

Licenciatura em Tecnologia Alimentar

Unidade Curricular: Projeto

Desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos com óleo essencial de Tomilho para aplicação em queijo durante a cura



20140181 Margarida Isabel Gonçalves Coelho

20130104 Soraia Isabel Caeiro Ramos

20120128 Rita Tavares Mata

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à professora Susana Dias pela sua disponibilidade e pelo seu profissionalismo quanto à ajuda que nos deu na parte de microbiologia.

À professora Marta Henriques o incentivo para trabalharmos neste projeto, e o seu acompanhamento ao longo do mesmo.

Ao professor David agradecemos por nos ter ajudado na elaboração dos queijos.

Agradecemos à Técnica Rosa e à Técnica Helena por nos terem apoiado na microbiologia.

À técnica Adélia pela sua colaboração sempre que necessário.

Queremos agradecer também o apoio fundamental da Engenheira Raquel Borges por nos ter realizado parte das análises físico-químicas.

RESUMO

No estudo realizado, foi avaliado o efeito do Tomilho-Bela-Luz (*Thymus mastichina*) como um agente antimicrobiano natural para inibir o crescimento de bolores.

O presente estudo encontra-se essencialmente dividido em material e métodos, preparação e aplicação do revestimento, análises microbiológicas, análises físico-químicas, análise sensorial e os respetivos resultados.

Foram utilizadas várias concentrações de óleo essencial de Tomilho diluído em soro de leite, obtendo assim um revestimento alternativo ao do queijo vulgar.

Palavras chave: queijo, tomilho, revestimento, microrganismos.

ÍNDICE

1. Introdução e Objetivos	6
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1 Queijo.....	7
2.2 Inovação na indústria alimentar	7
2.3 Óleos essenciais de plantas aromáticas.....	8
3. Material e Métodos	11
3.1 Processo de Fabrico do Queijo Curado Agrária	11
3.2 PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO.....	14
3.3 Amostras	15
3.4 Análises Microbiológicas.....	17
3.4.1 Quantificação de Bolores e Leveduras.....	17
3.4.2 Quantificação do Teor Microbiano Total	18
3.4.3 Quantificação de Enterobactérias.....	18
3.4.4 Quantificação de Bactérias Lácticas	18
3.5 Análises Físico-químicas.....	19
3.6 Análise sensorial	19
4. Resultados.....	20
4.1 Avaliação Microbiológica dos queijos.....	20
4.2 análises físico-químicas aos queijos.....	20
4.3 Análise Sensorial	22
5. Considerações finais.....	24
6. BIBLIOGRAFIA.....	25
7. Anexos.....	I
Contagens microbiológicas	I
Materiais e equipamentos das análises microbiológicas.....	III
Imagens.....	IV
Folha de análise sensorial	VI
Análises Físico Químicas	VII

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1,8-cineol	9
Figura 2-ÓLEO ESSENCIAL TOMILHO BELA-IUZ PLANALTO DOURADO	9
Figura 3- Fluxograma da produção do Queijo curado da ESAC	13
Figura 4- Fluxograma da produção do Queijo curado da ESAC (continuação)	14
Figura 5-Adição de revestimento de óleo essencial de Tomilho	IV
Figura 6-Corte da amostra de queijo para análise microbiológica	IV
Figura 7-Resultados dos Bolores e Leveduras no 2 tempo de cura e 1 tempo de revestimento.....	IV
Figura 8-Resultados das Bactérias Lácticas no 2 tempo de cura e 1 de revestimento	IV
Figura 9- Resultados do teor microbiano total no 1 tempo de cura e 0 tempo de revestimento.....	V
Figura 10-Queijos no 3 tempo de cura 2 de revestimento.....	V
Figura 11-Queijo no 2 tempo de cura e 1 tempo de revestimento	V
Figura 12-Amostras usadas para análise sensorial.....	V
Figura 13- folha de prova fornecida aos provadores	VI

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Organização e codificação dos tipos de queijo	15
Tabela 2-Métrica/ Tempos de análise Fases de análise e codificação destas fases	16
Tabela 3-Tabela de diluições utilizadas nas análises.....	17
Tabela 4-Avaliação microbiológica de diferentes microrganismos indicadores	20
Tabela 5- Análise do pH.....	20
Tabela 6-Análise da Acidez Titulável.....	21
Tabela 7-Análise do Aw	21
Tabela 8-Análises realizadas no início e no fim da cura	21
Tabela 9-Análises realizadas da textura no início e no fim da cura (cont.)	22
Tabela 10- ANálises realizadas da cor no início e fim da cura	22
Tabela 11-Códigos utilizados na análise sensorial.....	22
Tabela 12-Ordem de preferência dos Provadores	23
Tabela 13- 1 tempo de cura e 0 tempo de revestimento	I
Tabela 14- 2 tempo de cura e 1 tempo de revestimento	I
Tabela 15-2 tempo de cura e 1 tempo de revestimento(cont.).....	I
Tabela 16- 3 tempo de cura e 2 tempo de revestimento	I
Tabela 17-3 tempo de cura e 2 tempo de revestimento(cont.).....	II
Tabela 18- 4 tempo de cura 3 tempo de revestimento	II
Tabela 19-4 tempo de cura 3 tempo de revestimento	II
Tabela 20- MARCA E REFERÊNCIA DOS MEIOS UTILIZADOS	III
Tabela 21-Classificação do queijo quanto ao teor de Humidade	VII
Tabela 22-Classificação do queijo de acordo com % de Gordura.....	VIII

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O óleo essencial de Tomilho bela-Luz (*Thymus mastichina*), apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas bem reconhecidas, que têm sido aproveitadas durante séculos (Carvalho, et al., 2017). Estas propriedades contribuem para melhorar as características organolépticas dos alimentos bem como aumentar o seu período de conservação.

A realização deste projeto teve como principal objetivo desenvolver um revestimento antimicrobiano com óleo essencial (OE) de Tomilho Bela-luz (*Thymus mastichina*). Pretende-se que este funcione como um agente antimicrobiano natural para inibir o crescimento de bolores e leveduras na superfície do queijo, aumentando assim o seu período de conservação, sendo uma alternativa ao revestimento aplicado industrialmente, a natamicina.

Para isso foram produzidos e utilizados queijos curados na Escola Superior Agrária de Coimbra que serviram de modelo para validar a eficácia dos mesmos. Foram analisados um total de 40 queijos (10 queijos em cada caixa), 8 queijos sem qualquer tipo de revestimento, 8 queijos com aplicação de natamicina (antibiótico utilizado durante a cura e expedição para o mercado), 8 queijos com o revestimento à base de proteínas de soro de leite com 1,25 g/L de óleo essencial de tomilho, 8 queijos com revestimento cuja concentração de OE foi de 2,5 g/L e 8 queijos para análise sensorial.

Para cada tipo de queijo foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas em duplicado ao longo de 4 semanas de cura. Relativamente às análises microbiológicas o estudo baseou-se na contagem de bolores e leveduras, teor microbiano total, enterobactérias e bactérias lácticas. Nas análises físico-químicas estudámos o pH, a acidez titulável, a atividade da água (a_w), teor de humidade, cinzas, proteínas, gordura, cor e textura.

As provas sensoriais tiveram como objetivo testar se o revestimento à base de OE de tomilho influenciava o sabor e o cheiro característico do queijo. Estas apenas foram realizadas na última semana de cura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO

Segundo o *Codex Alimentarius* 283 (1978), o queijo é um produto macio, semi-duro, duro ou extra-duro que pode ou não ser amadurecido, pode ser revestido e no qual a relação proteína de soro/ caseína não exceda a do leite. Este pode ser obtido por coagulação total ou parcial da proteína do leite (total ou parcialmente desnatado), nata, soro ou leiteiro, ou de qualquer combinação destes, através da ação de coalho ou de outros agentes coagulantes apropriados, drenando parcialmente o soro resultante da coagulação, respeitando o princípio de que a elaboração do queijo resulta de uma concentração de proteína láctea. O queijo pode também ser obtido por outras técnicas de processamento resultando num produto final com características semelhantes às descritas anteriormente.

