

Gabriel Junqueira Cabral

**ESTUDO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO₂
EM QUEIJO MINAS FRESCAL: MODELAGEM MATEMÁTICA
E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE
CO₂ NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS
E ÁCIDO LÁCTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

**Florianópolis
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cabral, Gabriel Junqueira
ESTUDO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO₂ EM QUEIJO
MINAS FRESCAL: MODELAGEM MATEMÁTICA E AVALIAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ NO CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS E ÁCIDO LÁCTICAS / Gabriel
Junqueira Cabral ; orientadora, Alcilene Rodrigues
Monteiro ; coorientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi. -
Florianópolis, SC, 2016.
165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Queijo Minas frescal. 3.
Pré-solubilização de CO₂. 4. Microbiologia. 5. Modelagem
matemática. I. Monteiro, Alcilene Rodrigues. II. Carciofi,
Bruno Augusto Mattar. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO – PGEAL

*"Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo."*

Manoel de Barros

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor das Esferas.

Aos meus orientadores Alcilene e Bruno por todo apoio e ensinamentos durante a caminhada.

Ao Jhony, Daiane e Deise que de modo altruísta doaram seus tempos e seus conhecimentos engrandecendo o trabalho.

À Natália, Ana Paula e Larissa pela disponibilidade e colaboração experimental.

Aos colegas do laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI) pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao companheiro de empreitada Rafael Cella.

À família Arrasta Ilha.

À Traço Cia de Teatro.

Ao Sr. Gabriel e dona Ivone, nunca esquecerei.

À Naroca e Zé Aloísio.

Aos Junqueiras e Cabrais.

À família Matos, Antônio, Vera, Vitor, Kath e Camila.

Aos meus amores Débora e Mateus.

RESUMO

O dióxido de carbono (CO₂) é um gás atóxico amplamente utilizado na conservação de alimentos que não respiram embalados em atmosfera modificada (AM). A microbiota deteriorante de produtos lácteos é composta predominantemente por bactérias psicotróficas Gram-negativas, grupo microbiológico citado pela literatura científica como mais sensível aos efeitos bacteriostáticos do CO₂. Novos processos com objetivo de incorporar o CO₂ em alimentos que não respiram antes do envase são desenvolvidos visando maior aproveitamento do volume útil das embalagens e efeito microbiostático, destacando: solubilização de CO₂ no produto acabado antes do envase e incorporação de CO₂ durante as etapas de processamento e/ou em matérias-primas específicas. O presente trabalho avalia os fenômenos envolvidos na absorção e desorção de CO₂ em queijo Minas frescal durante o processo de pré-solubilização e após envase, assim como o impacto de diferentes concentrações de CO₂ dissolvido no crescimento de bactérias psicotróficas (PSI) e ácido lácticas (BAL) em queijo Minas frescal tradicional e *light*, estocado a 7 °C. A solubilidade e o coeficiente de difusão efetivo do CO₂ nos produtos, incluindo gordura láctea bovina anidra, foram determinados por método manométrico a 4°C, 7°C e 10°C, contendo adaptações e melhorias em relação aos métodos já propostos na literatura. O aumento do teor lipídico promove aumento da solubilidade e redução da difusividade do CO₂ nos produtos, impactando as cinéticas de absorção e desorção do gás. Modelos matemáticos de transferência de massa no produto e embalagem foram formulados para prever as cinéticas de composição gasosa e concentração de CO₂ dissolvido no alimento durante as etapas de processo e armazenamento. Esses modelos foram acoplados ao modelo de crescimento microbiano de Baranyi e Roberts com modelo secundário correlacionando velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}) com a [CO₂]_{dissolvido}. O processo de pré-solubilização de CO₂ mostrou-se eficaz na redução de μ_{\max} de PSI e BAL em ambos os queijos estudados. Embora com concentrações de CO₂ inferiores devido à menor solubilidade, o crescimento de PSI em queijo *light* foi mais afetado. As BAL foram afetadas com menor intensidade que PSI. Os dados de evolução do pH e sinerese estão em concordância com os dados microbiológicos, sendo que maiores valores de pH e menores índices de sinerese ocorreram para menores atividades microbianas. O

acoplamento de modelos de transferência de massa com modelos de crescimento microbiológico é uma ferramenta importante para otimizar sistemas com AM e/ou com pré-solubilização de CO₂, sendo útil em predições e avaliações da vida útil e segurança microbiológica dos produtos.

Palavras-chave: Queijo Minas frescal, pré-solubilização de CO₂, microbiologia preditiva

ABSTRACT

Carbon dioxide (CO₂) is a nontoxic gas widely used in the conservation of non-respiring foods that are packaged in modified atmosphere (MA). The spoilage microbiota of dairy products consists largely of psychotrophic Gram-negative bacteria, a microbiological group often cited in the literature as being the most sensitive one to the bacteriostatic effects of CO₂. New processes that aim to incorporate CO₂ into non-respiring foods before packaging are developed, seeking to better utilize the volume of the packages and the microbiostatic effect. In these processes, the following are highlighted: the solubilization of CO₂ in the finished product before packaging and the incorporation of CO₂ during the processing steps and/or in specific raw material. The present investigation evaluates the phenomena involved in the absorption and desorption of CO₂ in Minas frescal cheese during the process of pre-solubilization and after packaging, as well as the impact that different concentrations of dissolved CO₂ have on the growth of psychotrophic and lactic acid bacteria in both traditional and light Minas frescal cheese, stocked at 7°C. The solubility and effective diffusion coefficient of CO₂ in the products, including anhydrous bovine milk fat, were determined through a manometric method at 4°C, 7°C and 10°C, with adaptations and improvements in relation to methods proposed in previous studies. The rise in lipid level promotes an increase of solubility and a decrease of CO₂ diffusivity in the products, which has an impact on the kinetic constants and on gas desorption. Mathematical models of mass transfer on the product and package were formulated to predict the kinetics of gas in headspace and the concentration of dissolved CO₂ in the food during the processing and packaging steps. These were coupled to Baranyi and Roberts' growth model, with a secondary model correlating μ_{\max} to [CO₂]_{dissolved}. The pre-solubilization process of CO₂ efficiently reduced the growth speed (μ_{\max}) of psychotrophic and lactic acid bacteria in both types of cheese. Such effect was higher for the light cheese, despite its lower CO₂ concentrations, which were caused by its lower solubility. As expected, lactic acid bacteria were less affected than psychotrophic bacteria. The data for pH evolution and syneresis are in accordance with the microbiological data – higher pH values and lower syneresis indices were found for lower microbial activity. The coupling of mass transfer models with microbiological growth models is an

important tool for the optimization of systems with MAP and/or with the pre-solubilization of CO₂.

