relacionada à ação das enzimas proteolíticas e à microflora durante a maturação. Esses agentes promovem a quebra parcial das proteínas da matriz, o que gradualmente reduz a rigidez estrutural e facilita a fragmentação do queijo durante a mastigação (Molina *et al.*, 2017). Entretanto, a extensão desse efeito depende diretamente da estrutura inicial do queijo e de sua composição, justificando as variações entre os diferentes tratamentos.

Tabela 12 - Mastigabilidade (N) dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.

Maturação (dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	7,76 ^{Ed} ±2,94	8,61 ^{Gb} ±1,79	8,90 ^{Ga} ±0,88	8,31 ^{Gc} ±1,41
30	26,70 ^{Da} ±3,06	17,58 ^{Fc} ±3,27	9,88 ^{Fd} ±0,54	19,17 ^{Fb} ±0,27
60	45,65 ^{Ca} ±2,31	29,92 ^{Eb} ±2,40	22,06 ^{Bc} ±1,08	29,20 ^{Eb} ±3,61
90	62,87 ^{Ba} ±2,48	40,83 ^{Db} ±1,61	39,37 ^{Dc} ±3,27	39,79 ^{Cc} ±1,34
120	69,24 ^{Ab} ±1,19	64,70 ^{Cd} ±2,46	66,22 ^{Bc} ±2,41	81,64 ^{Aa} ±3,17
150	70,92 ^{Ab} ±2,04	72,54 ^{Ba} ±1,39	61,90 ^{Cd} ±1,97	66,18 ^{Bc} ±1,48
180	61,88 ^{Bc} ±0,94	88,22 ^{Aa} ±2,03	71,04 ^{Ab} ±2,95	37,77 ^{Dd} ±3,87

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos avaliados quanto à resiliência, com destaque para o queijo produzido com leite estável (LE) com adição de CaCl_2 , que apresentou os maiores valores ao final do período de maturação. Por outro lado, o menor valor de resiliência foi observado no queijo produzido com leite instável não ácido (LINA) sem CaCl_2 . Também foram verificadas diferenças em função do tempo, com tendência à redução da resiliência ao longo do processo de maturação, principalmente nos queijos produzidos com

LINA (com e sem CaCl_2) e no queijo LE sem CaCl_2 .

A resiliência de um queijo representa sua capacidade de retornar parcialmente à forma original após sofrer deformação por compressão. Essa característica depende diretamente da estrutura tridimensional da rede proteica formada durante a coagulação e da sua integridade ao longo da maturação (Fox *et al.*, 2004). A maior resiliência observada no queijo LE com CaCl_2 pode ser atribuída à combinação de dois fatores: estabilidade proteica do leite e adição de íons cálcio. O cálcio é fundamental para a formação de pontes entre micelas de caseína durante a coagulação, proporcionando uma matriz mais coesa e elástica. A presença do CaCl_2 favorece ligações intermoleculares estáveis, o que melhora a resistência e a capacidade de recuperação da estrutura frente à compressão (Guerreiro *et al.*, 2018).

Em contraste, o queijo produzido com LINA sem CaCl_2 apresentou menor resiliência, reflexo da instabilidade proteica do leite de origem e da ausência do reforço estrutural promovido pelos íons cálcio. O leite instável, mesmo não ácido, tende a formar coágulos fracos e irregulares, o que compromete a formação de uma matriz densa e elástica. Isso resulta em um queijo com menor capacidade de retornar à sua forma original após deformações (Zanela *et al.*, 2018). A diminuição da resiliência observada em alguns tratamentos ao longo do tempo pode ser explicada pela degradação proteica característica da maturação. Durante esse processo, enzimas proteolíticas oriundas de microrganismos e da flora do coalho quebram as proteínas da matriz caseica, essa proteólise, embora essencial para o desenvolvimento de sabor e textura, afeta a integridade da rede proteica, tornando o queijo menos elástico e mais propenso à fratura (Fox *et al.*, 2017).

A desidratação progressiva durante a maturação aumenta a densidade da matriz e reduz a flexibilidade do queijo. Isso explica, por exemplo, os altos valores observados para o queijo LE com CaCl_2 em períodos intermediários, com queda posterior ao final da maturação (180 dias), possivelmente devido à intensificação da proteólise e da perda de umidade, comprometendo a recuperação elástica do queijo. O queijo duro tipo grana, devido à sua composição e processo de maturação prolongado, naturalmente apresenta menor resiliência quando comparado a queijos macios. A presença de cristais de tirosina, comum nesses queijos maturados, contribui para uma textura granulosa e firme, mas também indica uma estrutura proteica rigidamente entrelaçada, com menor capacidade de deformação reversível (Guerreiro *et al.*, 2018).

Tabela 13 - Resiliência* dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 durante o período de maturação.

Maturação (dias)	LE		LINA	
	Com	Sem	Com	Sem
0	0,33 ^{Ad} ±0,04	0,38 ^{Ac} ±0,03	0,44 ^{Ab} ±0,02	0,45 ^{Aa} ±0,01
30	0,33 ^{Aa} ±0,01	0,31 ^{Db} ±0,20	0,29 ^{Cc} ±0,01	0,23 ^{Ed} ±0,03
60	0,33 ^{Aa} ±0,01	0,29 ^{Ec} ±0,03	0,31 ^{Bb} ±0,02	0,26 ^{Cd} ±0,01
90	0,37 ^{Ca} ±0,01	0,33 ^{Bb} ±0,40	0,29 ^{Cc} ±0,02	0,26 ^{Cd} ±0,01
120	0,34 ^{Ba} ±0,02	0,26 ^{Fc} ±0,10	0,23 ^{Dd} ±0,02	0,28 ^{Bb} ±0,03
150	0,34 ^{Ba} ±0,03	0,32 ^{Cb} ±0,01	0,19 ^{Ed} ±0,02	0,24 ^{Dc} ±0,03
180	0,34 ^{Ba} ±0,01	0,32 ^{Cb} ±0,02	0,29 ^{Cc} ±0,01	0,26 ^{Ca} ±0,00

* Adimensional. Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

5.2.6 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada com 106 avaliadores consumidores, sendo 57,4 % do gênero feminino, 44,3 % do gênero masculino e 0,9% preferiram não informar. Como a análise foi realizada na universidade, a maioria dos participantes foram estudantes de graduação (43,4 %), alunos de pós-graduação (33 %), com idades entre 18 a 29 anos totalizando 61,4 % dos avaliadores, seguidos por 27,4 % de avaliadores com idades de 30 a 49 anos e 11,3 % com idades de 50 anos ou mais.

Os avaliadores que participaram da análise residem predominantemente na região Sul (95,3 %), e possuem uma média de renda salarial de 2 a 3 salários-mínimos (20,8 %), 4 a 5 salários mínimos (26,4 %) e 5 a 10 salários mínimos (21,7 %). 21,7 % dos avaliadores têm uma frequência de consumo de queijo duro tipo grana de 3 a 5 vezes na semana, 24,5 % dos avaliadores consomem de 2 a 4 vezes no mês e 31,1 % responderam que consomem esse tipo de queijo esporadicamente. O local de compra predominante dos avaliadores foi em supermercados (98,1 %).

5.2.6.1 Avaliação da aceitabilidade

A impressão global de um alimento na análise sensorial, refere-se à percepção geral do produto, considerando todos os aspectos sensoriais, como sabor, aroma, textura, aparência e o impacto visual, além disso, engloba a primeira impressão do degustador e como ele avalia o conjunto do alimento, levando em conta a harmonia entre suas características (Dutcosky, 2019). O queijo produzido com LINA com adição de CaCl_2 obteve melhor impressão global entre os avaliadores, porém, os demais queijos avaliados também obtiveram boas notas nesse quesito (Tabela 14). Quando se usam diferentes processos industriais ou ingredientes, é esperado que se observem diferenças sensoriais nos produtos, uma vez que isso tem impacto direto nas características finais do mesmo (Pollonio, 2023).

Tabela 14 – Médias hedônicas para impressão global, sabor e aceitabilidade dos queijos produzidos com leite estável (LE) e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .

	Impressão global	Sabor	% Aceitabilidade
LE com	7,34 ^{ab} ±1,61	7,23 ^b ±1,57	81,55
LE sem	7,18 ^b ±1,72	7,15 ^b ±1,75	79,77
LINA com	7,51 ^a ±1,33	7,54 ^a ±1,49	83,55
LINA sem	7,37 ^{ab} ±1,58	7,14 ^b ±1,87	81,88

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey e Socott-Knott ($p < 0,05$).

O sabor de um queijo depende do equilíbrio entre doçura, acidez, sal e amargor. Um queijo de boa qualidade geralmente apresenta um sabor bem equilibrado, sem que nenhum desses elementos se sobressaia de maneira excessiva (Fox *et al.*, 2017). O queijo produzido com LINA com adição de CaCl_2 foi o que obteve maiores notas em relação ao sabor, mas os demais queijos também obtiveram boas notas nesse atributo (Tabela 14), demonstrando que as quatro formulações estavam agradáveis na opinião dos avaliadores.