As características do queijo resultam de um conjunto de processos químicos, bioquímicos e microbiológicos, exercidas sobre o leite e os seus componentes, através de diversos fatores de transformação e agentes químicos e biológicos, inerentes ao leite, adquiridos ao longo do ciclo de transformações ou adicionados ao longo do processo de fabrico.

Os princípios básicos do fabrico de queijo são quase os mesmos para a totalidade das variedades. O processo de manufatura envolve a remoção de água do leite com o consequente aumento da concentração de proteína (de 6 a 10 vezes), gordura, minerais e vitaminas, como resultado da formação de um coágulo que, ao encolher, expelle o soro existente (Brites, et al., 2012).

Normalmente no processo de maturação o Queijo desenvolve bolores e leveduras à superfície que são indesejáveis para os consumidores. De forma a minimizar este problema há necessidade de lavar o queijo frequentemente ao longo do processo de cura, isto leva a um gasto de material e mão de obra mais elevado (água, lavagens feitas à mão).

2.2 INOVAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

A inovação é um fenómeno complexo, mas muito importante na indústria alimentar.

Se esta for entendida como o desenvolvimento de novos produtos, processos ou serviços é um instrumento importante para que as empresas se destaquem dos seus concorrentes e cumpram as expectativas do consumidor.

Mudanças importantes tais como o tipo de procura de alimentos, as questões da segurança alimentar, a utilização de produtos mais naturais, a organização da cadeia de abastecimento e um ambiente industrial cada vez mais competitivo, levam à consciencialização da importância da inovação na indústria alimentar. Um aspeto crucial sobre as atitudes dos consumidores para a inovação de produtos alimentares tradicionais é o tipo de inovação aplicada. Por norma, a inovação que visa aumentar a segurança do alimento ou fornecer ao produto benefícios importantes é aceite pelo consumidor sempre que não se alterem as características originais do mesmo. (Guterres, 2013)

Na indústria alimentar o uso de aditivos alimentares é uma prática comum. Estes são adicionados intencionalmente com finalidade tecnológica ou organolética durante o fabrico, transformação, preparação, tratamento, acondicionamento e armazenamento de um produto alimentar. Podem ou não ter valor nutritivo, mas não são normalmente consumidos isoladamente como alimentos ou utilizados como ingredientes típicos dos alimentos (ASAE, SD).

No conjunto de aditivos alimentares encontram-se as plantas aromáticas que podem ser utilizadas diretamente na confeção dos alimentos ou então aplicadas na forma de extratos e/ou óleos essenciais. Estas podem ter várias funções, tais como propriedades antimicrobianas, que ajudam na conservação de alimentos.

O uso de ervas aromáticas em diversos produtos alimentares é uma prática antiga baseada em costumes empíricos quanto ao conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico.

Na indústria alimentar, o uso de antioxidantes é uma prática comum que prevê o atraso das reações oxidativas e assim, aumentam a vida útil dos produtos alimentares.

O uso de antioxidantes sintéticos tem sido alvo de alguma controvérsia, nomeadamente por questões de saúde. Como alternativa, o uso de antioxidantes naturais é considerado uma excelente alternativa. (Filipa Carvalho, 2018)

A aplicação do óleo essencial de Tomilho Bela-luz em queijos durante a cura tem como objetivo final a prevenção de crescimento microbiano, a conservação e o controlo de microrganismos patogénicos e, por fim potenciar os benefícios resultantes das propriedades organoléticas deste óleo.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS AROMÁTICAS

Existem cerca de 350 espécies de tomilho, sendo que apenas três podem ser encontradas em Portugal como espécies autóctones. As mais usadas são Tomilho comum (*Thymus vulgaris*), o Tomilho limão (*Thymus citriodoru*) e o Tomilho bela-luz (*Thymus mastichina*).

Pertencem à família *Lamiaceae*, e normalmente são utilizadas como especiarias na alimentação e ervas medicinais (Mourão, 2012).

Os óleos essenciais isolados do Tomilho bela-luz (*Thymus mastichina*) são ricos em 1,8 cineol (57,8%) (Figura 1), limoneno (10,8%) borneol e o linalol (Figura 1).

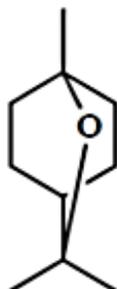


FIGURA 1-1,8-CINEOL

O 1,8-cineol é de entre os constituintes do óleo essencial de *Thymus mastichina*, o mais estudado, tendo sido realizadas substituições no seu anel aromático, na tentativa de aumentar a sua atividade antifúngica (Carvalho, 2012).

As propriedades deste óleo tem sido alvo de vários estudos científicos, nomeadamente nas propriedades dos compostos bioativos destas plantas, mais concretamente nos benefícios na saúde quando aplicados em produtos alimentares. A sua aplicação em queijos curados pode potenciar ou manter as suas características, e ao mesmo tempo pode aumentar o valor nutricional e minimizar o crescimento microbiano em certos alimentos como é o caso do queijo. Podemos observar na (Figura 2) a empresa que forneceu o Óleo essencial utilizado neste projeto.



FIGURA 2-ÓLEO ESSENCIAL TOMILHO BELA-LUZ PLANALTO DOURADO

Existem já diversos estudos sobre este óleo essencial, mais concretamente na redução do teor de sal em certos alimentos, com resultados promissores (Pereira, et al., 2018).

A primeira etapa do presente estudo foi a definição das concentrações do óleo essencial a aplicar aos queijos, tendo sido baseado no estudo Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models.

Segundo descrito no estudo a concentração de 2,5 mL é a concentração mínima para a inibição *S.aureus* e *L.monocytogenes*, enquanto que uma concentração de 1,25 mL contra a cultura de arranque. A aplicação da maior concentração (2,5 mL) obteve-se resultados favoráveis com a redução da população das bactérias em estudo, quanto à menor concentração (1,25 mL) os resultados não foram tão promissores, na medida que apenas diminui ligeiramente as contagens viáveis das bactérias. (de Carvalho, et al., 2015)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo vai ser apresentado o processo de fabrico do queijo curado, a preparação e a aplicação do revestimento do óleo essencial, a descrição e a organização das amostras, as análises microbiológicas, os procedimentos e por último as análises físico-químicas.

3.1 PROCESSO DE FABRICO DO QUEIJO CURADO AGRÁRIA

O leite de vaca (240 L) foi pasteurizado a 74 °C durante 33/34 s. Deixou-se arrefecer e foi adicionado cloreto de cálcio (0,4 mL/L), antibutírico (0,2 g/L) e dois tipos de fermento (Cultivo Mesofilo Plus – Abiasa). O cloreto de cálcio foi previamente diluído em água e só depois adicionado ao leite. O antibutírico adicionado foi o nitrato de potássio (KNO₃), que tem como função inibir o *Clostridium tyrobutiricum*. Os fermentos são os primeiros ingredientes a serem adicionados ao leite no tanque de coagulação. Estes são previamente selecionados de acordo com o tipo de queijo que se quer produzir.

A homogeneização da mistura é feita a uma temperatura de 32 °C durante cerca de 15 min.

A ação do coalho vai também exercer uma atividade importante durante a cura do queijo ao promover a quebra de algumas proteínas. O coalho utilizado foi coalho animal em pó (Carlina 1600 - Danisco) numa concentração segundo a proporção de 20 ppm. (m/V). Depois da adição do coalho, a mistura foi agitada no tanque de coagulação durante 2/3 min.

Se a coagulação for de 29 °C durante 60 a 90 minutos vai se obter um queijo de pasta mole, se a temperatura for de 33°C durante 30 a 50 minutos vai se obter um queijo de pasta dura.

Posteriormente deu-se o corte da coalhada que tem como objetivo aumentar a superfície da mesma, acelerando a eliminação do soro, pois torna mais fácil a contração dos grânulos. O corte deve ser feito no momento exato, pois um corte antecipado origina perdas de gordura e caseína no soro. Um corte realizado depois do ponto promove queijo mais seco e excessivamente duro com consistente de borracha.