Keywords: Minas frescal cheese, pre-solubilization of CO₂, predictive microbiology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1	<i>Estado da arte</i>	3
1.2	<i>Objetivo</i>	5
1.2.1	Objetivos específicos	5
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1	<i>Queijo</i>	7
2.2	<i>Deterioração de produtos lácteos</i>	8
2.3	<i>Mecanismos de ação do CO₂ na conservação de alimentos</i>	11
2.3.1	Retirada do oxigênio.....	12
2.3.2	Influência no pH	13
2.3.3	Penetração celular.....	15
2.4	<i>Fatores que influenciam o efeito antimicrobiano do CO₂</i>	16
2.5	<i>Solubilidade do co₂ em lipídeos e na água</i>	19
2.6	<i>Utilização de co₂ em queijos</i>	21
2.6.1	Manutenção do leite cru carbonatado	21
2.6.2	Acidificação com CO ₂ para coagulação do leite.....	23
2.6.3	Queijos embalados em atmosfera modificada e injeção direta de CO ₂	25
2.7	<i>Importância da embalagem</i>	31
2.8	<i>Microbiologia preditiva</i>	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	<i>Caracterização das amostras</i>	41
3.2	<i>Determinação de parâmetros físicos</i>	42
3.2.1	Determinação da constante de Henry do CO ₂	42
3.2.2	Determinação do Coeficiente de Difusão Efetivo (D _{ef}) ..	47
3.3	<i>Pré-solubilização de CO₂</i>	49
3.3.1	Envase após pré-solubilização.....	50
3.3.2	Determinação da concentração de CO ₂ atingida na pré-solubilização: conformação 1.....	53
3.3.3	Influência do CO ₂ no crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas - Conformação 1 embalado em ar após pré-solubilização.....	56
3.3.4	Influência do CO ₂ no crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas - Conformação 2 embalado em atmosfera modificada após pré-solubilização.....	57

3.4	<i>Avaliação de parâmetros de qualidade</i>	58
3.4.1	Análises de pH.....	58
3.4.2	Análises de textura.....	58
3.4.3	Análises de umidade	59
3.4.4	Sinerese	59
3.5	<i>Análises Estatísticas</i>	59
3.6	<i>Parâmetros Microbiológicos</i>	59
3.6.1	Modelo primário	59
3.7	<i>Modelagem da transferência de CO₂ em sistemas com atmosfera modificada considerando difusão no alimento e permeação através da embalagem</i>	60
3.7.1	Balço de massa na fase gasosa.....	62
4	RESULTADOS.....	67
4.1	<i>Constante de Henry e Coeficiente De Difusão Efetivo De CO₂ EM QUEIJO FRESCAL</i>	67
4.2	<i>Predição da constante de Henry em função do teor de umidade e lipídeos</i>	71
4.3	<i>Pré-Solubilização de CO₂ seguido de envase em ar: Conformação 173</i>	
4.3.1	Ensaio de pré-solubilização de CO ₂ queijo Minas frescal tradicional 73	
4.3.2	Análise do perfil de textura (TPA)	79
4.3.3	Influência da concentração de CO ₂ no crescimento de bactérias psicrotóricas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional: Conformação 1.....	82
4.4	<i>Pré-solubilização de CO₂ seguido de envase em atmosfera modificada</i>	91
4.4.1	Queijo Minas frescal tradicional	91
4.4.2	Queijo Minas frescal light	103
4.5	<i>Discussão dos resultados microbiológicos</i>	115
4.5.1	Variabilidade de parâmetros de crescimento de microrganismos.....	124
4.6	<i>Simulações de processos e sistemas de embalagem</i>	127
4.6.1	Pré-solubilização de CO ₂ em câmaras pressurizadas....	127
4.6.2	Carbonatação do leite pasteurizado para produção de queijo Minas frescal	133
4.6.3	Modelagem matemática do crescimento microbiano acoplado com transferência de massa	136

5	CONCLUSÕES.....	145
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	147
7	REFERÊNCIAS.....	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Permeabilidade de filmes poliméricos utilizados em embalagens para alimentos.....	34
Tabela 2 - Composição lipídica, umidade, % NaCl e atividade de água de queijo Minas frescal tradicional e <i>light</i>	42
Tabela 3 - Conformações utilizadas na pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal.	51
Tabela 4 - Constante de Henry (<i>H</i>) e coeficiente de difusão efetivo (<i>D</i> _{ef}) do CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional, <i>light</i> e gordura láctea bovina anidra, determinados a 4, 7 e 10 °C.....	67
Tabela 5 - Constante de Henry (<i>H</i>) e coeficiente de difusão efetivo (<i>D</i> _{ef}) do CO ₂ em alimentos que não respiram.	70
Tabela 6 - Valores experimentais (<i>H</i> _{exp}) e preditos (<i>H</i> _{predito}) da constante de Henry para produtos que não respiram em função das frações de água (<i>x</i> _a) e gordura (<i>x</i> _g). Desvio percentual em relação ao valor experimental apresentado.	72
Tabela 7 - Ensaio de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional.....	74
Tabela 8 - Parâmetros da análise de perfil de Textura (TPA) em queijo Minas frescal tradicional (conformação 1).....	81
Tabela 9 - Tratamentos de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Experimento 0.	82
Tabela 10 - Evolução dos valores de pH em função do tempo de estocagem e dos tratamentos aplicados. Queijo Minas frescal tradicional (Conformação 1).	83
Tabela 11 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo Minas frescal tradicional para os diferentes tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo.	84
Tabela 12 - Taxa de consumo de O ₂ e produção de CO ₂ durante experimento com conformação 1 embalado em ar após pré-solubilização de CO ₂ . Valores obtidos pela evolução da fração volumétrica de cada gás ao longo do período de estocagem.	87
Tabela 13 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e após pré-solubilização de CO ₂ antes do envase em ar. Conformação 1. Experimento 0.....	90
Tabela 14 - Tratamentos de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 1.....	92