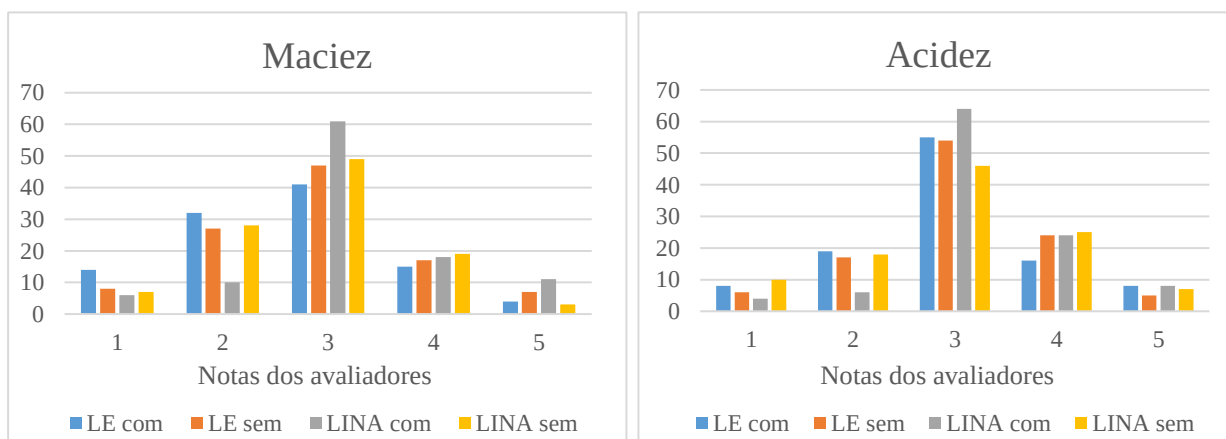
A aceitabilidade é uma expressão do maior grau de gosto de um produto, em uma escala hedônica (Lemes *et al.*, 2021) e a aparência é um atributo importante de qualidade e aceitação de produtos alimentícios, pois, geralmente, a primeira impressão do alimento é obtida a partir de uma avaliação visual pelo consumidor (Melo *et al.*, 2023). O resultado do teste de aceitabilidade (Tabela 14) demonstrou que o queijo produzido com LINA com adição de CaCl_2

obteve maior aceitabilidade entre os avaliadores, porém, os quatro queijos avaliados obtiveram boa aceitabilidade, pois de acordo com Dutcosky (2019), amostras com percentuais maiores que 70% apresentam boa aceitabilidade.

5.2.6.2 Escala do Ideal

Foi realizada a análise da escala do ideal (*Just about Right*) para os atributos sensoriais maciez e acidez. A escala do ideal é uma ferramenta usada para avaliar a intensidade de atributos sensoriais de um produto em relação ao que é considerado ideal pelos consumidores ou especialistas, baseada na percepção de um padrão de qualidade ou expectativa para determinado produto, e permite mensurar o quanto o produto se aproxima desse ideal. Na escala, quanto mais as notas se aproximam de 3, mais perto de ideal é considerada a característica avaliada no produto (Dutcosky, 2019). Observou-se que os queijos produzidos com LINA com adição de CaCl_2 , foram os que os avaliadores consideraram mais próximos do ideal quanto a maciez e acidez (Gráfico 8), porém, pode-se observar que todos os queijos estão próximos do ideal para esses dois atributos sensoriais.

Gráfico 8 - Pontuações escala do ideal para o atributo maciez e acidez dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .



Notas dos avaliadores: 1= Abaixo do ideal, 2= Pouco abaixo do ideal, 3= Ideal, 4= Pouco acima do ideal e 5= Acima do ideal.

Um queijo ideal em termos de maciez refere-se à textura do queijo e sua capacidade de ser facilmente mordido ou derretido na boca, e isso irá depender da umidade, maturação e composição do queijo (Bertola *et al.*, 2020). Já em termos de acidez, significa que o queijo tem

um nível equilibrado de acidez láctica, o que influencia diretamente seu sabor, uma acidez agradável traz frescor e leveza, sem ser excessivamente azeda ou agressiva (Burgé *et al.*, 2020). Queijos muito ácidos podem ser picantes ou amargos, enquanto queijos com pouca acidez podem parecer insossos (Lava *et al.*, 2022). Sendo assim, é importante considerar o equilíbrio entre maciez e acidez e como essas características se complementam para criar uma experiência sensorial agradável.

Os queijos duros tipo grana possuem uma acidez bem equilibrada e uma textura firme, mas ainda assim podem ser considerados "macios" no sentido de que se desmancham na boca devido à maturação prolongada (Ribeiro *et al.*, 2021). Durante o período de maturação (mínimo de 6 meses), a lactose é totalmente transformada em ácido láctico, resultando em um sabor levemente ácido, porém não agressivo (Zheng *et al.*, 2018). Diferente de queijos cremosos, o queijo duro tipo grana possui uma textura granulosa e quebradiça (Mason *et al.*, 2015), que ocorre devido à cristalização de aminoácidos, como a tirosina, que forma pequenos pontos no queijo (Luykx *et al.*, 2021). Apesar de ser um queijo duro, a gordura e os cristais fazem com que ele se dissolva lentamente na boca, proporcionando uma sensação aveludada (Fox *et al.*, 2017).

5.2.6.3 RATA – rate all that apply

A realização de um teste descritivo ajuda a entender quais características dos queijos influenciaram nas avaliações obtidas nos testes de aceitação e intenção de compra (Civille *et al.*, 2024). O *rate-all-that-apply* (RATA) é um teste que permite aos consumidores avaliarem a intensidade dos atributos descritivos das amostras (Ares *et al.*, 2022).

Percebe-se que os quatro queijos avaliados (Tabela 16) obtiveram intensidade de cor amarela e massa homogênea semelhantes ($p > 0,05$) com notas que correspondem a moderadamente intenso. A intensidade da cor amarela em queijos está diretamente relacionada à composição do leite, alimentação das vacas e maturação (Guerreiro *et al.*, 2018). A cor amarela dos queijos vem do β -caroteno, um pigmento natural presente no leite que é solúvel em gordura, então, queijos com mais gordura retêm mais pigmento e tendem a parecer mais amarelos (Pereira *et al.*, 2023). Além disso, durante a maturação, a cor do queijo pode intensificar-se devido à concentração dos pigmentos lipossolúveis e à perda de umidade, assim, queijos mais jovens tendem a ser menos amarelos do que os mais maturados (Silva, 2023). Tons

mais amarelos nos queijos são geralmente associados a queijos de alta qualidade e longa maturação (Pereira *et al.*, 2023).

A homogeneidade da massa em queijos, é um parâmetro sensorial essencial, que influencia a percepção da qualidade e maturação do produto (Poveda; Cabezas 2021). Um queijo duro tipo grana com massa homogênea apresenta: distribuição uniforme de cor, textura e estrutura interna; ausência de grandes olhaduras, fendas ou irregularidades na massa; consistência equilibrada entre a parte central e as bordas do queijo e cristais de tirosina distribuídos de forma homogênea sem comprometer a textura do queijo (Bertoni *et al.*, 2023).

Tabela 15 - Média da intensidade dos atributos avaliados pelo RATA para os queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .

Atributos	Amostras				P valor
	LE com	LE sem	LINA com	LINA sem	
Cor amarela	7,28 ^a ±1,23	7,47 ^a ±1,11	7,24 ^a ±1,40	7,31 ^a ±1,37	1,289
Massa homogênea	7,52 ^a ±1,09	7,29 ^a ±1,19	7,52 ^a ±1,16	7,61 ^a ±1,15	0,965
Odor adocicado	6,89 ^a ±6,13	6,29 ^c ±1,70	6,22 ^d ±1,95	6,70 ^b ±1,38	0,001
Odor picante	4,74 ^d ±1,37	4,85 ^c ±1,16	4,95 ^b ±2,47	5,64 ^a ±1,02	0,000
Odor de manteiga	6,14 ^a ±1,84	6,31 ^a ±1,55	6,24 ^a ±1,87	6,50 ^a ±1,87	0,643
Sabor adocicado	5,60 ^d ±1,72	6,28 ^b ±1,94	6,12 ^c ±1,72	6,49 ^a ±1,64	0,003
Sabor característico	7,39 ^b ±1,21	7,33 ^c ±1,20	7,48 ^a ±1,25	7,41 ^b ±1,14	0,001
Sabor amanteigado	6,63 ^c ±1,60	6,50 ^d ±1,81	8,03 ^a ±9,46	6,87 ^b ±1,60	0,014
Gosto resi.ácido	6,19 ^c ±2,00	6,32 ^a ±1,76	5,86 ^d ±2,27	6,28 ^b ±2,13	0,001
Gosto ácido	5,30 ^c ±1,67	5,32 ^c ±1,82	5,46 ^b ±2,01	5,85 ^a ±1,81	0,025
Gosto doce	5,45 ^d ±1,90	5,88 ^a ±1,73	5,81 ^b ±1,82	5,54 ^c ±2,09	0,002
Gosto amargo	4,80 ^c ±2,31	4,14 ^d ±2,11	5,13 ^b ±2,23	6,06 ^a ±1,69	0,001
Dureza	6,07 ^a ±1,68	5,46 ^b ±1,78	6,09 ^a ±1,82	6,10 ^a ±1,61	0,012
Gorduroso	5,48 ^a ±1,73	4,92 ^c ±1,79	5,04 ^b ±1,93	5,50 ^a ±2,12	0,005
Textura granular	6,51 ^a ±1,68	6,32 ^a ±1,48	6,17 ^a ±2,02	6,51 ^a ±1,75	0,055

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey e Socioott- Knott ($p < 0,05$).

Todos os queijos avaliados obtiveram odor adocicado ligeiramente intenso, tendo diferenças significativas de intensidade entre eles ($p < 0,05$). Os queijos produzidos com LE com adição de CaCl_2 , foi o que obteve uma maior percepção de odor adocicado pelos avaliadores e

o produzido com LINA com adição de CaCl_2 a menor intensidade. A adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) na fabricação de queijos não contribui diretamente para um aroma mais adocicado, mas pode indiretamente influenciar a textura e a fermentação, o que pode impactar o perfil aromático final (Guinee *et al.*, 2023).