O dessoramento foi realizado com o fim de reduzir a quantidade de soro no queijo. Este tem uma grande percentagem de compostos solúveis, fundamentalmente a lactose. Existem dois dessoramentos durante o processo: o primeiro ocorre ainda dentro do tanque, sendo libertada a maior quantidade de soro, o segundo ocorre após a lavagem da massa.

Depois do primeiro dessoramento lava-se a massa com água à temperatura que está no tanque de coagulação para retirar o resto de soro. A coalhada previamente escorrida

é colocada sobre tina de pré-prensagem num extremo e prensada com auxílio de placas inox para o efeito.

A massa segue para a moldagem. Nesta etapa são utilizados moldes onde é colocada a coalhada. Os fermentos são os primeiros ingredientes a serem adicionados ao leite no tanque de coagulação. Estes são previamente selecionados de acordo com o tipo de queijo que se quer produzir.

A homogeneização da mistura é feita a uma temperatura de 32 °C durante cerca de 15 min. Depois os moldes utilizados vão definir o formato do queijo. São também utilizados panos cuja finalidade é facilitar a saída do soro, ajudar na formação de uma casca lisa e completamente fechada. Estes panos podem ser de algodão ou de nylon.

Depois da moldagem os queijos passam para a prensagem mecânica que tem como objetivo finalizar o dessoramento da massa e obter a forma final do queijo. A textura do queijo está dependente desta fase, quanto mais intensa for a prensagem mais dura será a pasta do queijo.

Antes da maturação do queijo é adicionado sal através de uma salmoura. O sal melhora o sabor, aumenta a conservação do queijo, ajuda na formação da casca e controla o crescimento de alguns microrganismos. Após a salga, os queijos vão para as câmaras de maturação, onde permanecem a temperatura e teor de humidade e ventilação adequados, até atingirem as características pretendidas que variam de queijo para queijo. No nosso caso o tempo de maturação foi de 36 dias (Figura 3).

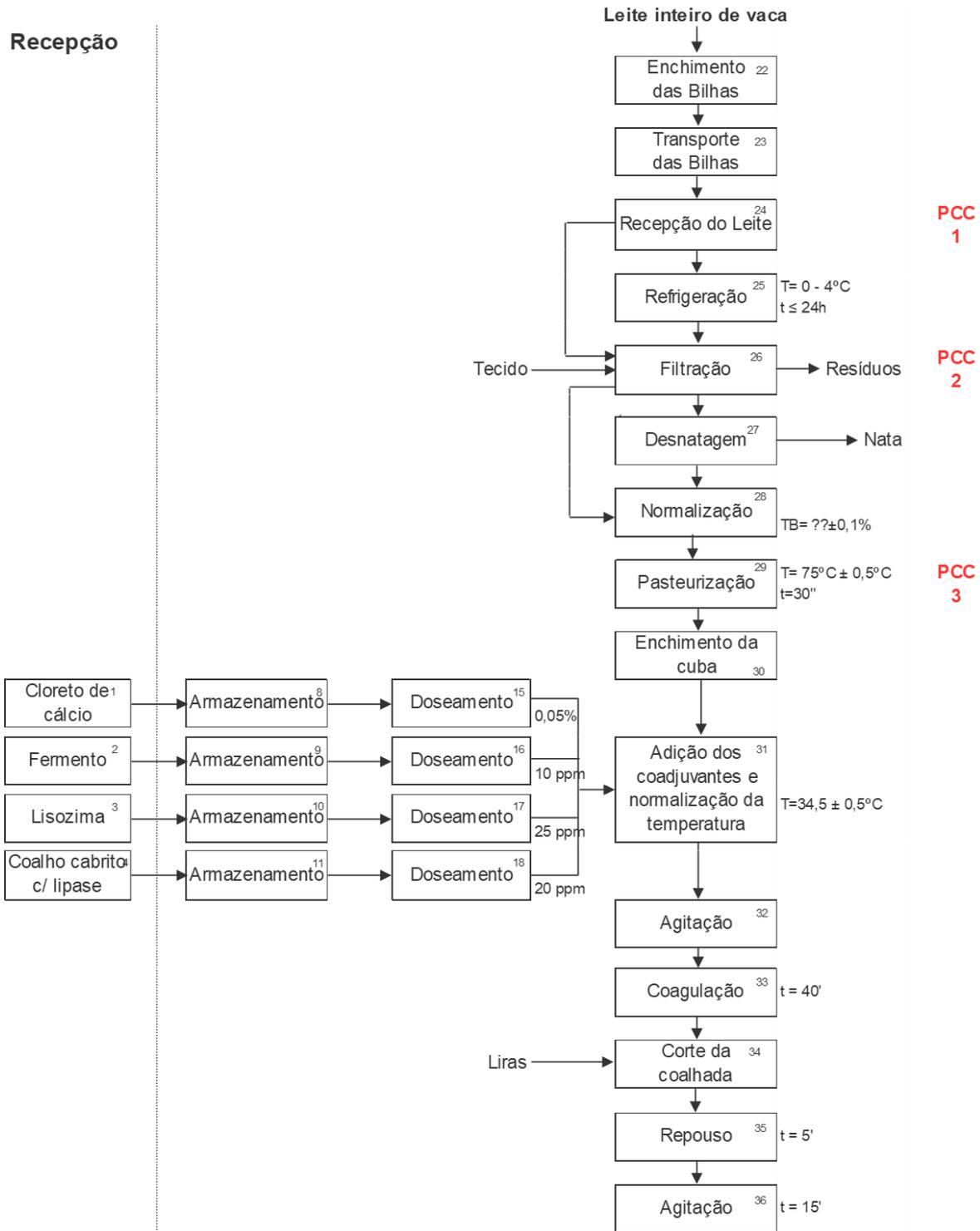


FIGURA 3- FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO QUEIJO CURADO DA ESAC