Tabela 15 - Evolução do pH em queijo Minas frescal tradicional para os tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo ao longo do período de estocagem a 7 °C. Conformação 2, experimento 1.	92
Tabela 16 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 1.....	97
Tabela 17 - Tratamentos de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 2.	98
Tabela 18 - Evolução do pH em queijo Minas frescal tradicional para os tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo ao longo do período de estocagem a 7 °C. Conformação 2, experimento 2.	99
Tabela 19- Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 2.....	102
Tabela 20 - Tratamentos de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal <i>light</i> , parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 3.	103
Tabela 21 - Evolução do pH em queijo Minas frescal <i>light</i> para os tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo. Conformação 2, experimento 3.....	104
Tabela 22 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo <i>light</i> para os diferentes tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo. Conformação 2. Experimento 3.	104
Tabela 23 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal <i>light</i> embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 3.....	108
Tabela 24 - Tratamentos de pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal <i>light</i> , parâmetros de embalagem e condições após tratamento Conformação 2, experimento 4.	109
Tabela 25 - Evolução do pH em queijo Minas frescal <i>light</i> para os tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo. Conformação 2, experimento 4.....	110
Tabela 26 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo Minas frescal <i>light</i> para os diferentes tratamentos com CO ₂ e embalado a vácuo. Conformação 2. experimento 4.	110
Tabela 27 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal <i>light</i>	

embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 4.	114
Tabela 28 - Valores de contagens microbiana iniciais e finais para queijos frescos encontrados na literatura.....	116
Tabela 29 - Ajuste linear de μ_{\max} em função da concentração de CO ₂ dissolvido para bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional e <i>light</i>	120
Tabela 30 - Velocidades máximas de crescimento (μ_{\max}) diferentes bactérias em função da fração de CO ₂ na fase gasosa. Condições: pH 6,2, 7°C e a _w 0,99.	121
Tabela 31 - Velocidades máximas de crescimento de microrganismos em queijos obtidas pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) com dados disponíveis na literatura científica.	122
Tabela 32 - Simulações com parâmetros iniciais e de equilíbrio para queijo Minas frescal embalado em filmes de alta barreira a 7°C.	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 - a) influência da concentração de CO ₂ dissolvido no tempo para aumento de 2 log(UFC g ⁻¹) de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes temperaturas. b) influência da concentração de lactato de sódio (Lac-Na) no tempo para aumento de 2 log(UFC g ⁻¹) de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes concentrações de CO ₂ dissolvido a 7 °C.	12
Figura 2-2 - Simulação da absorção e dessorção de CO ₂ em queijo Minas frescal embalado a 7 °C (H = 38 Pa ppm ⁻¹), em diferentes graus de enchimento (DF). Absorção em AM tradicional com 50% de CO ₂ na fase gasosa inicial. Dessorção em atmosfera normal com concentração inicial de CO ₂ dissolvido de 1000 ppm.	27
Figura 2-3 Mecanismo geral de permeação de gás e vapor d'água através de filmes plásticos poliméricos	33
Figura 2-4 - Micrografia ótica de filme multicamada.	36
Figura 3-1- Aparato experimental para determinação da solubilidade e coeficiente de difusão efetivo do CO ₂ em alimentos que não respiram.....	44
Figura 3-2 - Representação da malha refinada nas direções axial e radial.	48
Figura 3-3 - Vaso de pressão para pré-solubilização de CO ₂ em queijo Minas frescal.	50
Figura 3-4 - Disposição das amostras de queijo (Conformação 1) na prateleira antes da inserção no vaso de pressão para o processo de pré-solubilização (A). Momento do envase em atmosfera modificada após processo de pré solubilização (Conformação 2) (B).	52
Figura 3-5 - Aparato experimental desenvolvido para quantificação das alterações de volume da embalagem devido às cinéticas de dessorção de CO ₂ . Método contínuo utilizando o texturômetro... 55	55
Figura 3-6 - Esquema representativo do queijo embalado em atmosfera modificada com possibilidade de pré-solubilização de CO ₂	62
Figura 3-7 - Fluxo de cálculos para obtenção da condição inicial para simulação da dessorção/absorção após envase.	64
Figura 4-1 - Cinéticas de dessorção de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional a 7 °C, em embalagem flexível de alta barreira, após processo de pré-solubilização e envase em ar.	75
Figura 4-2 - Cinéticas da composição gasosa em embalagens de alta barreira devido a dessorção de CO ₂ . Fração gasosa de CO ₂ medida	

com analisador de gás (CO_2_{med}). Fração gasosa de CO_2 calculada a partir dos dados do aumento da força de empuxo (CO_2_{cal}).....	75
Figura 4-3 Fração volumétrica percentual de CO_2 no equilíbrio estimada pelo modelo de Cabral (2011) vs. medida experimentalmente. Linha tracejada: inclinação = 1 (predição exata). Linha contínua: ajuste linear dos dados.	76
Figura 4-4 - Pressão parcial de CO_2 em embalagem de alta barreira após processo de pré-solubilização de CO_2 e envase em ar. Linha tracejada: simulação. Linha azul - dados experimentais obtidos com o método da força de empuxo.	77
Figura 4-5 - Perfil de concentração de CO_2 em queijo Minas frescal tradicional após pré-solubilização (260 kPa por 180 minutos), dessorção em ar antes do envase (5 minutos) e envase em ar (DF=50% e embalagem de alta barreira). Perfil 16 horas após o envase.....	78
Figura 4-6 - Evolução da fração de CO_2 na fase gasosa das embalagens. Envase em ar após pré-solubilização de CO_2 . Conformação 1.	84
Figura 4-7 - Evolução da fração de O_2 na fase gasosa das embalagens. Envase em ar após pré-solubilização de CO_2 . Conformação 1.	85
Figura 4-8 - Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal tradicional, armazenado a 7 °C, embalado a vácuo e em ar após processo de pré-solubilização de CO_2 . Conformação 1. Experimento 0.	88
Figura 4-9 Crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal, armazenado a 7 °C, embalado a vácuo e em ar após processo de pré-solubilização de CO_2 . Conformação 1. Experimento 0.	88
Figura 4-10 - Evolução da fração de CO_2 , ao longo do período e estocagem a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2.	93
Figura 4-11 - Evolução da fração de O_2 , ao longo do período e estocagem a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2.	94
Figura 4-12 - Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal tradicional, armazenado a 7 °C, embalado vácuo e em atmosfera modificada após processo de pré-solubilização de CO_2 . Conformação 2. Experimento 1.	95
Figura 4-13 - Crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional, armazenado a 7 °C, embalado vácuo e em atmosfera modificada após processo de pré-solubilização de CO_2 . Conformação 2. Experimento 1.	95