Os queijos duros tipo grana desenvolvem um odor adocicado devido a fatores bioquímicos e tecnológicos que ocorrem durante a maturação, ou seja, esse aroma é resultado da interação entre proteínas, gorduras e açúcares presentes no leite (Lava *et al.*, 2022). Durante a maturação, as proteínas do leite são quebradas em peptídeos e aminoácidos livres por enzimas bacterianas e alguns desses aminoácidos, como a metionina e a fenilalanina, podem gerar compostos voláteis que têm um aroma levemente doce, lembrando nozes, caramelo ou baunilha (Biasioli *et al.*, 2023). Além disso, também durante a maturação, ocorre a degradação de açúcares e proteínas, que contribui para notas caramelizadas, assim, quanto mais longo o processo de maturação, mais intensos são os compostos voláteis adocicados (Ganesan *et al.*, 2023).

O queijo produzido com LINA com CaCl_2 recebeu intensidade intermediária para odor picante, enquanto os demais queijos receberam a intensidade ligeiramente fraco para esse atributo. O odor picante do queijo duro tipo grana pode variar conforme o tempo de maturação. Queijos mais jovens tendem a ser mais suaves, enquanto os mais maturados apresentam um aroma mais pungente e marcante (Riva *et al.*, 2023), como os queijos analisados foram maturados por seis meses esse aroma ficou mais suave. Resconi *et al.*, (2023) observaram em seu estudo, que queijos com 6 meses de maturação apresentaram um aroma mais suave e equilibrado, enquanto aqueles com 24 meses ou mais, mostraram um perfil mais pungente e marcante.

Os avaliadores perceberam um odor de manteiga ligeiramente intenso em todos os queijos analisados. O odor de manteiga é desejável nos queijos duro tipo grana, desde que esteja em equilíbrio com os demais aromas e não se sobressaia de maneira dominante (Bertuzzi *et al.*, 2023). Rocchetti *et al.*, (2021) analisaram os compostos voláteis presentes em queijos duros tipo grana e observaram que, entre os compostos identificados, o diacetil (2,3-butanodiona) foi associado ao odor de manteiga, sendo mais perceptível em queijos com até 12 meses de maturação. A análise sensorial realizada no mesmo estudo, confirmou que o aroma amanteigado é um atributo positivo, desde que não se sobressaia sobre outros compostos como os tostados e de nozes. Os autores concluíram que em queijos com mais de 24 meses de maturação, o aroma amanteigado se torna menos perceptível, sendo substituído por notas mais intensas como picante e tostado.

Os queijos produzidos com LE com adição de CaCl_2 foram percebidos como neutros para sabor adocicado, enquanto os demais queijos foram avaliados como ligeiramente intensos para esse atributo. Um leve sabor adocicado pode ser percebido em queijos duros do tipo grana, esse dulçor não é predominante, mas faz parte da complexidade do sabor, equilibrando o umami, salgado e picante (Bertuzzi *et al.*, 2023). Além disso, queijos mais jovens (6 a 12 meses de maturação) tendem a ter um sabor mais adocicado, enquanto queijos mais maturados esse dulçor se torna mais sutil (Neviani *et al.*, 2025). O sabor adocicado no queijo duro tipo grana é esperado e desejável, mas sempre de forma equilibrada. Rocchetti *et al.*, (2024) analisaram a formação de peptídeos e aminoácidos livres durante a maturação do *Grana Padano*, e identificaram que aminoácidos como glicina, alanina e prolina são responsáveis por um sabor levemente adocicado, perceptível principalmente em queijos com menos de 12 meses de maturação. Na análise sensorial, observaram que o dulçor é suave e harmoniza com as notas salgadas e picantes, sem se tornar predominante.

O sabor característico de queijo duro foi observado como moderadamente intenso em todos os queijos avaliados, sendo o queijo produzido com LINA com CaCl_2 o que obteve as maiores notas para esse atributo. O sabor característico do queijo duro tipo grana é uma combinação equilibrada de umami, salgado moderado, leve dulçor, notas de nozes e um toque picante/amanteigado (Sforza *et al.*, 2019). O tempo de maturação influencia essas percepções, tornando o sabor mais intenso e complexo com o tempo (Neviani *et al.*, 2025).

Os avaliadores perceberam um sabor amanteigado muito intenso nos queijos produzidos com LINA com adição de CaCl_2 enquanto nos demais queijos esse sabor foi percebido como ligeiramente intenso. O LINA utilizado na fabricação desse queijo tinha um maior teor de gordura, assim, a combinação de maior teor de gordura no leite mais a adição de CaCl_2 pode ter resultado em maior concentração de ácidos graxos voláteis (intensificando o aroma de manteiga), maior retenção de diacetil, reforçando o perfil amanteigado, uma textura mais cremosa, amplificando a percepção do sabor amanteigado (Rocchetti *et al.*, 2021). Os queijos duros tipo grana podem ter um leve sabor amanteigado, mas não deve ser dominante; esse sabor é mais perceptível em queijos mais jovens e depende da maturação, da microbiota e da composição do leite (D’Incecco *et al.*, 2020).

Foi percebido um sabor residual ácido ligeiramente intenso nos queijos produzidos com LE com CaCl_2 , e LE e LINA sem CaCl_2 e neutro nos queijos produzidos com LINA com CaCl_2 . Os queijos duros tipo grana podem apresentar um leve sabor residual ácido, mas esse não deve ser um aspecto predominante (Gómez-Nieto *et al.*, 2020). A acidez nesses queijos é muito bem equilibrada, servindo mais para realçar outros sabores do que para se destacar

isoladamente (Neviani *et al.*, 2025). No início da maturação, a acidez é mais perceptível, mas conforme o queijo matura, o ácido láctico se converte em outros compostos e a sensação ácida diminui (Gobbetti *et al.*, 2019). Em queijos jovens (6-12 meses de maturação), o retrogosto pode ter um toque ácido mais evidente (Rocchetti *et al.*, 2024). Os avaliadores perceberam um gosto ácido e doce neutro em todos os queijos avaliados. Os queijos duros tipo grana, não devem apresentar gosto ácido de forma pronunciada, no entanto, podem ter uma leve acidez equilibrada, que contribui para realçar outras notas, como o umami e o salgado (Sgarbi *et al.*, 2021).

Os queijos produzidos com LINA sem CaCl_2 foram classificados como ligeiramente amargos pelos avaliadores, enquanto nos queijos produzidos com LINA com CaCl_2 esse atributo foi percebido como neutro, e nos queijos produzidos com LE com e sem CaCl_2 esse atributo foi percebido como ligeiramente fraco. Esses queijos podem apresentar um ligeiro amargor, especialmente em queijos mais maturados, no entanto, esse amargor deve ser suave e equilibrado, sem se tornar desagradável (Rocchetti *et al.*, 2024). Durante a maturação as proteínas do leite (como a caseína) são degradadas por enzimas em peptídeos menores e aminoácidos e alguns desses compostos (como a tirosina e fenilalanina) podem ter um gosto levemente amargo, o que pode contribuir para um leve toque amargo nos queijos (Gobbetti *et al.*, 2020).

Os queijos produzidos com LE sem CaCl_2 foram percebidos como neutros e os demais queijos ligeiramente intensos para dureza. É esperado e desejável que os queijos duros tipo grana sejam duros, pois a consistência firme e quebradiça faz parte das características sensoriais típicas desse tipo de queijo (Luykx *et al.*, 2021). A dureza desses queijos ocorre devido ao seu baixo teor de umidade e ao processo de maturação (mínimo de 6 meses, podendo chegar a mais de 20 meses), assim, quanto mais maturado, mais seco e duro ele se torna, desenvolvendo uma textura granular e quebradiça (Rosa *et al.*, 2019). Portanto, se um queijo duro tipo grana estiver muito macio ou flexível, pode indicar que ele não passou pelo tempo adequado de maturação ou ocorreu alguma alteração indesejada em sua conservação (Pellegrino *et al.*, 2020).

Os avaliadores perceberam os queijos produzidos com LE sem CaCl_2 como ligeiramente fracos para o atributo gorduroso e os demais queijos neutros. Esse tipo de queijo possui um teor de gordura moderado, mas são menos gordurosos do que muitos queijos macios como muçarela ou gouda (D’Incecco *et al.*, 2020). Apesar de possuir um teor de gordura moderado, não parece tão gorduroso na boca devido à baixa umidade e uma textura granulosa, além disso, não apresenta brilho intenso ou untuosidade na superfície, pois sua gordura está bem incorporada à estrutura seca do queijo e ao toque, não parece pegajoso ou oleoso (Resmini