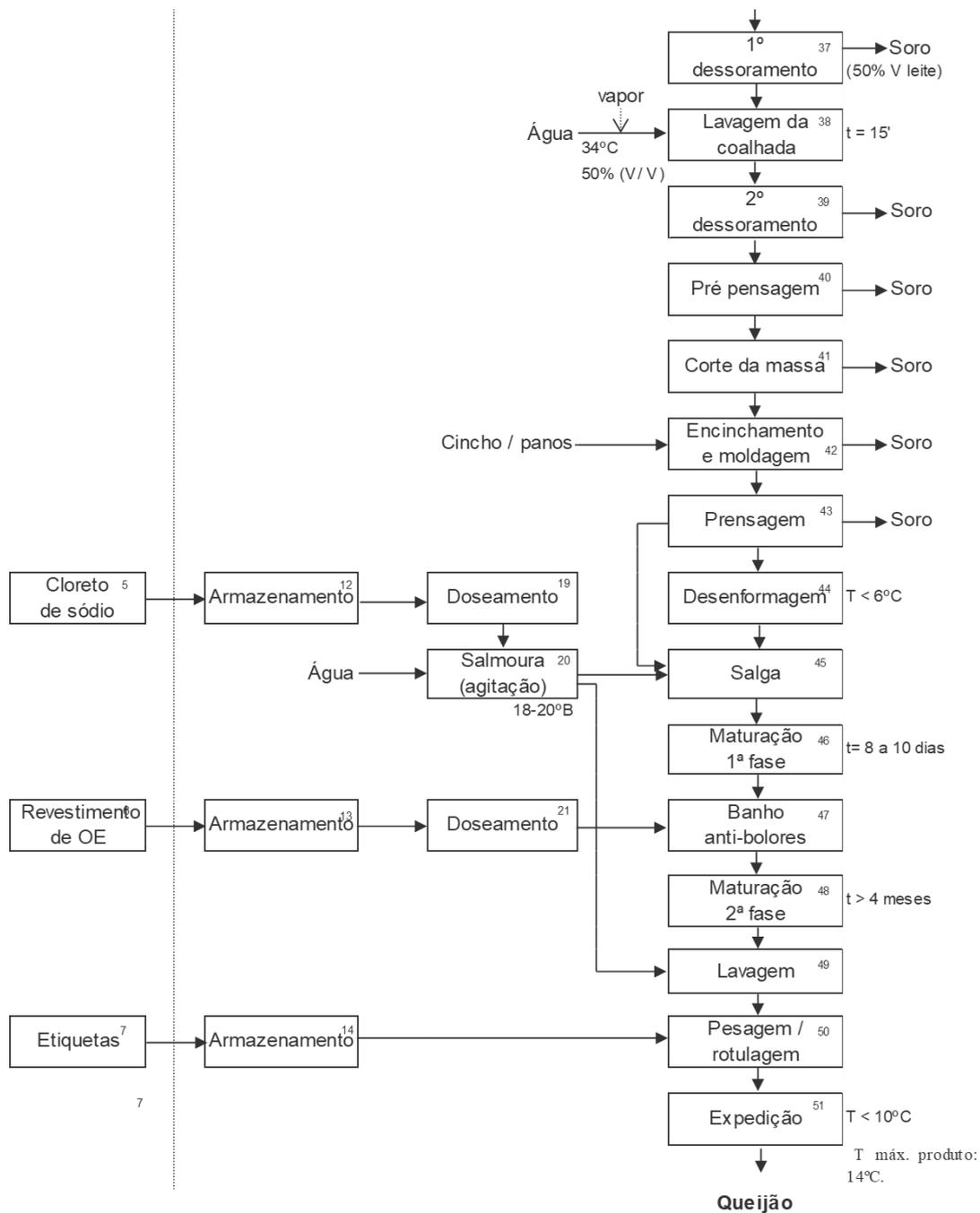


FIGURA 4- FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO QUEIJO CURADO DA ESAC (CONTINUAÇÃO)

3.2 PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO

Foi preparada solução de revestimento à base de proteínas de soro (0,5 L) com uma concentração mais elevada de OE de Tomilho bela-luz (2,5 mL/L), que foi posteriormente diluída para metade de OE de Tomilho bela-luz (1,25 mL/L) de acordo com o seguinte procedimento:

Mediram-se 990 mL de concentrado líquido de proteínas de soro (CLPS), previamente preparado, e adicionou-se 10 mL de glicerol para se obter uma concentração final no revestimento de 10%. Homogeneizou-se a solução e aqueceu-se a mistura num frasco fechado até aos 80 °C em banho termostaticado durante 15-20 min. Arrefeceu-se a mistura até aos 30 °C e separou-se 450 mL aos quais se juntou 3,5 g de Goma Guar.

Previamente foi preparada uma solução com 1,25 ml de óleo essencial e 5 mL de Tween 80. Este reagente permite aumentar a homogeneização e dispersão do OE na solução de revestimento.

Esta mistura com o OE foi adicionada à anterior obtendo-se assim a solução de revestimento mais concentrada de OE (2,5 mL de OE/L).

Levou-se a solução ao Ultra-Turrax a 10000-13000 rpm durante 2 min e esta foi utilizada para revestir 8 queijos por imersão (Figura 4).

A partir de 250 mL da solução de revestimento de 2,5 mL de OE/L adicionou-se 250 mL do resto da solução de CPLS preparada para obter a solução de revestimento menos concentrada (1,25 mL de OE/L).

Esta aplicou-se em mais 8 queijos por imersão observado no Anexo IV (Figura 5) que depois de escorridos foram colocados em grades e acondicionados na câmara de cura.

3.3 AMOSTRAS

Foram produzidos 40 Queijos Curados Agrária (10 em cada caixa) e organizados em quatro grupos. Num dos grupos de queijos não se aplicou qualquer revestimento, noutro aplicou-se natamicina e aos queijos dos restantes dois grupos foi aplicado o revestimento mais e menos concentrado em OE, respetivamente. A organização e codificação destes grupos de queijos encontra-se na (Tabela 1). A aplicação quer da natamicina quer dos revestimentos foi feita após 1 semana de cura, seguindo o processo convencional de aplicação de natamicina.

TABELA 1-ORGANIZAÇÃO E CODIFICAÇÃO DOS TIPOS DE QUEIJO

Código das amostras	Tipo de Queijo
Q	Queijo sem revestimento
QN	Queijo com natamicina
QC1,25	Queijo com revestimento (1,25 mL OE/L)
QC2,5	Queijo com revestimento (2,5 mL OE/L)

De cada um destes grupos foram retirados 2 queijos de cada, em cada uma das 4 fases de análise estabelecidas na (Tabela 2) e analisados em duplicado.

TABELA 2-MÉTRICA/ TEMPOS DE ANÁLISE FASES DE ANÁLISE E CODIFICAÇÃO DESTAS FASES

Código da Fase de análise	Fase de análise
T0	início da cura (sem aplicação dos revestimentos)
T1	1 semana de cura (logo após aplicação dos revestimentos e natamicina)
T3	3 semanas de cura (2 semanas com revestimento)
T4	4 semanas de cura (3 semanas com revestimento)

Cada amostra ficou assim codificada com a indicação do tipo de queijo e fase de análise, resultando por exemplo a amostra T0Q, que se refere às amostras de queijo sem revestimento analisada no início da cura, e a amostra T1QC1.25 que se refere às amostras de queijo com revestimento, analisada na 1ª semana de cura após aplicação de revestimento da concentração 1,25 mL/L.

3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Na preparação das amostras para a análise microbiológica pesaram-se 10 g da superfície do queijo observando no Anexo IV (Figura 6), adicionou-se 90 mL de Solução de Ringer e homogeneizou-se no stomacher durante cerca de 2 min.

A partir desta diluição inicial prepararam-se diluições decimais sucessivas, de acordo com a (Tabela 3).

TABELA 3-TABELA DE DILUIÇÕES UTILIZADAS NAS ANÁLISES

Códigos das amostras	Diluições selecionadas/parâmetro microbiológico			
	Bolores e leveduras	Bactérias lácticas	Aeróbios totais	Enterobactérias
T0	-2; -3; -4	-2; -3; -4	-2; -3; -4	-2; -3; -4
T1Q	-2; -3; -4	-2; -3; -4	-2; -3; -4	-2; -3; -4
T1QN	-1, -2, -3	-1, -2, -3	-1, -2, -3	-1, -2, -3
T1QC1,25 T1QC2,5	-1, -2, -3	-1, -2, -3	-1, -2, -3	-1, -2, -3
T3Q	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6
T3QN	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6
T3QC1,25 T3QC2,5	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6
T4Q	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6
T4QN	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6
T4QC1,25 T4QC2,5	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6	-4, -5, -6

3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS

A quantificação de bolores e leveduras foi realizada de acordo com a Norma ISO – 21527-2:2008) e permite avaliar o grau de contaminação por bolores e leveduras, visto que estes podem desenvolver-se rapidamente num produto com humidade superior a 16,5%.

1. A partir de cada diluição preparada inoculou-se 1 mL em duas caixas de Petri contendo meio Cook Rose Bengal (CRB), à razão de 0,5 mL por caixa.
2. A sementeira foi realizada por espalhamento à superfície com o auxílio de um semeador de vidro. Depois de inoculadas, as caixas de Petri foram colocadas numa estufa de incubação a 25 °C durante 5 dias.

3. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e expressaram-se os resultados finais em ufc/g de queijo observando através do Anexo IV (Figura 7).

3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR MICROBIANO TOTAL

A determinação do teor microbiano total foi realizada com base na Norma ISO 4833:2008.

A partir de cada diluição preparada e selecionada incorporou-se 1 mL por caixa de Petri sem meio;

1. Adicionou-se meio Plate Count Agar (PCA) e homogeneizou-se;
2. As caixas após incorporação foram colocadas numa estufa durante 72 h a 30 °C;
3. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e expressaram-se os resultados finais em ufc/g de queijo observando através do Anexo IV (Figura 9).

3.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

A quantificação das enterobactérias foi realizada de acordo com a Norma ISO 21528-2:2004. A informação que esta análise proporciona constitui um bom indicador das condições higieno sanitárias e da segurança microbiológica em alimentos, porque algumas espécies de enterobactérias são patogénicas.