Figura 4-14 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 2	100
Figura 4-15 Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 2.	100
Figura 4-16 - Evolução da fração de CO ₂ , ao longo do período de estocagem de queijo Minas frescal <i>light</i> a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 3. Médias ± desvio padrão.....	105
Figura 4-17 - Evolução da fração de O ₂ , ao longo do período e estocagem de queijo Minas frescal <i>light</i> a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 3. Médias ± desvio padrão.....	106
Figura 4-18 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal <i>light</i> embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 3.	107
Figura 4-19 - Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresca <i>light</i> embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 3.	107
Figura 4-20 - Evolução da fração de CO ₂ , ao longo do período e estocagem de queijo Minas <i>light</i> a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 4. Médias ± desvio padrão.....	111
Figura 4-21 - Evolução da fração de O ₂ , ao longo do período e estocagem de queijo Minas <i>light</i> a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 4.....	112
Figura 4-22 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal <i>light</i> embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 4.	113
Figura 4-23 - Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresca <i>light</i> embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO ₂ . Conformação 2. Experimento 4.	113
Figura 4-24 - Velocidades máximas de crescimento em função da concentração de CO ₂ dissolvido, para bactérias psicrotróficas	

(PSI) e ácido lácticas (BAL), em queijos Minas frescal tradicional e <i>light</i>	119
Figura 4-25 - Placas incubadas a 7°C por 10 dias para amostras dos tratamentos com CO ₂ e vácuo. Da esquerda para direita: 1500ppm, 1000ppm, 500 ppm e vácuo.	123
Figura 4-26 - Exemplo de placas na mesma diluição para diferentes tratamentos com contagens similares e tamanho de colônias diferentes.	124
Figura 4-27 - Simulações do crescimento de <i>Pseudomonas sp</i> , utilizando o modelo Baranyi e Roberts, com as combinações das incertezas dos parâmetros μ_{max} e α a 7°C, pH=6,2 e $a_w=0,99$	126
Figura 4-28 - Simulação do processo de pré-solubilização de CO ₂ a 360 kPa por 1 hora, seguido de envase em ar (DF=90%). Perfil 24 horas após envase. Peça cilíndrica de 220 g e 7,3 cm de diâmetro.	128
Figura 4-29 - Perfis de concentração de CO ₂ em queijo Minas frescal tradicional 24h, 48h e 72h após envase. Simulação do processo 360 kPa por 1 hora, seguido de dessorção em ar por 5 minutos e envase em ar com 90% de enchimento da embalagem. Peça cilíndrica de 220 g e 7,3 cm de diâmetro.	130
Figura 4-30 Evolução da concentração média de CO ₂ dissolvido (pontilhado preto) e pressão parcial do gás na embalagem (pontilhado vermelho). Pré-solubilização a 360 kPa por 1 hora, seguido de envase em ar (DF=90%)	131
Figura 4-31- Perfis de concentração de CO ₂ 72 horas após envase. Queijo <i>light</i> e tradicional. Processo de 360 kPa por 1h, seguido de dessorção em ar por 5 minutos e envase em ar (DF=90%).	133
Figura 4-32 - Condições do momento do envase até equilíbrio para processos descritos na Tabela 32. Condições 1 e 2: dessorção de CO ₂ (pré-solubilização de CO ₂ e envase em ar); condições 3 e 4: absorção de CO ₂ (pré-solubilização de CO ₂ e envase em ATM).	136
Figura 4-33 - Diferentes perfis de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> a 7 °C em queijo Minas frescal tradicional (220g e 7,3 cm de diâmetro) influenciados por diferentes processos de pré-solubilização e condições de envase. Linha contínua: centro geométrico da amostra; linha tracejada: superfície.	139
Figura 4-34 - Simulação de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> na superfície e no centro geométrico de queijo Minas frescal tradicional e <i>light</i> (diâmetro de 15 cm, altura de 9,9 cm e massa de	

1800 g). Processo de pré-solubilização de 100 kPa por 6 horas, envase 90% CO ₂ (DF=50%).	140
Figura 4-35 - Perfis de concentração de <i>L. monocytogenes</i> de queijo Minas tradicional (diâmetro de 15 cm, altura de 9,9 cm e massa de 1800 g) durante armazenamento a 7 °C. Processo de 100 kPa por 6 horas e envase com 90% de CO ₂ (DF=50%).	141
Figura 4-36 - Simulação do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> a 7 °C em queijo Minas frescal tradicional (220 g, 7,3 cm de diâmetro) após abertura da embalagem no 7° (linha preta) e 14° (linha vermelha) dia de armazenamento. Atmosfera modificada tradicional com pressão parcial de equilíbrio de 60 kPa.	143
Figura 4-37 - Crescimento de psicotróficos em queijo Minas frescal <i>light</i> . Linha contínua: simulação do crescimento após simulação do processo de pré-solubilização de CO ₂ e envase em atmosfera modificada. Losangos: Dados experimentais. a) 90 kPa por 30 minutos e envase em 20% de CO ₂ (387ppm); b) 110 kPa por 60 minutos e envase em 40% de CO ₂ (722 ppm).	144

Nomeclatura

\bar{C}	Concentração média (ppm)
$C_{CO_2}^\infty$	Concentração média de CO ₂ dissolvido no equilíbrio (ppm)
$C_{CO_2}^{pred}$	Concentração média de CO ₂ predita (ppm)
$C_{CO_2}^s$	Concentração de CO ₂ na superfície do produto
$C_{CO_2}^{t=0}$	Concentração média de CO ₂ no produto no momento do envase
D_{ef}	Coefficiente de difusão efetivo
M_{CO_2}	Massa molecular de CO ₂ (g mol ⁻¹)
N_{emb}	Fluxo de matéria através da embalagem
$P_{CO_2}^\infty$	Pressão parcial de CO ₂ na fase gasosa no equilíbrio (Pa, kPa)
$P_{CO_2}^e$	Pressão parcial de CO ₂ no exterior da embalagem (Pa, kPa)
$P_{CO_2}^i$	Pressão parcial de CO ₂ no interior da embalagem (Pa, kPa)
$P_{CO_2}^{t=0}$	Pressão parcial inicial de CO ₂ na fase gasosa da embalagem (Pa, kPa)
m_p	Massa de produto (g, kg)
$n_{CO_2}(t)$	Número de mol de CO ₂ no tempo t
n_g^i	Número de mols de CO ₂ na fase gasosa no início do processo de solubilização
n_g^t	número de mols de CO ₂ no tempo t
n_i	Número de mols dos gases considerados inertes (N ₂ e O ₂)
[CO ₂]	Concentração média de CO ₂ dissolvido no alimento (ppm)
ΔP	Gradiente de pressão (Pa, kPa)
μ_{max}	Velocidade máxima específica de crescimento (log(UFC g ⁻¹)dia ⁻¹)
a,b	Coefficientes da equação de Van der Waals
DF	Grau de enchimento da embalagem (%) - percentual do volume total da embalagem ocupado por produto
EVA	Etileno vinil acetato
EVOH	Álcool vinílico de etileno
F_e	Força de empuxo (N)
F_p	Força peso (N)