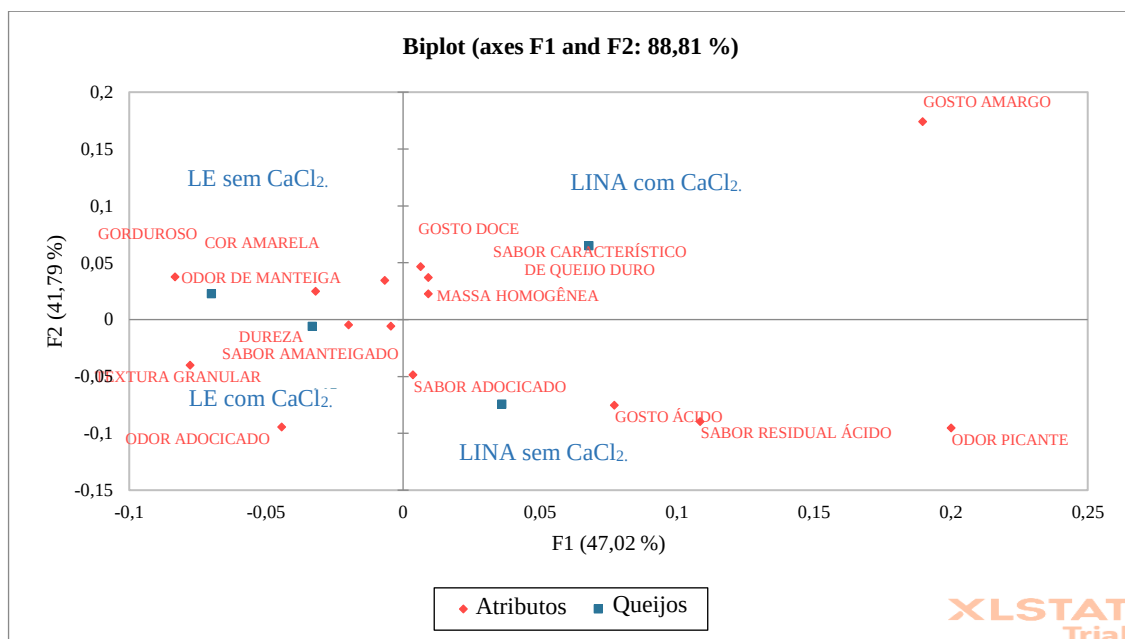
et al., 2019). O atributo gorduroso é percebido de forma leve e equilibrada, sem sensação de oleosidade excessiva, mas contribuindo para a textura aveludada quando o queijo se dissolve na boca (Bertozzi *et al.*, 2018).

Todos os queijos obtiveram notas para textura granular ligeiramente intensas. A textura granular é uma característica desejável nos queijos duros tipo grana, isso ocorre porque durante a maturação, as proteínas do queijo se quebram (proteólise), formando pequenos cristais de tirosina (Weimer *et al.*, 2021). Esses cristais são percebidos na boca como pequenos grânulos crocantes, especialmente em queijos mais maturados (Serra *et al.*, 2018). Com o tempo, a umidade do queijo diminui, tornando sua textura mais seca e quebradiça, isso acentua a sensação de granularidade ao cortar ou mastigar o queijo, portanto, a presença de uma textura ligeiramente granulada e quebradiça é um indicativo de boa maturação e alta qualidade (Hegarty *et al.*, 2021). Se um queijo desse tipo for muito liso e homogêneo, pode ser sinal de que não atingiu o tempo de maturação adequado (Bertozzi *et al.*, 2018).

A análise sensorial utilizando a escala hedônica revelou diferenças perceptíveis entre os queijos fabricados com LE e LINA, o que era esperado, dado que a composição da matéria-prima e a formulação impactam diretamente nas características sensoriais do produto final (Pollonio, 2023). No entanto, os resultados indicam que o LINA pode ser utilizado na produção de queijos duros tipo grana sem comprometer a qualidade e os atributos sensoriais característicos desse tipo de queijo. Esse achado é relevante para a indústria, pois sugere maior flexibilidade na escolha da matéria-prima sem prejuízo na aceitação do consumidor.

A análise de correspondência múltipla bidimensional explica que possivelmente existem atributos que diferenciam um queijo do outro (Figura 9). O queijo produzido com LE com adição de CaCl_2 se destaca pelos termos dureza, sabor amanteigado, odor adocicado e textura granular. Os atributos identificados sugerem que o queijo analisado se mostrou maturado e de textura firme, com um perfil de sabor complexo que combina notas amanteigadas e levemente doces, além de uma textura que pode conter cristais, proporcionando um efeito granular. Esse perfil é comum em queijos maturados, como parmesão, *Grana Padano* ou alguns gouda maturados. Sgarbi *et al.*, (2022), comparou perfis sensoriais de *Parmigiano Reggiano*, *Grana Padano* e Gouda maturado, destacando suas características comuns de textura firme e presença de cristais, além disso, apresentaram um perfil de sabor complexo, combinando notas amanteigadas, levemente doces, umami e tostadas, semelhantes ao perfil encontrado no queijo produzido com LE com adição de CaCl_2 avaliado nesse estudo.

Figura 9 - Análise de correspondência múltipla bidimensional dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .



Fonte: A autora.

Para o queijo produzido com LE sem adição de CaCl_2 destacam-se os atributos cor amarela, odor de manteiga e gorduroso. O odor de manteiga indica que o queijo liberou aromas característicos de manteiga, que podem estar associados à presença de compostos produzidos por bactérias lácticas durante a fermentação, sugerindo um perfil lácteo intenso, ou seja, aromas e sabores característicos do leite e com percepção de ser mais macio (Fox *et al.*, 2017). A percepção como gorduroso, mesmo sem apresentar untuosidade visível, pode ser explicada devido a lipólise (quebra de gorduras) durante a maturação, que libera ácidos graxos livres, que contribuem para a sensação de riqueza e cremosidade na boca (Mansur *et al.*, 2021). Esses compostos são responsáveis por notas aromáticas amanteigadas e ligeiramente adocicadas, reforçando a impressão de um queijo mais gorduroso (Zambrano *et al.*, 2022). Notas amanteigadas sutis podem ser aceitáveis e até desejáveis em queijos mais jovens, mas não devem ser dominantes, ou seja, um leve toque amanteigado pode contribuir para uma percepção de cremosidade e suavidade no paladar, se combinado com outros aromas esperados, como nozes e umami, pode enriquecer a complexidade sensorial do queijo (Bertozzi *et al.*, 2018).

O queijo produzido com LINA com adição de CaCl_2 foi descrito como massa homogênea, gosto doce, gosto amargo e sabor característico de queijo duro, indicando que a textura do queijo é uniforme, sem rachaduras, buracos ou separação de fases (Poveda; Cabezas 2021). Esse atributo é comum em queijos bem prensados e maturados, como parmesão, *Grana*

Padano e *pecorino* (Bertoni *et al.*, 2023). O gosto doce é resultado da quebra da lactose em compostos levemente adocicados durante a maturação (Fox *et al.*, 2017). O amargor percebido pelos avaliadores, pode ser decorrente de peptídeos liberados na degradação das proteínas do queijo durante a maturação. Queijos duros e maturados frequentemente apresentam um leve amargor no final da degustação, especialmente aqueles de longa maturação, como *parmesão* ou *pecorino* (Sforza *et al.*, 2019).

Para o queijo produzido com LINA sem adição de CaCl_2 destacaram-se os atributos sabor adocicado, gosto ácido, sabor residual ácido e odor picante. Se o gosto ácido persiste após a degustação, isso sugere que o queijo teve uma fermentação mais pronunciada ou um pH mais baixo (Ribeiro *et al.*, 2021). No caso desse estudo, o queijo fabricado com LINA sem adição de CaCl_2 , apresentou um pH mais baixo quando comparado com os demais queijos, e essa acidez tanto no gosto quanto no sabor residual, provavelmente se deu devido a sua acidez mais elevada. O odor picante no queijo indica compostos voláteis fortes, possivelmente provenientes da maturação (Fox *et al.*, 2017). Os atributos encontrados pelos avaliadores apontam para um queijo de perfil intenso, com equilíbrio entre doçura e acidez, e um aroma marcante e picante (Qian *et al.*, 2022).

Em suma, pode-se perceber que houve separação distinta entre as características dos queijos avaliados, o que indica que houve diferenças entre eles, devido à matéria-prima utilizada e à adição de CaCl_2 . O queijo fabricado com LE com CaCl_2 apresentou textura firme e notas amanteigadas, enquanto o queijo feito com LE sem CaCl_2 teve perfil mais lácteo e gorduroso. O LINA com CaCl_2 mostrou maturação homogênea, com dulçor e leve amargor, enquanto o LINA sem CaCl_2 destacou-se pela acidez e odor picante. Os resultados indicam que essas variáveis influenciaram a qualidade sensorial, porém, sem comprometer as características esperadas.

5.2.6.4 Intenção de compra

A intenção de compra pode ser utilizada como ferramenta de análise do mercado consumidor potencial, especialmente no caso de desenvolvimento de novos produtos (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Essa intenção é influenciada por diversos fatores perceptivos e emocionais, que são avaliados durante a experiência sensorial com o produto, foca na reação do consumidor a estímulos visuais, olfativos, gustativos e táteis, e como essas reações impactam suas decisões de compra (Ali *et al.*, 2020). A avaliação da intenção de compra é uma etapa fundamental em

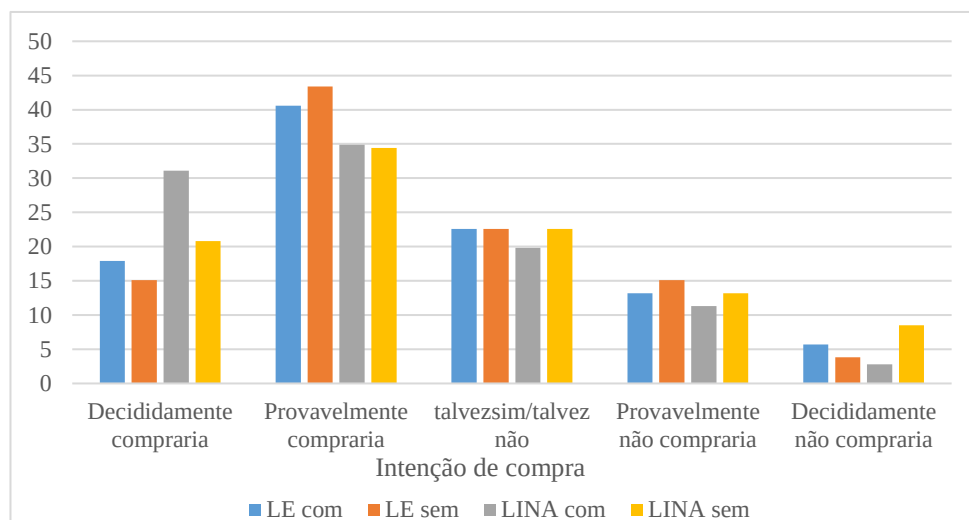
estudos de desenvolvimento de produtos alimentícios, especialmente para queijos, que apresentam grande diversidade de tipos, perfis sensoriais e processos de fabricação. Este tipo de análise fornece uma estimativa da aceitação do produto pelo consumidor final, indo além da simples avaliação sensorial dos atributos como sabor, textura, aparência e aroma. A intenção de compra está diretamente relacionada ao comportamento de consumo e pode ser um indicativo do sucesso comercial do produto no mercado.