1. A partir de cada diluição (Tabela 3) inoculou-se 0,1 mL em duas caixas de Petri contendo meio Violet Red Vile Celulose Agar (VRGB),
2. A sementeira foi realizada por espalhamento à superfície com o auxílio de um semeador de vidro. Depois de inoculadas as caixas de Petri foram colocadas numa estufa de incubação a 37 °C durante 24h.
3. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e expressaram-se os resultados finais em ufc/g de queijo.

3.4.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS

Esta quantificação realizou-se de acordo com a Norma ISO 15214:1998.

1. A partir de cada diluição preparada e selecionada inoculou-se 1 mL em cada caixa de Petri;
2. Adicionou-se o meio Man Rogosa e Sharp (MRS) e homogeneizou-se;

3. Quando sólido adicionou-se uma segunda camada de meio;
4. Posteriormente as caixas de Petri foram colocadas numa estufa 48 a 72h a 37°C.
5. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e expressaram-se os resultados finais em ufc/g do queijo observando através do Anexo IV (Figura 8).

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para as análises físico-químicas foram utilizadas as seguintes normas: Determinação do pH, determinação da Humidade, Determinação da Gordura, Determinação da Acidez, Determinação de Proteínas, Determinação de Cinzas, Determinação de A_w , Determinação da Cor e Determinação da Textura.

O crescimento dos microrganismos é influenciado por vários fatores como a disponibilidade de nutrientes, o pH, a atividade da água, a competição entre microrganismos, a temperatura e tempo de armazenamento. Cada um destes fatores atua como barreira ao desenvolvimento dos microrganismos uma vez que pode limitar, retardar ou prevenir o crescimento microbiano.

3.6 ANÁLISE SENSORIAL

Segundo a Norma Portuguesa 4263 (1994) podemos definir Análise Sensorial ou Exame Organolético como o "exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos", sendo aí, organolética definida como "qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos". A prova de análise sensorial que utilizamos no nosso estudo foi a de preferência, em que os provadores tinham de provar cada amostra antes de indicar a sua resposta.

Este tipo de teste fornece-nos uma indicação indireta sobre a intensidade de diferenças entre as amostras.

4. RESULTADOS

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores finais obtidos das análises microbiológicas, físico químicas e análise sensorial.

4.1 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS

TABELA 4-AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DIFERENTES MICRORGANISMOS INDICADORES

		Q	QN	QC1,25	QC2,5
Enterobactérias	T0	$> 300 \times 10^3$	-	-	-
	T1	$> 300 \times 10^4$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$
	T3	$2,25 \times 10^8$	$> 300 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$	$8,6 \times 10^8$
	T4	$1,5 \times 10^8$	1×10^9	$6,9 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$
Bactérias lácticas	T0	$> 300 \times 10^3$	-	-	-
	T1	$> 300 \times 10^4$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$
	T3	$> 300 \times 10^6$	$> 300 \times 10^3$	$6,5 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$
	T4	$9,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$9,7 \times 10^7$
Aeróbios totais	T0	$2,3 \times 10^3$	-	-	-
	T1	$> 300 \times 10^4$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$
	T3	$> 300 \times 10^6$			
	T4	-	-	-	-
Bolors e leveduras	T0	$6,0 \times 10^2$	-	-	-
	T1	$9,8 \times 10^4$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$	$> 300 \times 10^3$
	T3	$1,3 \times 10^8$	$6,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
	T4	-	-	-	-

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS AOS QUEIJOS

TABELA 5- ANÁLISE DO PH

Tempo de cura (semanas)	Amostras			
	Q	QN	QC1,25	QC2,5
T0	$5,3 \pm 0,04$			
T1	$5,3 \pm 0,02$	$5,2 \pm 0,04$	$5,2 \pm 0,09$	$5,3 \pm 0,02$
T3	$4,9 \pm 0,06$	$5,0 \pm 0,00$	$5,1 \pm 0,06$	$4,8 \pm 0,00$
T4	$6,2 \pm 0,10$	$6,1 \pm 0,02$	$6,6 \pm 0,04$	$6,2 \pm 0,07$

TABELA 6-ANÁLISE DA ACIDEZ TITULÁVEL

Tempo de cura (semanas)	Amostras			
	Q	QN	QC1,25	QC2,5
T0	1,08±0,01			
T1	0,70±0,071	0,64±0,052	0,64±0,018	0,23±0,032
T3	0,50±0,072	0,55±0,019	0,53±0,023	0,38±0,005
T4	0,69±0,008	0,58±0,011	0,55±0,015	0,74±0,026

TABELA 7-ANÁLISE DO AW

Tempo de cura (semanas)	Amostras			
	Q	QN	QC1,25	QC2,5
T0	83,05±1,05			
T1	78±0	81±0,1	80±0,45	81±0,95
T3	82±1,5	83±0,9	82±0,95	82±0,55
T4	76±2,6	80±1,9	78±2,0	78±1,5

TABELA 8-ANÁLISES REALIZADAS NO INÍCIO E NO FIM DA CURA

Parâmetro (%)	Tempo (semanas)	Amostras			
		Q	QN	QC1,25	QC2,5
Humidade	T0	52,0±1,09 - Queijo pasta Dura			
	T4	65,8 - Queijo Pasta Semimole	67,4 - Queijo Pasta Mole	63,5 - Queijo Pasta Semimole	62,0 - Queijo Pasta SemiDura
Gordura	T0	% G.e.s: 65,9% Queijo Extragordo			
	T4	%G.e.s.: 48,8% Queijo Gordo	%G.e.s.: 53,8% Queijo Gordo	%G.e.s.: 48,2% Queijo Gordo	%G.e.s.: 49,3% Queijo Gordo
Cinzas	T0	3,68%±0,14			
	T4	Base Seca: 6,34±0,06 Base Húmida: 3,37±0,03	0,06±0,37	7,06±0,62	0,08±0,01
Proteína	T0	Base Seca: 56,3±6,29 Base húmida: 29,3±3,27			
	T4	Base Seca: 61,6±2,80 Base Húmida: 15,9±0,18	Base Seca: 60±2,94 Base Húmida: 15,9±0,18	Base Seca: 65,4±0,45 Base Húmida: 16,7±0,12	Base Seca: 62,2±1,74 Base Húmida: 16,2±0,45

TABELA 9-ANÁLISES REALIZADAS DA TEXTURA NO INÍCIO E NO FIM DA CURA (CONT.)

Parâmetros	Tempo de Cura					
	T0		T4			
	Q a	Q b	QC1,25 a	QC1,25 b	QN a	QN b
Dureza (g)	329,4±14,9	224,7±29,7	375,9±109,3	304,05±42,95	270,55±9,25	263,65±10,65
Fracturabilidade	-	133,25±81,65	-	-	-	-
Adesividade	439,85±98,6	433,55±81,85	570,45±56,55	418,75±11,95	590,3±112,3	455,95±65,75
Coesão	0,445±0,055	0,63±0,18	0,475±0,095	0,505±0,005	0,525±0,005	0,47±0,04

TABELA 10- ANÁLISES REALIZADAS DA COR NO INÍCIO E FIM DA CURA

Tempo de Cura	Paramêtros	Amostras			
		Q	QN	QC1,25	QC2,5
T0	L*	91,3±0,909			
	A*	-3,53±0,094			
	B*	13,2 0,327			
T4	L*	75,9±1,15	80,9±1,27	71,2±0,27	73,8±0,65
	A*	-3,5±0,05	-4,05±0,2	-3,15±0,25	-3,15±0,25
	B*	18±0,05	20±1,35	16±0,075	17±1,55

4.3 ANÁLISE SENSORIAL

Neste estudo foi realizado um teste de preferência com a finalidade de que os provadores ordenassem os 4 tipos de amostras diferentes que foram apresentadas por ordem crescente, e avaliar se os provadores diferenciavam as amostras com as concentrações do OE.