F_r	Força resultante (N)
g/p	Razão entre volume de gás e volume de produto
$H_{i,j}$	Constante de Henry do soluto i no solvente j (Pa ppm ⁻¹)
K	Permeabilidade da embalagem (g m s ⁻¹ m ⁻² Pa ⁻¹)
lag	Fase de latência microbiana (hora, dia)
LDPE	Polietileno de baixa densidade
M.A.P.A.	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
m_a	Massa do alimento (g, kg)
m_t	Massa total (g, kg)
n	Número de mols
N	Fluxo de matéria (g s ⁻¹ m ⁻²)
Per	Permeabilidade da embalagem (cm ³ (stp) μm m ⁻² d ⁻¹ kPa ⁻¹)
PET	Politereftalato de etileno
PP	Polipropileno
ppm	Partes por milhão (mg CO ₂ / kg de produto)
PS	Poliestireno
PVDC	Poli-cloreto de vinilideno
PVOH	Poli vinil álcool
R	Constante universal dos gases (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
S	Solubilidade (ppm Pa ⁻¹)
SGS	<i>Soluble Gas Stabilization</i> (processo de pré-solubilização de CO ₂)
T	Temperatura (°C, K)
t	Tempo (s, min, h, dia)
UFC	Unidades formadoras de colônia
V_g	Volume da fase gasosa (cm ³ , m ³)
V_p	Volume do produto (cm ³ , m ³)
V_t	Volume total (cm ³ , m ³)
x_a	Fração mássica de água no alimento (g _{água} g _{produto} ⁻¹)
X_g	Fração mássica de gordura no alimento (g _{gordura} g _{produto} ⁻¹)
α	Estado fisiológico celular
A	Área de transferência de massa (m ² , cm ²)
D	Coefficiente de difusão
ρ	Massa específica (g cm ⁻³ , kg m ⁻³)

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os queijos frescos possuem grande importância econômica no cenário nacional, sendo consumidos por todas as classes sociais durante todo o ano (FURTADO, 2005). Os fatores que limitam a vida útil desses produtos estão relacionados com a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, a presença de enzimas bacterianas termorresistentes, o tratamento térmico aplicado ao leite, os métodos de embalagem utilizados, as temperaturas de armazenamento e distribuição, além dos critérios de higiene utilizados em toda a cadeia produtiva (FOX e MCSWEENEY, 2004; HOTCHKISS *et al.*, 2006).

A atmosfera modificada pode ser aplicada em produtos lácteos para controlar o crescimento de fungos e bactérias deteriorantes, aumentando a vida de útil desses produtos. Devido à textura macia, queijos frescos são especialmente interessantes de serem embalados em atmosfera modificada devido ao efeito de amortecimento do gás aliado ao aumento da vida útil do produto (PERGIOVANNI *et al.*, 1993; MANIAR *et al.*, 1994; GONZALEZ-FANDOS *et al.*, 2000; JAKOBSEN e RISBO, 2009).

A deterioração microbiológica de produtos lácteos está frequentemente relacionada com o crescimento de bactérias psicrotróficas Gram-negativas (BOOR e MURPHY, 2002; FERNANDES, 2009). A maior eficiência bacteriostática do CO₂ em bactérias Gram-negativas corrobora com a utilização desse gás para o controle do crescimento de deteriorantes em produtos lácteos (HOTCHKISS *et al.*, 2006).

O vácuo é o principal método de embalagem aplicado em queijo Minas frescal no Brasil. Entretanto, por se tratarem de queijos normalmente macios que podem ser danificados fisicamente pelo vácuo, essa tecnologia não é a mais recomendada. Esse é um dos motivos pelo qual encontramos atualmente esse queijo produzido em diferentes regiões do Brasil com consistência mais firme ou queijos de consistência macia embalados com vácuo brando, com o objetivo de evitar danos físicos.

A adição de CO₂ em produtos lácteos com injeção direta de CO₂ ou com embalagem em atmosfera modificada é uma estratégia de aumento da vida útil com custos relativamente baixos e utilizada comercialmente em todo o mundo em produtos como queijos, leite cru e

pasteurizado, iogurte e bebidas lácteas (HOTCHKISS *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2012).

Estudos evidenciam que a eficiência da atmosfera modificada aplicada em alimentos que não respiram está relacionada com a concentração de CO₂ solubilizado no alimento (CHEN E HOTCHKISS, 1991; DEVLIEGHERE *et al.*, 1998a, 1998b; DEVLIEGHERE e DEBEVERE, 2000; HOTCHKISS *et al.*, 1999). Em sistemas com atmosfera modificada tradicional, a solubilização do CO₂ no alimento provoca uma diminuição do volume livre na embalagem, fenômeno chamado de colapso da embalagem, considerado negativo e podendo levar à rejeição do produto pelo consumidor (JAKOBSEN e RISBO, 2009). Para contornar esse problema, são adicionados gases inertes menos solúveis, normalmente o N₂, afetando, entretanto, negativamente a eficiência volumétrica da embalagem. Assim, a atmosfera modificada tradicional aplicada em produtos que não respiram depara-se com a necessidade de solubilizar uma quantidade suficiente de CO₂ para garantir o efeito conservador e a alta razão entre volume de gás e volume de produto na embalagem devido à adição de gases inertes para evitar o colapso da embalagem (JAKOBSEN e BERTELSEN, 2004, 2006; SIVERTSVIK *et al.*, 2004a; ROTABAKK *et al.*, 2010; DEVLIEGHERE *et al.*, 2004).

Uma maneira de potencializar o efeito bacteriostático do CO₂ e evitar ou diminuir o colapso da embalagem é pela pré-solubilização de CO₂ no alimento antes do envase. Essa tecnologia tem sido tema de pesquisas em diversos produtos que não respiram, como produtos lácteos (CHEN E HOTCHKISS, 1991; JAKOBSEN e RISBO, 2009; JAKOBSEN *et al.*, 2009), frutos do mar (SIVERTSVIK *et al.*, 2004b, 2006; ROTABAKK *et al.*, 2006, 2008, 2010; SOARES, 2012; LIMA, 2014) e produtos cárneos (SIVERTSVIK e JENSEN, 2005; ROTABAKK *et al.*, 2010, 2008b; AL-NEHLAWI *et al.*, 2013; MEREDITH *et al.*, 2014).