No caso de queijos com formulações alternativas como os produzidos com leite instável não ácido (LINA) ou com diferentes aditivos tecnológicos, avaliar a intenção de compra se torna ainda mais relevante. Esses produtos podem apresentar características sensoriais distintas dos queijos convencionais, o que pode impactar positiva ou negativamente a aceitação do público. Assim, mensurar a disposição dos consumidores em adquirir o produto é essencial para validar a viabilidade mercadológica da nova formulação. Portanto, a análise da intenção de compra é uma ferramenta estratégica que complementa os dados físico-químicos e sensoriais, oferecendo uma visão mais ampla da aceitação do produto e sua real possibilidade de sucesso comercial (Dutcosky, 2019).

A intenção de compra dos avaliadores em relação às amostras dos queijos (Gráfico 9) revelou uma maior frequência de resultados entre os conceitos de “provavelmente compraria” para todos os queijos avaliados. Pode-se perceber também que, as respostas de “Decididamente eu compraria”, foram maiores para os queijos fabricados com LINA, sendo o fabricado com adição de CaCl_2 o que recebeu a maior parte das respostas.

Analisando a média das notas obtidas para cada queijo avaliado (Tabela 16) percebe-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os queijos, sendo o queijo fabricado com LINA com adição de CaCl_2 o que obteve a maior média, porém observa-se que todos os queijos tiveram médias próximas a 4 indicando que provavelmente comprariam os queijos. O resultado “Provavelmente compraria” em uma pesquisa de intenção de compra indica que os consumidores demonstraram tendência positiva em relação ao produto e sugere que o produto teve boa aceitação sensorial, mas pode haver fatores que influenciam a decisão final de compra, como por exemplo as suas preferências individuais (Dutcosky, 2019). Todos os queijos tiveram índices de aceitação positivos na intenção de compra (Tabela 16). Uma aceitação maior que 70% indica que o produto possui boa aprovação sensorial e potencial para ser bem aceito no mercado, ou seja, a formulação atende às expectativas sensoriais do público (Stone *et al.*, 2020).

Gráfico 9 - Intenção de compra dos consumidores dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .



Fonte: A autora.

Tabela 16 - Médias das notas da Intenção de compra dos consumidores dos queijos produzidos com leite estável (LE) com e sem CaCl_2 e instável não ácido (LINA) com e sem CaCl_2 .

	LE com	LE sem	LINA com	LINA sem	P valor
Notas	3,57 ^b ± 1,13	3,56 ^b ± 1,07	3,88 ^a ± 1,09	3,56 ^b ± 1,18	0,014
% Aceitação	71	71	77	71	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey e Socoott- Knott ($p < 0,05$).

6 CONCLUSÕES

A composição do LINA se mostrou diferente do LE com teor de proteína e lactose menor e maior teor de gordura, cálcio total e iônico, porém dentro dos valores exigidos pela legislação. Já as características físico-químicas foram semelhantes ao LE, tendo diferença somente na condutividade elétrica do leite causada pelo maior valor de cálcio iônico.

Os queijos produzidos com LINA com adição de CaCl_2 tiveram um maior rendimento entre todos os queijos avaliados. Já os queijos produzidos com LE que não foi adicionado CaCl_2 teve menor rendimento, mas comparando com o queijo produzido com LINA sem adição de CaCl_2 o rendimento do LINA foi maior, mostrando que o maior teor de cálcio iônico presente no LINA pode contribuir para que seja diminuída a quantidade ou até não utilizado CaCl_2 quando o queijo for produzido com esse leite, sem prejudicar o rendimento.

Algumas características físico-químicas dos queijos produzidos com LINA foram diferentes como maior pH, acidez, teor de proteína e nitrogênio total, e menores teores de umidade. As características microbiológicas não diferiram entre os queijos. As características microbiológicas foram semelhantes em todos os queijos e dentro do padrão exigido pela legislação.

O LINA interferiu no perfil de textura dos queijos deixando-os mais duros quando produzidos com CaCl_2 e com menor dureza quando produzidos sem CaCl_2 , mostrando que o queijo produzido com LINA pode ser feito sem adição de CaCl_2 . Sendo assim o LINA pode ser utilizado para produzir queijos duro tipo grana, e seu maior teor de cálcio iônico pode substituir o CaCl_2 da formulação.

A análise sensorial, mostrou que os queijos fabricados com LINA, embora tenham se mostrado diferentes dos queijos fabricados com leite estável, obtiveram uma boa impressão global, além de boa aceitação e intenção de compra pelos avaliadores.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S. **Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey**. 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 111f. Faculdade de Agronomia, UFRGS Porto Alegre, RS. 2008.
- ALI, S. B.B; REIS, M.C.A. Influência da marca na aceitação sensorial e intenção de compra de leite em pó reconstituído. **Brazilian Journal of Food Research**. v. 11, n 1, p.95-106, 2020.
- AMORIM, A. L. B. do C. **Avaliação da presença de substâncias químicas em leites cru e beneficiado produzidos e comercializados no Distrito Federal e Entorno**. 2017. Dissertação (Mestrado em saúde animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 20th ed. Washington: AOAC International, 2016.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16th Ed. Washington: AOAC. 109p, 1995.
- APHA - American Public Health Association: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. ed. Washington, p.676, 2001.
- ARCURI, E. F. O. L. et al. Consequências de diferentes níveis de células somáticas no leite sobre a qualidade do queijo Prato. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 45:68–76, 1990.
- ARES, G., VARELA, P., JAEGER, S. R. Analysis of rate-all-that-apply (RATA) data for sensory characterization: A review. **Food Quality and Preference**, v. 98, p.104539, 2022.
- ARGOV-ARGAMAN N, et al. Elevated concentrate-to-forage ratio in dairy cow rations is associated with a shift in the diameter of milk fat globules and remodeling of their membranes. **Journal of Dairy Science**. v. 97, n.10, p.6286-6295, 2014.
- AZAMBUJA, M.G.R.A. **Incidência do leite instável não ácido em rebanhos leiteiros no sudoeste do Paraná**. 2018. Dissertação, (Mestrado em Zootecnia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.
- BARBOSA, I.M. **Utilização do colostro bovino na produção de queijos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2020.
- BARBOSA, R. S. et al. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p.621–628, 2012.

BARBOSA, F. A. et al. Efeito do tempo de lactação sobre as concentrações de cálcio no líquido intersticial de vacas Jersey. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 10, p. 1987-1994, 2009.

BARROS, J. J. C. et al. Queijo Parmesão: Caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31(2), 285–294, 2011.

BAVA, C. M., et al. Influence of Proteolysis on Texture and Flavor of Cheese: A Review. **Journal of Dairy Science**, 100(10), 7821-7836, 2017.

BELOTI, V. **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. 1 ed, Londrina: Editora Planta. p.1-410, 2015.

BERTOLA, C. et al. Influence of proteolysis on the sensory properties of Parmigiano Reggiano cheese. **Food Research International**, v. 138, p. 109757, 2020.

BERTOLINO, M. et al. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, 129, 1001-11, 2011.

BERTONI, D., LAZZI, C., & NEVIANI, E. Influence of microstructure and biochemical composition on texture and sensory perception of hard cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n.4, p. 2456-2468, 2023.

BERTOZZI, E. et al. Microbiological safety of cheese: a review. **Food Control**, v. 85, p. 1-10, 2018.

BERTUZZI, A. S. et al. Characterization of volatile compounds contributing to the aroma profile of aged Grana-style cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n.4, p. 2456-2471, 2023.

BIASIOLI, F. et al. Volatile compound formation in hard cheeses during ripening: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 132, p. 23-38, 2023.

BONFIM, I. S. et al. Effects of pH on the Texture and Microstructure of Cheese. **Journal of Dairy Research**, 87(1), 12-20, 2020.

BOUTINAUD, M. et al. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 988–998, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 249, p. 133, 26 dez. 2019. Disponível em: https://cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-60_231219.pdf. Acesso em: 14 maio 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas para produção, beneficiamento, distribuição e comercialização do leite cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 nov. 2018.

BRASIL. Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Brasília: **Diário Oficial da União (DOU)**, 13 dez. 2006.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Portaria no 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijo Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. **Diário Oficial da União (DOU)**, Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite fluido. In: MÉTODOS analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, **Diário Oficial da União (DOU)**, DF, v. II, cap. 14, 1981.

BRIGATTI, A. M. **Compost Barn e a Produtividade Leiteira**. 2014. Disponível em: <https://iepec.com/compost-barn-e-a-produtividade-leiteira/?v=19d3326f3137>. Acesso em: 10 jun. 2024.

BURGÉ, F. et al. Impact of ripening conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 1, p. 109-118, 2020.

CALVO, M. M.; GARCÍA, A.; RIVERA, M. Nutritional composition of cheeses: A review. **International Dairy Journal**, v. 77, p. 121-129, 2017.