As amostras, foram codificadas com números de três dígitos, de acordo com a (Tabela 11).

TABELA 11-CÓDIGOS UTILIZADOS NA ANÁLISE SENSORIAL

Código das Amostras
320 - QC1,25
403 - QC2,5
630 - QN
082 - Q

O painel de provadores foi composto por 22 pessoas.

Quanto à análise estatística dos dados foi efetuado o teste F de Friedman, tendo como hipóteses: H0: Existem diferenças nas amostras e H1: Não existem diferenças nas amostras.

Quanto ao resultado do teste de F de Friedman obtivemos o valor de 0,218. Quando comparado com o valor tabelado para um alfa de 0,05% obtivemos o resultado de 7,800.

Logo, concluímos que não rejeitamos a hipótese H0, o que nos indica que as amostras se diferenciam umas das outras, como podemos observar na seguinte (Tabela 12).

TABELA 12-ORDEM DE PREFERÊNCIA DOS PROVADORES

Ordem de preferência:

1 (menos preferida) - 320 (QC1,25)
2 - 082 (Q)
3 - 403 (QC2,5)
4 (mais preferida) - 630 (QN)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O revestimento de tomilho não teve o sucesso esperado, pois houve um desenvolvimento microbiano indesejável.

Maioritariamente as contagens obtidas para os microrganismos estudados foram superiores a 300 ufc/g, tendo vindo a aumentar ao longo do tempo de cura, sendo que as enterobactérias tiveram um pequeno decréscimo devido à sua competitividade. Todas estas contagens são superiores aos limites estabelecidos.

Relativamente à análise sensorial os provadores escolheram como segunda preferida a amostra com a concentração mais elevada, sendo este resultado positivo no desenvolvimento deste projeto.

Quanto à A_w há um ligeiro decréscimo sendo esperado porque estamos ao longo de um processo de cura.

Ao nível das Análises Físico químicas no revestimento QC1,25 e QC2,5 verifica-se um ligeiro aumento do pH sendo que ao longo do tempo de cura tanto QC1,25 e no QC2,5 aumenta o nível de acidez ligeiramente. Na acidez titulável no revestimento QC1,25 há um decréscimo (%ácido láctico) enquanto que no QC2,5 (%ácido láctico) aumenta de forma significativa. Na humidade no final da cura T4 revestimento QC1,25 é queijo pasta semi-mole e na QC2,5 é um queijo de pasta semi-dura. Na gordura no T4 o revestimento QC1,25 é um queijo gordo e na QC2,5 é um queijo gordo. No teor de cinzas no T4 o revestimento QC1,25 é maior e no QC2,5 é menor valor de minerais. Na proteína verificamos no T4 o revestimento QC1,25 apresenta maior valor e no QC2,5 é menor valor proteína.

A origem deste desenvolvimento microbiano pode ter tido várias causas, ao longo do processo da cura a câmara esteve contaminada, supõe-se que tenha sido uma das principais causas da contaminação. Na preparação do revestimento a Goma Guar não ficou bem dissolvida podendo assim ter afetado a qualidade do revestimento e sua aderência. Uma temperatura inadequada durante a preparação e conservação dos queijos, a contaminação cruzada, equipamentos e utensílios higienizados inadequadamente também podem ter tido influência no desenvolvimento microbiano.

Apesar de não existir uma correlação direta entre os resultados de uma análise a um microrganismo indicador e de microrganismos patogénicos entéricos, estes podem ser utilizados para revelar a qualidade microbiológica de determinado alimento e designadamente estabelecer o seu tempo de prateleira e a sua segurança.

6. BIBLIOGRAFIA

ASAE. SD. Aditivos alimentares. ASAE. [Online] Autoridade da Segurança Alimentar e Económica, SD. [Citação: 10 de Março de 2018.]

<http://www.asae.gov.pt/pagina.aspx?f=1&back=1&codigono=5960596361426144AAAAAAA>.

Brites, Ana, et al. 2012. *Manual de Conservação e Transformação de Produtos de Origem Animal*. Coimbra : Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2012.

Carvalho, Filipa, et al. 2017. *Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais à Base de Tomilho Bela-Luz: Um projecto com reconhecido interesse para a indústria Alimentar e para o Consumidor*. Portugal : CINEP/IPC, 2017.

Carvalho, Ricardo Manuel Simões. 2012. *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial Thymus mastichina*. Covilhã : s.n., 2012.

de Carvalho, Rayssa Juliane, et al. 2015. *Comparative inhibitory effects of Thymus vulgaris L. essential oil against Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models*. s.l. : ELSEVIER, 2015. 0740-0020.

Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David M.G.S. Gomes, Fernanda M.L. Ferreira, Susana P. Dias, Carlos J.D.

Pereira, Marta H.F. Henriques. 2018. Sciencedirect.com. *Sciencedirect.com*. [Online] Fevereiro de 2018.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114438000074>.

Guterres, Paula Cristina Matos. 2013. *Caracterização do Queijo de Mistura com Adição de Orégãos*. Castelo Branco : s.n., 2013.

Mourão, Isabel. 2012. PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS COM INTERESSE PARA SECAGEM, PRODUZIDAS NO MODO DE PRODUÇÃO BIOLÓGICO. *epam*. [Online] 2012. [Citação: 3 de Março de 2018.]

https://www.epam.pt/wp-content/uploads/2012/12/PAM_2_Isabel_Mourao_Jun2012.pdf.

Pereira, Carlos J.D, et al. 2018. *Chapter 7 – Improvement of Ripened Cheese Quality and Safety With Thymus mastichina L. Bioactive Extracts*. Coimbra : s.n., 2018.

Sousa, Isabel e Pereira, Mara Lino. 2010. ProtocolosREAx. *Repository*. [Online] 2010. [Citação: 25 de abril de 2018.] <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5742/1/Protocolos%20REAx.pdf>.

Veiga, Seliza Nancy Tavares da. 2012. *QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJOS COMERCIALIZADOS EM PORTUGAL*. Lisboa : s.n., 2012.

7. ANEXOS

CONTAGENS MICROBIOLÓGICAS

TABELA 13- 1 TEMPO DE CURA E 0 TEMPO DE REVESTIMENTO

	Q1a			Q1b		
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4
VRBG	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4
MRS	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4
PCA	72;213	32;12	1;1	200	29;16	5;6
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4
CRB	22	<30	<30	42;57	<30	<30

TABELA 14- 2 TEMPO DE CURA E 1 TEMPO DE REVESTIMENTO

	Q2a			Q2b			Q2na			Q2nb		
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-1	-2	-3
VRBG	>300	>300	>300	>300	495;113	-	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-1	-2	-3
MRS	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-1	-2	-3
PCA	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-1	-2	-3
CRB	>300	361;357	82;79	>300	202;286	14;22	>300	>300	374;>300	>300	>300	>300

TABELA 15-2 TEMPO DE CURA E 1 TEMPO DE REVESTIMENTO(CONT.)

Q2C1,25a			Q2C1,25b			Q2C2,5a			Q2C2,5b		
-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	320;389	>300	>300	>300

TABELA 16- 3 TEMPO DE CURA E 2 TEMPO DE REVESTIMENTO

	Q3a			Q3b			Q3na			Q3nb		
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
VRBG	>300	>300	1;67	>300	>300	15;30	>300	>300	>300	>300	0	280
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
MRS	>300	>300	>300	>300	>300	31	>300	>300	>300	>300	>300	91
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
PCA	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
CRB	>300	>300	214	>300	58	13	>300	116	235	62	3	3

TABELA 17-3 TEMPO DE CURA E 2 TEMPO DE REVESTIMENTO(CONT.)