Assim, é de interesse tecnológico e científico a avaliação da capacidade de prolongamento da vida útil de queijo Minas frescal utilizando tecnologias disponíveis e de baixo custo que utilizam o CO₂ como agente inibidor de crescimento microbiológico. Os resultados do presente estudo poderão ser referência para produtos similares, contribuindo para o desenvolvimento de produtos de maior qualidade e estabilidade.

1.1 ESTADO DA ARTE

O consumo de leite e seus derivados é fortemente estabelecido no Brasil como um hábito cultural. Sejam nas classes sociais mais favorecidas ou nas menos favorecidas, de produtos mais simples aos mais elaborados, o brasileiro consome leite e derivados.

A vida útil de produtos lácteos frescos, como queijos, iogurtes, bebidas lácteas, entre outros, é limitada pelo crescimento de microrganismos deteriorantes. Elevada umidade e atividade de água, aliadas aos valores de pH propícios para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, fazem desses produtos excelentes meios de crescimento para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bolores e leveduras (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

O dióxido de carbono (CO₂) pode efetivamente influenciar esses fatores e reduzir o crescimento de microrganismos deteriorantes em alimentos e bebidas, principalmente bactérias psicrotróficas Gram-negativas. Os principais exemplos da aplicação bem sucedida do CO₂ como agente inibidor de crescimento microbiano e promovedor do aumento da vida útil são os alimentos refrigerados embalados em atmosfera modificada, que atendem à crescente demanda de produtos frescos com maior vida útil.

Apesar de nem todas as possibilidades do uso do CO₂ na indústria laticinista estarem regulamentadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (PAULA, 2010), algumas aplicações têm notório interesse industrial: manutenção do leite cru refrigerado carbonatado (LOSS e HOTCHKISS, 2003; VIANNA, 2010; RAJAGOPAL *et al.*, 2005); acidificação do leite pasteurizado para produção de queijos (DE LA FUENTE *et al.*, 1998; DIAS, 2009; PAULA, 2010;); adição direta nos produtos acabados (CHEN e HOTCHKISS, 1991; LOSS e HOTCHKISS, 2003; HOTCHKISS *et al.*, 2006) e envase em atmosfera modificada (FLOROS e MATSOS, 2005; HOTCHKISS *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2012; KHOSHGOZARAN *et al.*, 2012).

Um dos principais problemas encontrados no leite cru é a presença de enzimas termorresistentes produzidas por microrganismos psicrotróficos. Essas enzimas podem gerar inúmeros defeitos em uma ampla variedade de produtos lácteos (LOSS e HOTCHKISS, 2003). Nos casos em que o leite cru necessita ser armazenado por períodos que podem chegar a alguns dias, a carbonatação do leite cru mostra-se um

tecnologia viável e eficiente no combate de psicrotróficos (VIANNA, 2010). A possibilidade da retirada, total ou parcial, do CO₂ solubilizado antes do tratamento térmico permite minimizar ou reduzir possíveis impactos da carbonatação do leite cru nas etapas subsequentes de processamento de produtos específicos. De modo geral, a qualidade do leite cru mantido carbonatado permite a elaboração de qualquer produto, levando-se em conta as especificidades de cada produtor/produto (MA, BARBANO e SANTOS, 2003).

A segunda opção da utilização do CO₂ em laticínios relaciona-se com propriedades tecnológicas na coagulação do leite para produção de queijos. Para maior rendimento da coagulação, o pH do leite deve ser reduzido, normalmente pela adição de fermento láctico e consequente produção de ácido láctico e/ou pela adição direta de ácido láctico ao leite (DIAS, 2009). Estudos demonstram que a acidificação do leite com CO₂ reduz o tempo de coagulação e a quantidade de coalho utilizada (PAULA, 2010). Além disso, o residual de CO₂ no produto acabado pode ser otimizado com foco na ação antimicrobiana e aumento da vida útil de diversos tipos de queijo, destacando os queijos frescos com maior taxa de deterioração.

A terceira opção é a adição de CO₂ em produtos acabados, sejam líquidos ou sólidos. Cada tipo de produto sugere equipamentos específicos para esta finalidade. No caso de produtos líquidos, há possibilidades de desenvolvimento de produtos "gasosos". Iogurtes e bebidas lácteas carbonatadas são realidade em diversos países. Carbonatadores utilizados em indústrias de bebidas podem ser adaptados para operar em laticínios. Produtos sólidos, como queijos, podem ser adicionados de CO₂ em câmaras pressurizadas com esse gás ou em etapas preliminares do processamento (CHEN e HOTCHKISS, 1991; LOSS e HOTCHKISS, 2003). É possível projetar processos contínuos e em batelada para cada realidade industrial. Nos EUA existem indústrias que processam queijo cottage com adição de CO₂, operando basicamente com três abordagens diferentes: pré-solubilização de CO₂ no creme antes de misturar com a massa coalhada; dispersão de CO₂ no produto acabado antes do envase; e adição de CO₂ no volume livre da embalagem.

Além de todas as possibilidades mencionadas anteriormente, há também a atmosfera modificada tradicional. Apesar de simples, os sistemas com atmosfera modificada necessitam de baixos graus de enchimento das embalagens para alcançar efeitos satisfatórios de

aumento de vida útil (SIVERTSVIK *et al.*, 2004a, 2004b) sem comprometer o aspecto visual das embalagens. O efeito microbiostático alcançado em sistemas com atmosfera modificada com elevados graus de enchimento deve-se, principalmente, à ausência de O₂, não sendo esperado uma ação efetiva do CO₂ em baixas concentrações.

A partir da regulamentação do uso do CO₂ em laticínios pelos órgãos competentes, as indústrias terão uma série de possibilidades de benefícios e aplicações do CO₂, de acordo com o exposto acima. A utilização dessas tecnologias em âmbito industrial requer estudos que possibilitem maior entendimento dos fenômenos envolvidos nos processos de absorção e dessorção de CO₂ nos produtos, assim como os impactos no crescimento microbiano e nos parâmetros de qualidade.

1.2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é estudar o processo de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional e *light*, avaliando os fenômenos de absorção e dessorção de CO₂ assim como o impacto desse processo no crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas no produto.

1.2.1 *Objetivos específicos*

- Desenvolver e avaliar o processo de pré-solubilização de CO₂ para queijo Minas frescal tradicional e *light*;
- Avaliar a influência da concentração de CO₂ dissolvido nos parâmetros de crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas durante o período de estocagem a 7 °C;
- Aperfeiçoamento do método manométrico para determinação do coeficiente de difusão efetivo de CO₂.
- Validar com dados experimentais o modelo matemático dinâmico de simulação das etapas de pré-solubilização de CO₂, exposição à atmosfera normal e envase em condições de atmosfera normal ou modificada.
- Determinar a solubilidade e o coeficiente de difusão efetivo do CO₂ em gordura láctea bovina anidra.