CAMPANELLI, F. et al. Role of microbial communities in cheese ripening: Implications for flavor development in *Parmigiano Reggiano*. **International Dairy Journal**, v. 113, p. 104862, 2021.

CASTANHEIRA, E. J. Influência da Composição do Leite na Produção de Queijos. **Revista Brasileira de Ciência do Leite**, 17(1), 23-30, 2012.

CENI, G. et al. Continuous inactivation of alkaline phosphatase and *Escherichia coli* in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. **Biochemical Pharmacology**, v. 13, p. 24-28, 2016.

CHOWDHURY, M. M. et al. The role of dietary cation-anion balance on milk production and quality. **Animal Feed Science and Technology**, v. 232, p. 1-15, 2017.

CICHOSKI, A. J. et al. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28(1), 214-19, 2008.

CIPRANDI, A. et al. Ocorrência de leite instável não ácido (LINA) em uma usina de beneficiamento da região metropolitana de Porto Alegre- RS. **Veterinária em Foco**, v.9, p.128-133, 2012.

CIVILLE, G.V.; CARR, B.T.; OSDOBA, K.E. **Sensory Evaluation Techniques**. CRC Press. p.245, 2024.

COTTAM, M. et al. Control of Proteolysis in Cheese: Implications for Flavor and Texture. **International Dairy Journal**, 110, 104829, 2020.

CRUZ, A. G. et al. Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.

DA SILVA, F. L. et al. Effects of calcium chloride substitution on the physicochemical properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 90, n. 2, p. 186-190, 2023.

D'AGARO, E. et al. Consumer perception of cheese color and its implications for quality assessment. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 123-134, 2019.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DELLEY, R. A. et al. Influence of Casein Composition on Cheese Quality and Yield. **Journal of Dairy Science**, 98(7), 4589-4602, 2015.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. Qualidade físico-química, higiênico e sanitária, e composicional do leite cru. Indicadores e aplicações práticas da instrução normativa 62. **EMBRAPA**. Porto Velho- RO. 2014.

D'INCECCO, Paolo et al. Impact of extending hard-cheese ripening: A multiparameter characterization of Parmigiano reggiano cheese ripened up to 50 months. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 268, 2020.

DIONISSOPOULOS, L. et al. A characterization of inflammatory and structural markers within the rumen epithelium during grain-induced ruminal acidosis in lactating dairy cattle. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, p. 141–148, 2012.

DRAHLER, D. F.; MEDCALF, R. L. The Fibrinolytic System—More Than Fibrinolysis? **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 102–109, 2015.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. PUCPRESS, 5 ed, Coleção Exatas, v.4,

p.540, 2019.

DUTRA, E.R.P. Fundamentos básicos da produção de queijos. Juiz de Fora: **Templo**, p.160, 2017.

FAGNANI, R. et al. Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável? **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.17, n.3, p. 386-394, 2016.

FAGNANI, R. et al. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014.

FALCÃO, J. P.; LOPES, F. C.; CARVALHO, J. A. Effect of water activity on the physicochemical properties of cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4722-4730, 2018.

FARIA, P. F. de. **Ocorrência de leite instável na região semiárida do Rio Grande do Norte e sua correlação com a qualidade do leite**. Dissertação de Mestrado (Produção Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Macaíba, RN, 2015.

FARREL, H.M. et al. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. V.11, p.135-147, 2006.

FERRARI C.G.B.et al. Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1785-1791. 2007.

FISCHER, V. et al. Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. **III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira - SIMLEITE**, v. 1, n. 3, p. 45–66, 2011.

FISCHER, V. et al. Leite instável não ácido: Um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**.2ª ed. London, Wiley-Blackwell, p.476, 2010.

FOX, P. F.et al. Fundamentals of Cheese Science. **2nd ed. New York: Springer**. P.799, 2017.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677–684, 2008.

FOX, P. F.et al. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3. ed. London: Elsevier, 2004.

FOX, P. F; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic and Professional, p.478, 1998.

FRANCO, B. D. G; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, p.182, 2004.

FURTADO, M. M. **Queijos duros**. São Paulo: Ed. Setembro, p. 220, 2011a.

FURTADO, M. M. Fundamentos originais dos queijos Grana italianos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 40–50, 2011b.

FURTADO, M. M. **Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção**. 3ª Edição. São Paulo, SP, Brasil: Setembro Editora, Capítulo 10, p. 212-213, 2017.

GANESAN, B., WEIMER, B. C., & STEELE, J. L. Biochemical pathways leading to flavor compound formation in aged cheeses: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n.5, p. 1123-1140, 2023.

GÄNZLE, W. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, 2, 106-117, 2015.

GARRIDO, M. D.; REIS, R. A.; SANTOS, R. C. Water activity and its impact on cheese quality. **Food Control**, v. 76, p. 78-83, 2017.

GAUCHER, I. et al. Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 12, p. 1375-1383, 2008.

GOBBETTI, M., et al. Proteolysis and biochemical changes in Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheeses during ripening. **Food Microbiology**, v. 90, p. 103465, 2020.

GÓMEZ-NIETO, M. A. et al. Ripening changes in Grana Padano cheese analyzed by spectroscopic techniques and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125880, 2020.

GONZÁLEZ, F.H.C. **A vaca leiteira do século 21: lições de metabolismo e nutrição**. Livro eletrônico, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, p. 348, 2021.

GONZÁLEZ., F. H. D.; SILVA., C. DA S. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 3 ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2017.

GOUIN, S. et al. The relationship between cheese texture and consumer preference. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8356-8365, 2016.

GOULART, J. Q.; PICCININI, A.; PINTO, A. T. Caracterização do queijo fresco produzidos a com leite de diferentes graus de estabilidade ao etanol. **Pubvet**, v. 13, n. 12, p. 1–7, 2019.

GRANDISSON, A. S.; FORD, G. D. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield, composition and quality of cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 53, n. 4, p. 645-655, 1986.

GUERREIRO, J. R. et al. Quality parameters of Grana Padano cheese: influence of the milk source and cheese-making technology. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4567-4578, 2018.

GUINARD-FLAMENT, J. et al. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. **Reproduction, nutrition, development**, v. 5, n. 46, p. 589–598, 2006.

GUINEE, T. P., & O'KENNEDY, B. T. Role of calcium in cheese manufacture and functionality. **International Dairy Journal**, 140, 105613, 2023.

GULLÓN, P.; MENDOZA, M.; GARCÍA, M. C. The influence of the coagulation process on the fat retention in cheese production. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2019.

HEGARTY, J. W. et al. Protein breakdown and calcium lactate crystal formation in long-aged hard cheeses. **Dairy Science & Technology**, v. 100, n. 4, p. 543-556, 2021.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 5, p. 421–434, 2004.

HORNE, D. S. Advanced dairy chemistry volume 1B: Ethanol Stability and Milk Composition. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition**, v. 1, n. 4, p. 225–246, 2016.

HUANG, J. et al. Effects of aging on the texture and microstructure of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2726-2736, 2016.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ); Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 1ª versão eletrônica**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IKONEN, T. et al. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. **Journal of Dairy Science**. 87. 458-67, 2004.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S. S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**, Urbana, v. 93, n. 11, p. 4999-5009, 2010.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen, p.854p, 2005.

JENSEN, H. B. et al. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6905–6917, 2012.

JUDACEWSKI, P. et al. Quality assessment of white mold-ripened cheeses manufactured with different lactic cultures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.3831–3837, 2016.

KHATTAB, A. R. et al. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science e Technology**, v. 88, p. 343–360. 2019.

KOBLITZ, M. G. B. Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **European Journal of Nutrition**, v. 52, p. 1-24, 2013.

KUMAR, P. et al. Impact of ripening conditions on cheese texture. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 8771-8782, 2019.

LAVA, V., CALLIGARIS, S., & SPIZZO, P. Sensory properties driving consumer liking and willingness to pay for traditional cheeses: A case study on Parmigiano Reggiano. **Food Research International**, v.157, p. 111311, 2022.

LAZZAROTTO, T. C. **Estudo da viabilidade técnica na industrialização de derivados lácteos a partir da utilização de leite instável não ácido (LINA)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2013.

LEGGIERI, M., et al. The Role of Water Activity in Cheese Quality and Safety: A Review. **International Dairy Journal**, v. 88, p.1-12, 2018.

LEMES, J. S.; DOS SANTOS, G. C.; SOBREIRA, A. Testes Afetivos. **Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos**, p. 63, 2021.

LI, S. S. et al. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. **Animal**, v. 9, n. 2, p. 267–274, 2014.

LORENZEN, P. C. et al. Activities of alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 18-23, 2010.

LUYKX, D. M. A. M. et al. Crystallization in dairy products: Mechanisms and consequences. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 84-91, 2021.

MACHADO, S. C. Fatores que Afetam a Estabilidade do Leite Bovino. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

MADRIGAL, A. M., et al. Proteolysis in Cheese: Influence on Flavor Development and Texture. **Journal of Dairy Science**, 94(7), 3244-3252, 2011.

MAMEDE, A. M. et al. Influência da Textura da Coalhada na Qualidade do Queijo. **Revista Brasileira de Ciência do Leite**, 15(1), 67-75, 2010.

MANSKE, G.A. et al. Leite Instável Não-ácido: Revisão. **GETEC**, v.10, n.28, p.84-92, 2021.

MANSKE, G.A. et al. Occurrence of Unstable non-acid milk (UNAM) on commercial farms in the extreme west of Santa Catarina. **Research, Society and Development**, 9(7): 1-18, 2020.

MANSUR, A. R. et al. Characterization of volatile compounds in aged cheeses: A review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, n. 2, p. 641-655, 2021.