Q3C1,25a			Q3C1,25b			Q3C2,5a			Q3C2,5b		
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	>300	80;63	>300	0	179;131	>300	>300	18;0	>300	>300	148,91
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	125	65	>300	>300	1	>300	>300	113	>300	>300	70
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	>300	209;234	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	>300	175	>300	>300	57;55	>300	>300	320;389	>300	>300	71;64

TABELA 18- 4 TEMPO DE CURA 3 TEMPO DE REVESTIMENTO

	Q4a			Q4b			Q4na			Q4nb		
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
VRBG	>300	>300	23;8	>300	>300	25;3	>300	>300	>300	>300	1;0	44;156
Diluições	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
MRS	>300	48;>300	6;0	>300	159;78	71;61	>300	1;83	>300	>300	14;0	>300

TABELA 19-4 TEMPO DE CURA 3 TEMPO DE REVESTIMENTO

Q4C1,25a			Q4C1,25b			Q4C2,5a			Q4C2,5b		
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	>300	16;165	>300	194;134	57;36	>300	143;36	5;3	>300	40;25	76;44
-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6	-4	-5	-6
>300	>300	22	>300	>300	0	>300	>300	80;184	>300	>300	106;9

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

- Câmara de fluxo laminar (Marca: BSC);
- Tubos de ensaio;
- Micropipetas (100 µL e 1000 µL);
- Pontas descartáveis;
- Caixas de Petri;
- Espalhador;
- Balança (Marca: VWR, Modelo: LP-2102i, d=0,01g);
- Autoclave;
- Provetas;
- Balança digital;
- Cuvetes;
- Espátula;
- Jarra de anaerobiose;
- Pipetes de plástico descartáveis (1 mL);
- Copo de precipitação;
- Bisturi;
- Erlenmeyer;
- Sacos de Stomacher;
- Sacos de Vácuo;
- Stomacher;
- Suporte de plástico;
- Microondas (worten);
- Suporte caixas de Petri;
- Papel kraft , fio de cisal e Tampa para frasco de Erlenmeyer.

TABELA 20- MARCA E REFERÊNCIA DOS MEIOS UTILIZADOS

Meio de Cultura Utilizado	Marca	Referência
Violet Red Bile Glucose Agar w/0 lactose	HIMEDIA	M581-500G
Plate Count Agar	HIMEDIA	M091-500G
Rose Bengal Choloramphenical Agar	HIMEDIA	M640-500G
Man Rogosa e Sharp	Frilabo	6140024

IMAGENS



FIGURA 6-CORTE DA AMOSTRA DE QUEIJO PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA



FIGURA 5-ADIÇÃO DE REVESTIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO



FIGURA 7-RESULTADOS DOS BOLORES E LEVEDURAS NO 2 TEMPO DE CURA E 1 TEMPO DE REVESTIMENTO

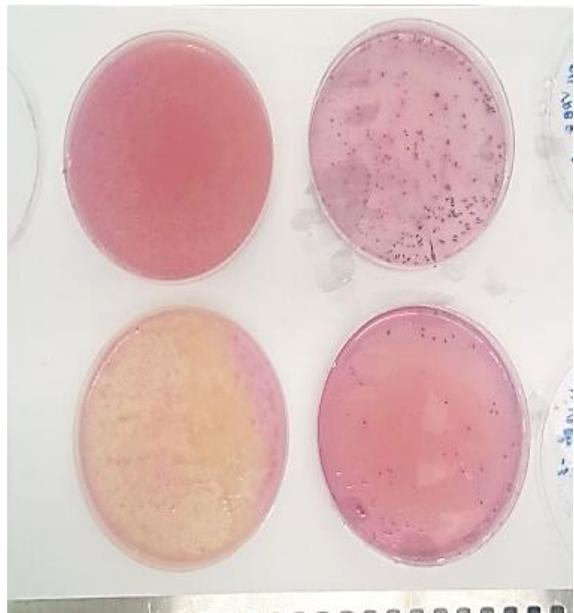


FIGURA 8-RESULTADOS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS NO 2 TEMPO DE CURA E 1 DE REVESTIMENTO



FIGURA 10-QUEIJOS NO 3 TEMPO DE CURA 2 DE REVESTIMENTO

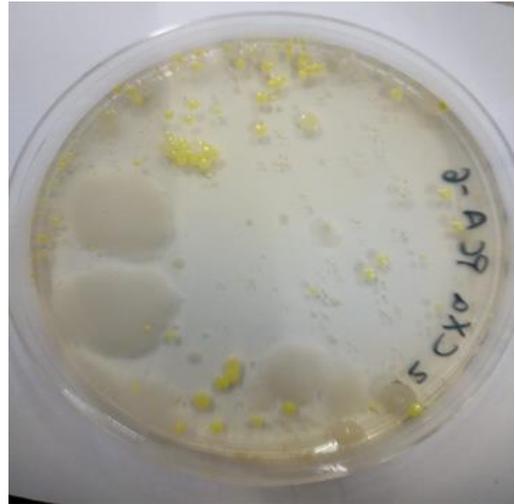


FIGURA 9- RESULTADOS DO TEOR MICROBIANO TOTAL NO 1 TEMPO DE CURA E 0 TEMPO DE REVESTIMENTO



FIGURA 11-QUEIJO NO 2 TEMPO DE CURA E 1 TEMPO DE REVESTIMENTO



FIGURA 12-AMOSTRAS USADAS PARA ANÁLISE SENSORIAL

FOLHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Sexo: _____	Data: _____		
Idade: _____			
Observe, cheire e prove as 4 amostras de queijo e ordena-as por ordem crescente de preferência:			
_____	_____	_____	_____
(menos preferida)			(mais preferida)
Justifique a razão pela qual preferiu a amostra preferida:			

Justifique a razão pela qual não gostou da amostra menos preferida:			

Observações: _____			

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Obrigada pela colaboração! 😊</div>			

FIGURA 13- FOLHA DE PROVA FORNECIDA AOS PROVADORES

ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS

Determinação do pH

O Ph (logaritmo do inverso da concentração hidrogeniônica) é determinado recorrendo a um potenciómetro equipado com eléctrodo apropriado para perfuração de queijos.

É uma determinação com bastante interesse, já que nos dá uma resposta imediata e o equipamento necessário poderá ser um simples potenciómetro de bolso.

Material e Reagentes:

- Potenciómetro com eléctrodo para queijo

Técnica:

Nos potenciómetros equipados com um só eléctrodo (existem com dois eléctrodos combinados) a operação é bastante simples. Quando as determinações são em amostras de pasta dura convém fazer previamente um orifício (punção). Com um auxílio de um "punhal".

Protocolo da determinação da Humidade (NP – 1598)

A determinação da humidade permite-nos, quando se conhece previamente a percentagem da matéria gorda, classificar os queijos quanto à sua consistência. Assim a classificação seguinte é feita em função da humidade referida ao queijo isento de matéria gorda.

TABELA 21-CLASSIFICAÇÃO DO QUEIJO QUANTO AO TEOR DE HUMIDADE

	Humidade Isenta de Gordura
Queijo extraduro	< 51 %
Queijo de pasta dura	> 49 % < 56 %
Queijo de pasta semidura	> 54 % < 63 %
Queijo de pasta semimole	> 61 % < 69%
Queijo pasta mole	> 67 %

Humidade no queijo isento de gordura (H.I.G.%): é o valor da humidade do queijo expresso em termos de queijo sem gordura; $\% \text{ H.i.g.} = (\% \text{ H} * 100) / (100 - \% \text{ g})$; Isto é, se um queijo tiver 30% de humidade e 20% de gordura o seu teor de humidade no queijo isento de gordura será igual a: $(30 * 100) / (100 - 20) = 37,5\%$

A quantidade de água retida na massa vai constituir um fator importante também no processo de cura (quanto maior for o teor de humidade, mais rápida será a proteólise), no sabor e aroma do queijo na sua conservação.

Material e Reagentes

- Balança;

- Infravermelhos;
- Areia tratada (com ácido clorídrico e calcinada);
- Balança (sensível a 0,0001 g);
- Cápsulas;
- Exsicador;
- Estufa de secagem;
- Vareta de vidro.

Técnica

1. Pesam-se com rigor para uma cápsula cerca de 3 g da amostra de queijo que se envolve na areia tratada e coloca-se em estufa a 101 +/- 1° C.
2. A partir da 4ª hora efetuam-se pesagens de 1h30m em 1h30m sempre à mesma temperatura (após arrefecimento no exsicador) até que 2 pesagens sucessivas não defiram mais de 0,5 mg. Este processo exige um tratamento prévio da areia e teste de controlo e muitas pesagens minuciosas.