- Propor método de predição da solubilidade do CO_2 em produtos lácteos como função das frações de água e lipídeos e suas respectivas solubilidades;
- Acoplar o modelo de transferência de massa ao modelo de Baranyi e Roberts como ferramenta para avaliar e desenvolver sistemas com pré-solubilização de CO_2 e/ou atmosfera modificada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUEIJO

Queijo é o nome dado para concentrados lácteos, contendo proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. É um dos produtos alimentares mais complexos e dinâmicos e seu estudo envolve uma ampla variedade de conhecimentos científicos (FOX *et al.*, 2000).

A produção de queijo é um exemplo clássico da preservação de alimentos, datado de 6000 a 7000 anos antes de Cristo. A preservação dos principais constituintes do leite com a manufatura de queijos explora dois princípios clássicos da preservação de alimentos: fermentação ácido láctica e a redução da atividade de água através da retirada de água e adição de NaCl (FOX *et al.* 2004).

Não há uma lista definitiva das variedades de queijos produzidos no mundo. Sandine e Elliker (1970) reportam mais de 1000 variedades de queijos, enquanto que cerca de 500 variedades são reportadas por Fox *et al.* (2004). Embora a produção de queijo seja considerada uma "arte" muito antiga, a produção moderna de queijo é realizada com embasamento científico e tecnológico, incluindo o uso de enzimas industrializadas, fermentações complexas, engenharia de processos sofisticadas e conhecimento bioquímico das reações durante as fases de maturação. De fato, a partir dos mesmos ingredientes (leite bovino, ovino, caprino ou bubalino, bactérias ácido lácticas, coalho e NaCl) são produzidos uma infinidade de produtos diferentes.

Os queijos são classificados em grupos. A classificação tradicional de queijos baseia-se principalmente no conteúdo de umidade, sendo classificados como duros, semi-duros ou macios. Embora esse tipo de classificação seja amplamente utilizada, ela gera alguns problemas, como por exemplo, o agrupamento de queijos com características de produção distintas. Exemplificando, os queijos Parmesão, Cheddar e Emmental são classificados com queijos duros, mesmo tendo características sensoriais e de produção bastante diferentes.

Outros padrões de classificação são utilizados, nos quais são avaliados fatores como a origem do leite, conteúdo de umidade, textura, principal microrganismo responsável pela maturação, temperatura de cozimento, processos de manufatura, forma de coagulação, etc. De fato,

nenhum esquema de classificação é completamente satisfatório e universalmente aceito.

No Brasil, segundo a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, a classificação dos queijos ocorre em função do teor de gordura (extra gordo, gordo, semi-gordo, magro e desnatado) e teor de umidade (baixa, média, alta e muito alta).

O queijo Minas frescal é classificado, segundo a legislação brasileira, como um queijo de muito alta umidade, sua conservação é normalmente realizada pela manutenção em temperaturas de refrigeração e, muitas vezes, aliada ao envase no vácuo.

Queijos frescos, assim como o Minas frescal, tem um papel econômico importante, visto que podem ser comercializados pouco tempo após sua produção e contribuem para o fluxo de caixa dos laticínios.

2.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS

A deterioração de alimentos é um processo complexo envolvendo inúmeros mecanismos que fornecem uma ampla diversidade de tipos de deteriorações, podendo ser danos físicos, alterações químicas, produção de compostos voláteis resultantes da proliferação microbiana e metabolismo do produto, alterando a qualidade sensorial, incluindo textura, cor e odor (GRAM *et al.*, 2002).

Embora o leite proveniente de animais saudáveis seja essencialmente estéril, alguns microrganismos são capazes de penetrar no úbere quando os dutos estão abertos (FERNANDES, 2009). Microrganismos Gram-positivos (*Coccus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*), bactérias ácido lácticas, *Pseudomonas spp.* e leveduras são frequentemente isoladas de leite ordenhado de modo asséptico (FERNANDES, 2009).

Ainda assim, a principal contaminação encontrada no leite cru é principalmente proveniente das etapas que englobam a ordenha e o armazenamento. O tipo de microrganismos contaminantes é função do ambiente em que o leite é submetido.

Os avanços tecnológicos na ordenha e etapas primárias subsequentes permitem a estocagem do leite cru nos centros produtores

por até alguns dias (VIANA e GIGANTE, 2010) mantendo a contaminação em níveis inferiores a 5×10^3 UFC ml⁻¹.

Uma série de fatores é responsável por essas melhorias, incluindo os procedimentos de higiene na ordenha e cuidados com a saúde da glândula mamária do animal, mas o ponto central é o rápido resfriamento do leite após a ordenha seguido da estocagem em temperaturas próximas a 4 °C (BERESFORD, 2007). A velocidade e a temperatura de resfriamento têm um impacto significativo na microbiota predominante. Antes da introdução do resfriamento rápido o leite era resfriado lentamente a 15 - 20 °C e a microbiota dominante era composta por microrganismos mesófilos, particularmente *Lactococcus* e *Enterococcus spp.* A refrigeração do leite retarda o crescimento de microrganismos mesófilos, entretanto bactérias psicotróficas, como *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium* e *Acinetobacter*, continuam crescer e dominam a microflora do leite refrigerado (McSWEENEY, 2007).

A microbiota dominante de bactérias psicotróficas encontradas no leite e produtos lácteos é Gram-negativa, sendo a maior parte delas representada pelo gênero *Pseudomonas*. Psicotróficos Gram-positivos também são encontrados, geralmente do gênero *Bacillus*. Vários mofo e leveduras também são caracterizados como psicotróficos e podem ser encontrados em queijos (McSWEENEY, 2007, ARSLAN *et al.*, 2011).

O gênero *Pseudomonas spp.* representa não mais que 10% da flora contaminante do leite cru recém ordenhado, entretanto, compõe a flora dominante de leite cru ou pasteurizado deteriorado (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Estudos indicam menores contagens de *Pseudomonas spp.* em leite adicionado de CO₂ (AMIGO *et al.*, 1995; ESPIE e MADDEN, 1997; MARTIN *et al.*, 2003).