- MARCHEZAN, W. M.; FIALHO, S. DA S. Estresse térmico em bovinos leiteiros. 2013. **Monografia (Residência em Medicina Veterinária)** - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2013.
- MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n. 5, p. 1088–1094, 2011.
- MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2724–2730, 2010.
- MARQUES, L. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 1, p.91–97, 2007.
- MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance, milk protein composition, and stability. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4165–4178, 2019.
- MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n.4, p.1–12, 2015.
- MASON, A. et al. The effect of ripening time on the quality and sensory properties of cheese. **Food Chemistry**, v. 175, p. 87-94, 2015.
- MASTRORILLO, S. et al. Color evaluation of different types of cheese. **Food Research International**, v. 89, p. 950-957, 2016.
- MATOS, M. C. et al. Effects of Calcium Chloride on Cheese Quality and Yield. **Journal of Dairy Science**, 103(3), 2260-2269, 2020.
- MATTIELLO, C.A. et al. Rendimento industrial, eficiência de fabricação e características físico-químicas de queijo colonial produzido de leite com dois níveis de células somáticas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1916-1924, 2018.
- McCARTHY, K. A.; O'DONNELL, K. M. **Milk Production and Quality**. 2. ed. London: Wiley-Blackwell, 2015.
- MELO, K. M.V et al. Aproveitamento tecnológico do jambo vermelho (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & LM Perry) na produção de sorvete. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 12, p. e51121243858-e51121243858, 2023.
- MELO, R. R., et al. Influência da Atividade da Lipase no Sabor dos Derivados Lácteos: Um Estudo. **Journal of Dairy Research**, 89(2), 145-153, 2022.
- MÉNARD, O. et al. Calcium's role in the cheese-making process. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 201-212, 2014.

- MENDES, L.C.C. Análise da Ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em um Rebanho Leiteiro e sua Relação com a Raça e a Fase da Lactação. **VIII Sul Leite – Desafios e avanços da cadeia produtiva do leite**. P. 1-3, 2018.
- MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Food Chemistry**, v. 120, p. 87- 93, 2010.
- MITCHELL, G. E.; FREDRICK, I.A.; ROGERS, S. A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 2. Cheddar cheese from farm bulk milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 41, n. 1, p. 12-14, 1986.
- MOLINA, A. et al. Textural properties of Grana Padano cheese: influence of aging. **Dairy Science & Technology**, v. 97, n. 1, p. 95-107, 2017.
- MONFREDINI, L. et al. The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 54-63, 2012.
- MOTTA, A. S. et al. Microbiological quality of artisanal cheeses produced in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 123-130, 2019.
- MOURA, R. et al. Análise físico-química e microbiológica do leite cru comercializado em Roraima. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**, v. 11, n. 02, p. 29–38, 2017.
- NASSU, R. T. et al. The Role of Calcium Chloride in Cheese Making: Effects on Coagulation and Quality. **International Dairy Journal**, 75, 28-35, 2017.
- NEKRASOV, R. et al. Biosynthesis of milk components and vitality of cows with high and low-fat milk. **Journal of Animal Science**, v. 96, 2018.
- NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2014.
- NETO, J.P.D.M.L. **Queijos: aspectos tecnológicos**. 1. ed. Minas Gerais, 2013.
- NEVES, T.F.F. **Estabilidade do leite: Características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças Holandesa e Jersey**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual de Ponta Grossa. p.1-83, 2021.
- NEVIANI, E. et al. Microbiota of Cheese Ecosystems: A Perspective on Cheesemaking. **Foods**, v. 14, n. 5, p. 830, 2025.
- NEVIANI, E. et al. New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. **Frontiers in Food Microbiology**, v. 4, n. 36, p. 1- 14, 2013.
- NIENABER, U. H.; GUNTER, M. The role of electrolytes in milk. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 353-359, 2004.
- O'CALLAGHAN, J. et al. Changes in the pH and lactic acid bacteria during the ripening of cheese. **Dairy Science & Technology**, v. 97, n. 3, p. 361-374, 2017.

O'CONNELL, J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 3, p. 312–317, 2006.

OLIVEIRA, A. A. et al. Cryoscopic Index as a Quality Parameter in Milk: Implications for Cheese Production. **International Dairy Journal**, 110, 104825, 2020.

OLIVEIRA, J. F. et al. Impact of Whey Composition on Cheese Yield and Quality. **Journal of Dairy Science**, 102(11), 10050-10058, 2019.

OLIVEIRA, C. A. F. DE et al. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 508–515, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Rio Grande do Sul: Artmed, v. 1, 2005.

ORLANDINI, I.; TORTELLY NETO, R. Redução de impactos ambientais gerados pela bovinocultura de leite: revisão bibliográfica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 1, p. 144–156, 2020.

PAGNONI, A. et al. Proteolysis and lipolysis during ripening of Parmigiano Reggiano cheese: effects on sensory quality. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2287-2297, 2020.

PANCHAL, S. K., et al. Electrical Conductivity and Its Correlation with Other Quality Parameters of Milk. **International Journal of Dairy Technology**, 69(3), 357-363, 2016.

PAULA, J. C. J. et al. Princípios básicos de fabricação de queijos: do histórico à salga, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 19-25, 2009.

PELLEGRINO, L. et al. Structural and textural evolution of Grana Padano cheese during ripening: Effect of proteolysis and moisture content. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 1975-1987, 2020.

PEREIRA, M. L. et al. Color as an Indicator of Cheese Aging and Flavor Profile. **Dairy Science & Technology**, 103(2), 155-164, 2023.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, 293-300, 2004.

PHILIPPE, M. et al. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Le Lait**, v. 83, n. 1, p. 45–59, 2003.

PHILIPPI, S T. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição**. 2 ed revisada. Barueri: Manole, 399 p., 2014.

PINTO, C. L. O. et al. Sedimentação, atividade proteolítica e proteólise de leite UHT integral durante o armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 197–205, 2016.

PIZAIA, P. D. et al. Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de “blisters” do queijo mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 485-49, 2003.

POVEDA, J. M., & CABEZAS, L. Influence of cheese microstructure on texture and sensory perception: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n.2, p. 1232-1245, 2021.

POLLONIO, M. A. R. **Técnicas de preservação na produção de alimentos**. Editora Senac São Paulo, 2023.

QIAN, M. et al. Formation and impact of volatile compounds in aged cheeses: A review. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100895, 2022.

REPS, A. et al. Natamycin in ripening cheese. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.1, n.5, p.243-246, 2002.

RESCONI, V. C. et al. Evolution of volatile compounds and sensory attributes in Grana Padano cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, v.106, n.7, p.4561-4575, 2023.

RESMINI, P. et al. Physical and sensory properties of Grana-type cheeses: Role of fat distribution and moisture content. **International Dairy Journal**, 95, 104-112, 2019.

RIBEIRO, D. F. et al. Cheese ripening: Biochemical changes and sensory quality. **International Dairy Journal**, v. 118, p. 105-120, 2021.

RIBEIRO, M. R. E. et al. Ensaio Preliminares Sobre o Efeito Do Leite Instável Não Ácido (Lina) Na Industrialização Do Iogurte Batido. **Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Anais... Goiânia, v. 9, p. 1-3, 2006.

RIVA, M. et al. Changes in volatile compounds and sensory characteristics of long-ripened hard cheeses: A focus on Grana Padano and Parmigiano Reggiano. **Journal of Dairy Science**, v.106, n.9, p. 4876-4890, 2023.

RIVERA, M. M.; AGUILAR, A. A.; LOPEZ, R. Influence of milk composition on cheese quality. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 5, p. 375-382, 2010.

ROCCHETTI, G. et al. Rennets differing in chymosin-to-pepsin ratio shape the metabolomic and sensory profile of Grana Padano PDO cheese during ripening. **Food Research International**, v. 195, p. 114958, 2024.

ROCCHETTI, G. et al. A combined metabolomics and peptidomics approach to discriminate anomalous rind inclusion levels in Parmigiano Reggiano PDO grated hard cheese from different ripening stages, **Food Research International**, v.149, 2021.

ROGERS, S. A.; MITCHELL, G. E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 6. Cheddar cheese and skim milk yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 49, n. 2, p. 70-74, 1994.

ROSA, C. M. et al. Influence of aging on the textural properties of cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 1, p. 10-17, 2019.

ROSA, P. P. et al. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 18, n. 12, p. 1–17, 2017.

SANTOS, M. V. dos.; FONSECA, L. F. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 6 ed. São Paulo: Manole Editora, 2018.

SERRA, M. et al. Formation of crystalline particles in long-ripened hard cheeses: Relationship with proteolysis and amino acid composition. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n.5, p. 3747-3758, 2018.

SFORZA, S. et al. Cheese aging: A molecular perspective on taste and flavor. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 31-39, 2019.

SGARBI, E. et al. Proteolysis, volatile compounds, and sensory profile of long-ripened hard cheeses: A comparative study on Parmigiano Reggiano, Grana Padano, and aged Gouda. **International Dairy Journal**, v. 126, p. 105273, 2022.

SILANIKOVE, N et al. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. **BMC Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2009.

SILVA, J. A influência da cor na escolha de queijos pelo consumidor. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 12, n. 3, p. 45-52, 2023.

SILVA, L. P. D.E.et al. Análises físico-químicas de leite em um laticínio sob serviço de inspeção federal. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 21, n. 2, p. 175-187, 2019a.

SILVA, N. N.et al. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. e2018185, 2019b.

SILVA, T. O. et al. Rendimento do queijo muçarela elaborado com leite instável não ácido. **29º Congresso Brasileiro de Zootecnia**, 2019.

SILVA, F.T. Queijo Parmesão. EMBRAPA. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF, p. 1-56, 2005.