Protocolo da determinação da Gordura (NP – 1598)

A determinação da gordura permite-nos, quando se conhece previamente a percentagem da humidade, classificar os queijos quanto à matéria gorda. Assim a classificação seguinte é feita em função da gordura referida ao extrato seco.

TABELA 22-CLASSIFICAÇÃO DO QUEIJO DE ACORDO COM % DE GORDURA

	Gordura Extrato Seco
Queijo Extra Gordo	> 60 %
Queijo Gordo	< 60 % > 45 %
Queijo Meio Gordo	< 45 % > 25 % <
Queijo Pouco Gordo	< 25 % > 10 %
Queijo Magro	< 10 %

Gordura no extrato seco (g.e.s.%): é o valor da gordura do queijo expresso em termos de queijo sem humidade; $\%g.e.s. = (\%g \cdot 100) / (100 - \%H)$; isto é, se um queijo tiver 30% de humidade e 20% de gordura o seu teor de gordura no estrato seco será igual a: $(20 \cdot 100) / (100 - 30) = 28,57\%$.

O processo corrente (Técnica de Van de Gulik é, apesar dos muitos inconvenientes o mais interessante, já que o processo de referência (técnica de Schmid – Bondzynnski – Ratzlaff)

Torna-se impraticável e sem interesse na maioria dos casos.

Material e Reagentes:

- Ácido Sulfúrico (1,520 de Densidade);
- Álcool isoamílico;
- Balança;
- Centrífuga;
- Banho de água;
- Butirómetro de Van de Gulik;
- Medidores de Kipp;
- Pipetas.

Técnica

1. Pesam-se com precisão 3g da amostra para o recipiente de pesagem do butirómetro e coloca-se ácido sulfúrico de modo a cobrir 2/3 da câmara (tapando toda a amostra).
2. O butirómetro é colocado no banho de água a 65° C onde fica até dissolução total das proteínas (mais ou menos 1 hora com agitações sucessivas).
3. Após a dissolução adiciona-se 1cm³ de álcool isoamílico, agita-se e deita-se de seguida ácido sulfúrico até que o nível atinja o traço da escala de referência nos 35 %.
4. Inverte-se, agita-se repetidas vezes e coloca-se na centrífuga durante 10 min a 1000 –1200 r.p.m..

No final coloca-se o butirómetro de novo em banho de água com a escala para cima e completamente submersa. A leitura realiza-se de imediato.

Resultados:

O valor encontrado é a percentagem da matéria gorda na "massa". Para determinação da matéria gorda no extrato seco pode-se usar a seguinte fórmula:

$$\% \text{ G.e.s.} = \frac{\% \text{ G} \times 100}{100 - \% \text{ H}}$$

O extrato seco não é mais do que a diferença para 100 da percentagem de humidade, ou seja: $100 - \% \text{ H} = \% \text{ E.S.}$

Protocolo da determinação da Acidez

O método utilizado na determinação da acidez do queijo é o descrito detalhadamente no livro de métodos AOAC (Association of Official Analytical Chemists)

Material e Reagentes:

- Água destilada;

- Solução NaOH (0.1N);
- Solução alcoólica de fenolftaleína 0.2 %;
- Papel de filtro;
- Balão de vidro;
- Pipetas;
- Funil;
- Copo de precipitação.

Técnica:

1. Pesam-se 10g de amostra que se coloca num balão de vidro com água aquecida a 40°C e perfaz-se o volume até 105 mL;
2. Agita-se, deixa-se decantar e recolhe-se o líquido sobrenadante que se filtra (papel de filtro);
3. Medem-se 25 mL do filtrado para um balão e titula-se com a solução NaOH de molaridade conhecida, em presença de fenolftaleína como indicador.

Resultados:

Por cada 1 c.c gastos de hidróxido de sódio 0.1 N correspondem à presença de 0.009g de ácido láctico. Sendo a determinação feita sobre 2.5g de amostra temos que:

%ácido láctico = $0.009 \times V \times 40$ em que V é o volume gasto de NaOH gasto na titulação.

Protocolo da determinação de Proteínas

No queijo durante a maturação, ocorrem degradações nos seus constituintes iniciais, de onde se destaca pela sua importância a fermentação da lactose, a degradação da matéria gorda e principalmente a hidrólise das proteínas. São estas degradações que no seu conjunto promovem os sabores, os aromas e as características típicas do produto.

Material e Reagentes:

- Aparelho kjeldahl completo;
- Balança de precisão;
- Erlenmeyers;
- Provetas;
- Buretas;
- Sulfato de potássio,
- Óxido de mercúrio;
- Solução de ácido bórico;

- Indicador (solução alcoólica de roxo metilo e azul de metileno);
- Ácido Sulfúrico;
- Solução de hidróxido e tiosulfato de sódio;
- Ácido clorídrico 0.1N.

Técnica:

O processo utilizado na determinação de azoto é o método Kjeldahl:

Princípios:

1º passo: Oxidação da matéria orgânica em excesso de H_2SO_4 concentrado em ebulição.

2º passo: Determinação da amónia presente no produto resultante da digestão.

Função dos reagentes usados na digestão:

- H_2SO_4 (conc.): agente oxidante contém amónia
- K_2SO_4 ou Na_2SO_4 : aumenta a temperatura da reação para aproximadamente 4000°C.
- Catalisa metálicos (e.g. Hg, Se, Cu): aumentam a velocidade da reação.
- Agentes Oxidantes (e.g. H_2O_2 , $KMnO_4$): aceleram o início da reação.

Protocolo da determinação de Cinzas

Os teores de cinza na massa dos queijos dependem forçosamente dos sais minerais existentes no leite.

Material e Reagentes

- Cápsula de incineração;
- Mufla;
- Exsicador;
- Balança de precisão.

Protocolo da determinação da Aw

Material:

- Células;
- Higrómetro (serve para medir o Aw).

Técnica:

Encher a célula com a amostra de queijo até ao risco. Necessita de algum tempo para estabilizar, no mínimo, 30 minutos.

Espalmar bem para não existir fissuras nas amostras. Esperar que estabilize e retirar o resultado final.

Protocolo da determinação da Cor

Material:

- Amostra de queijo
- Colorímetro

Técnica:

Primeiramente, calibra-se o aparelho para efetuar bem a leitura da cor, de acordo com o sistema L*A*B*.

O colorímetro CR-400 é um instrumento de medição portátil, projetado para avaliar a cor de objetos, especialmente com superfícies em condições mais suaves ou com variação de cor mínima. Através de fórmulas de avaliação padrão ou personalizados, este colorímetro confiável e de alta precisão, ajuda os usuários a controlar a qualidade de cor, consistência e aparência das suas amostras. Ele identifica com precisão as características de cor em objetos, determina as diferenças de cor entre os objetos e fornece avaliações aprovadas/reprovadas para determinar imediatamente se a amostra atende ao padrão definido.

Protocolo da determinação da Textura

A análise sensorial é um processo complexo que envolve os cinco sentidos: Visão, Paladar, Olfato, Tato e Audição.

Textura é uma característica decorrente da nossa interação com os alimentos, com a sua estrutura e com o seu comportamento quando manuseados. Há um conjunto de propriedades físicas percebidas sensorialmente, que são uma consequência da estrutura interna do material que, por sua vez, é determinada pelas interações moleculares dos seus constituintes.

Técnica

Estas características podem ser determinadas por um método instrumental – Análise de Perfil de Textura – Texture Profile Analysis (TPA).

Este teste imita as condições nas quais os alimentos são submetidos durante o processo de mastigação, envolve duas penetrações na amostra, com uma pausa entre elas, simulando a ação de duas dentadas no alimento e é por isso que também se designa por teste das duas

dentadas. Os parâmetros avaliados no TPA são dureza, elasticidade, adesividade, coesividade e fracturabilidade. (Sousa, et al., 2010)