SOBRAL, D. et al. Principais defeitos em queijo minas artesanal: Uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

SOSNOWSKI, M.; ROLA, J. G.; OSEK, J. Alkaline phosphatase activity and microbiological quality of heat-treated goat milk and cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 132-136, 2016.

SOUZA, E.C. **Ocorrência e identificação de fungos deteriorantes e potencialmente produtores de micotoxinas durante o processamento e maturação do queijo Parmesão**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia em Alimentos) Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2014.

SOUZA, V. et al. Uso da condutividade elétrica do leite para detecção de mastite subclínica. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Sobral, CE Novembro, 2019.

STELWAGEN, K.; SINGH, K. The role of tight junctions in mammary gland function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 1, p. 131–138, 2013.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 5ª ed. Cambridge: Academic Press, p. 1-772, 2020.

STUMPF, M. T. et al. Mammary gland cell's tight junction permeability from dairy cows producing stable or unstable milk in the ethanol test. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 11, p. 1981–1983, 2020.

SUMMER, A. et al. Efeito do nível de células somáticas no rendimento do queijo Parmigiano Reggiano. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3456-3464, 2015.

TAKATSUI, F. **Sistema CIE LAB: Análise computacional de fotografias**. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

TRONCO, V. M. Manual de Inspeção da Qualidade do Leite. Santa Maria: UFSM, 2010.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 2, p. 167–173, 2007.

VAHCIC, N. et al. Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. **Mljekarstvo Dairy**. v. 60, n. 2, p. 77-85, 2010.

VOGES, J. G. F. et al. Relationship between farm structure and animal feed in unstable non-acid milk occurrence in planalto norte of Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, 19, 1-13, 2018.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: Do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 189–192, 1999.

WATTIAUX, M. A. Composição do leite e seu valor nutricional. In: Essenciais em Gado de Leite - **Instituto Babcock para a Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional**. Babcock. p. 73-76, 2008.

WEIMER, B. C. et al. Biochemical and structural changes during the ripening of Grana-type cheeses: Role of proteolysis and crystal formation. **International Dairy Journal**, v. 113, p. 104915.

WEMMENHOVE, E. et al. How NaCl and water content determine water activity during ripening of Gouda cheese, and the predicted effect on inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5192-5201, 2016.

WERNCKE, D. **Perfil das propriedades e ocorrência de leite instável não ácido na região do Vale do Braço do Norte, sul do estado de Santa Catarina**. Dissertação de mestrado (Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC. 2012.

WIKING, L. Milking and handling of raw milk | Influence on free fatty acids. **Reference Module in Food Science**. 2020.

WOLFSCHOON, A. F. P. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros, **Boletim do leite**, n. 661, p. 01-08, 1983.

XIMENES, L.J.F.; GABRIMAR A. M. Bovinocultura Leiteira: Melhoramento Genético-econômico. **Caderno Setorial ETENE**.ANO 3, N 52, 2018.

ZAMBRANO, M. A., et al. Profiling of volatile compounds in Grana Padano PDO cheese during ripening using HS-SPME-GC-MS. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 3120-3135, 2022.

ZANELA, M. B. et al. LINA - Leite Instável Não Ácido, **Comunicado Técnico 356 (EMBRAPA)**. Pelotas, RS, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/184058/1/COMUNICADO TECNICO-356.pdf>. Acesso em 02 de mai.de 2022.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M.E.R.; VIVIAN, F. Leite instável não ácido (LINA): Do campo a indústria. In: Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **Congresso Brasileiro De Qualidade Do Leite**, 6., 2015, Curitiba. Anais... Curitiba: CBQL, 2015.

ZANELA, M. B. et al. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1009–1013, 2009.

ZANELA, M. B. et al. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 835–840, 2006.

ZHENG, Y. et al. Changes in microbial community structure and metabolite profiles during the ripening of cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 175-185, 2018.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E QUESTIONÁRIO SENSORIAL

Avaliação Sensorial de Queijo Duro

Olá! Estamos desenvolvendo uma pesquisa sobre Avaliação Sensorial de Queijo Duro e gostaríamos da sua colaboração para responder algumas perguntas.

Esta pesquisa fará parte de um projeto de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

* Indica uma pergunta obrigatória

1. E-mail: *

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA QUESTIONÁRIO

Caro entrevistado, você é convidado (a) a preencher este questionário que faz parte de um projeto de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Sob orientação da Renata Dinnies Salem Prof^a Dr^a Renata Dinnies Salem e colaboração da Prof^a Dr^a Deise Simões da Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG (deise.rsimoies@gmail.com).

A partir da sua colaboração poderemos compreender sobre o consumo e percepção dos consumidores sobre queijo duro e seus atributos.

Caso concorde participar da pesquisa:

- I. Você é livre para, a qualquer momento, recusar-se a responder as questões que lhe causem constrangimento de qualquer natureza;
- II. Você pode deixar de participar da pesquisa a qualquer momento e não precisa apresentar justificativas em caso de desistência.
- III. Suas respostas serão mantidas em sigilo. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEPG.
- IV. Sua participação é voluntária, portanto, não receberá recompensa ou gratificação, nem pagará para participar.
- V. Será garantido o livre acesso a todas as informações e retirada de dúvidas sobre o estudo.

Obrigado por sua colaboração nessa pesquisa!

Qualquer dúvida entre em contato: (42) 99940-2849

2. Aceita participar da pesquisa? *

☐ Sim

☐ Não

Responda atentamente as perguntas:

3. Qual a sua idade:*

☐ Entre 18 e 24 anos

☐ Entre 25 e 29 anos

☐ Entre 30 e 39 anos

☐ Entre 40 e 49 anos

☐ Entre 50 e 59 anos

☐ 60 anos ou mais

4. Gênero: *

☐ Feminino

☐ Masculino

☐ Prefiro não dizer

5. Grau de escolaridade: *

☐ Ensino fundamental incompleto

☐ Ensino fundamental completo

☐ Ensino médio incompleto

☐ Ensino médio completo

☐ Ensino superior incompleto

☐ Ensino superior completo

☐ Pós-graduação

6. Região de residência: *

- ☐ Centro-Oeste
- ☐ Sudeste
- ☐ Sul
- ☐ Nordeste

7. Qual a renda mensal familiar: *

- ☐ Até 1/2 salário mínimo
- ☐ Entre 1/2 a 1 salário mínimo
- ☐ 1 a 2 salários mínimos
- ☐ 2 a 3 salários mínimos
- ☐ 3 a 5 salários mínimos
- ☐ Entre 5 a 10 salários mínimos
- ☐ Entre 10 a 20 salários mínimos
- ☐ Mais de 20 salários mínimos

Pesquisa sobre consumo:

8. Qual sua frequência de consumo de queijo duro (tipo parmesão): *

- ☐ Diariamente
- ☐ 3 a 5 vezes na semana
- ☐ 2 a 3 vezes na semana
- ☐ 2 a 4 vezes no mês
- ☐ Esporadicamente

9. Locais de compra do queijo: *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Supermercados
- ☐ Conveniências
- ☐ Lojas especializadas

ESCALA DO IDEAL:

Nessa escala você avaliará o produto com relação ao quanto ele é ideal para você com relação aos atributos solicitados.

Considere:

1= Abaixo do IDEAL

2= Pouco abaixo do IDEAL

3= IDEAL

4= Pouco acima do IDEAL

5= Acima do IDEAL

12. Avalie o quanto considera ideal a maciez de cada amostra: *

Marcar apenas uma resposta por linha.

	1	2	3	4	5
145	☐	☐	☐	☐	☐
204	☐	☐	☐	☐	☐
256	☐	☐	☐	☐	☐
301	☐	☐	☐	☐	☐

13. Avalie o quanto considera ideal a acidez das amostras: *

Marcar apenas uma resposta por linha

	1	2	3	4	5
145	☐	☐	☐	☐	☐
204	☐	☐	☐	☐	☐
256	☐	☐	☐	☐	☐
301	☐	☐	☐	☐	☐

RATA (Rate-all-that-apply)

Marque SIM para os atributos que você considera que estão presentes na amostra: Pode ser quantos você quiser. Ao lado assinale a intensidade do atributo de acordo com a escala crescente de 1 a 9 pontos, onde:

- 1= Extremamente fraco
- 2= Muito fraco
- 3= Moderadamente fraco
- 4= Ligeiramente fraco
- 5= Neutro/intermediário
- 6= Ligeiramente intenso
- 7=Moderadamente intenso
- 8= Muito intenso
- 9= Extremamente intenso

14. Na AMOSTRA 145 marque SIM nos atributos que se aplicam na amostra e ao lado a intensidade percebida.

Marque todas que se aplicam.

[illegible]

INTENÇÃO DE COMPRA:

18. Você compraria o queijo da amostra 145?

- ☐ Decididamente eu compraria
- ☐ Provavelmente eu compraria
- ☐ Talvez sim/talvez não
- ☐ Provavelmente eu não compraria
- ☐ Decididamente eu não compraria

19. Você compraria o queijo da amostra 204?

- ☐ Decididamente eu compraria
- ☐ Provavelmente eu compraria
- ☐ Talvez sim/talvez não
- ☐ Provavelmente eu não compraria
- ☐ Decididamente eu não compraria

20. Você compraria o queijo da amostra 256?

- ☐ Decididamente eu compraria
- ☐ Provavelmente eu compraria
- ☐ Talvez sim/talvez não
- ☐ Provavelmente eu não compraria
- ☐ Decididamente eu não compraria

21. Você compraria o queijo da amostra 301?

- ☐ Decididamente eu compraria
- ☐ Provavelmente eu compraria
- ☐ Talvez sim/talvez não
- ☐ Provavelmente eu não compraria
- ☐ Decididamente eu não compraria