Em queijos, a presença de psicotróficos é atribuída à contaminação durante o processamento, sendo relacionada a defeitos de qualidade como sabor amargo (SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

A pasteurização do leite é uma ferramenta efetiva no controle de microrganismos psicotróficos, sendo a presença desses microrganismos indicação de contaminação após a pasteurização (McSWEENEY, 2007). Dentre os microrganismos termodúricos presentes normalmente no leite destaca-se o *Bacillus spp.*, formador de esporos, anaeróbio e capaz de crescer em temperaturas de refrigeração. Outros psicotróficos termodúricos são representados pelos gêneros

Arthrobacter, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Clostridium* (JAY, 2005; SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Uma barreira adicional encontrada em diversos tipos de queijos é o cozimento da massa como parte do processo de fabricação, colaborando com o controle da população de psicrotróficos. O queijo Minas frescal é obtido sem o cozimento da massa coalhada e o controle da recontaminação por psicrotróficos após a pasteurização dá-se pelos procedimentos de Boas Práticas de Fabricação aplicadas na unidade processadora.

Os microrganismos psicrotróficos presentes no leite cru produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes que, além de degradar proteínas e gorduras do leite cru, resistem à pasteurização e influenciam a qualidade dos produtos lácteos. Diversos defeitos em produtos lácteos são relacionados com a produção de enzimas por microrganismos psicrotróficos no leite cru, entre eles a geleificação de leite UHT, o aumento de espuma durante a reconstituição de leite desidratado; a diminuição da vida útil de leite pasteurizado, aumento da incrustação em trocadores de calor, gosto de “sabão”, rancidez, outros defeitos de sabor e redução do rendimento em queijos maturados (CHANPAGNE *et al.*, 1994; SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Diversos trabalhos avaliaram o crescimento microbiano em queijo Minas frescal, apontando um crescimento contínuo de bactérias psicrotróficas em função do tempo de estocagem refrigerada (SANGALETI, 2007; DIAS, 2009; DAGOSTIM, 2011). A produção de enzimas extracelulares, principalmente lipases e proteases, atuam na alteração das características do produto, influenciando negativamente a textura, gosto, aroma e sabor, limitando muitas vezes a vida útil do produto (MOURA, 1997; FRANK *et al.*, 2005; SANGALETTI, 2007).

As lipases e proteases de microrganismos psicrotróficos podem estar presentes em quantidade suficiente para catalisar a quebra de lipídeos e proteínas (BARBANO *et al.*, 2006). A liberação de ácidos graxos pela ação de lipases contribui para o desenvolvimento do sabor de ranço, enquanto que a quebra de proteínas atua no desenvolvimento de sabor amargo. Ambos são considerados defeitos graves que podem limitar a vida útil de queijos (SANGALETTI, 2007; RAYNAL-LJUTOVAC, *et al.*, 2005). Os principais compostos voláteis formados pela ação das enzimas de microrganismos psicrotróficos são aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, hidrôcarbonetos, compostos benzênicos e sulfurosos (MORALES *et al.*, 2005).

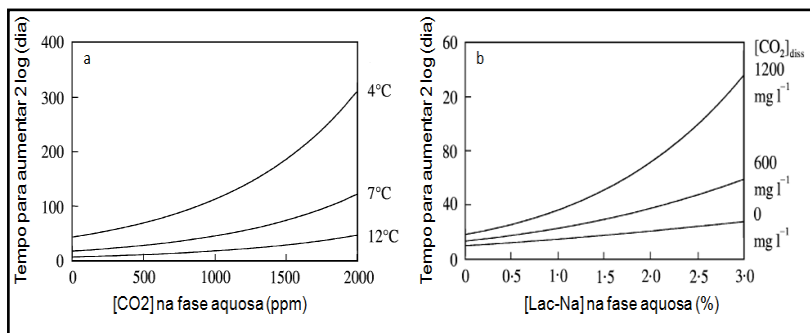
A RDC N° 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza os limites de contaminação microbiológica para amostra indicativa em queijos de muito alta umidade de 5×10^2 UFC g⁻¹ para coliformes a 45 °C e estafilococos coagulase positiva, ausência de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra. Evidentemente, a legislação acima visa a segurança microbiológica dos produtos e não contempla limites de contaminação de deteriorantes, sendo o produtor responsável pela garantia da vida útil declarada.

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO CO₂ NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

O CO₂ é um antimicrobiano natural, atóxico e reconhecido como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Segundo a publicação do comitê especial de avaliação de substâncias GRAS do FDA (SCOGS - *Select Committee on Grass Substances*), publicado no ano de 1979 (21 CFR seção 184.1240), apesar de não haver dados diretos relatando a segurança do CO₂ como ingrediente em alimentos, há evidências substanciais que a quantidade de CO₂ ingerido nos alimentos é desprezível comparada à quantidade produzida naturalmente pelo corpo humano. Ainda, segundo a opinião do SCOGS, em condições normais, um adulto produz mais de 500 g de CO₂ por dia, aproximadamente 2000 vezes mais que a ingestão estimada para alimentos.

O CO₂ é solúvel em água e lipídios (JAKOBSEN e BERTELSEN, 2006) sendo seu efeito inibidor proporcional à quantidade do gás dissolvido no alimento (DEVLIEGHERE *et al.*, 1998a; DEVLIEGHERE *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003). O efeito inibidor do CO₂ no crescimento microbiano é relacionado de modo sinérgico com outras barreiras normalmente utilizadas para o controle microbiano. Devlieghere *et al.* (2001) encontraram um efeito sinérgico entre a concentração de CO₂, a temperatura e a concentração de lactato de sódio no crescimento de *L. monocytogenes*, conforme ilustra a Figura 2-1.

Figura 2-1 - a) influência da concentração de CO₂ dissolvido no tempo para aumento de 2 log(UFC g⁻¹) de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas. b) influência da concentração de lactato de sódio (Lac-Na) no tempo para aumento de 2 log(UFC g⁻¹) de *L. monocytogenes* em diferentes concentrações de CO₂ dissolvido a 7 °C.



Fonte: Devlieghere *et al.* (2001)

Há mais de 100 anos que os efeitos antimicrobianos do CO₂ são conhecidos, entretanto, os mecanismos específicos da ação do CO₂ na fisiologia celular não são totalmente elucidados (GARCIA-GONZALES *et al.* 2007). A seguir são enumeradas as principais hipóteses/mecanismos sobre a ação do CO₂ na fisiologia celular (GARCIA-GONZALES *et al.* 2007; SINGH *et al.*, 2012; LOSS e HOTCHKISS, 2003).

2.3.1 Retirada do oxigênio

O primeiro mecanismo de ação do CO₂ é a redução, total ou parcial, do oxigênio disponível para o metabolismo de microrganismos aeróbios. Por ser mais solúvel, o CO₂ desloca o oxigênio dissolvido no alimento, diminuindo significativamente as velocidades de reprodução celular de microrganismos aeróbios. Embora a redução do oxigênio disponível tenha efeito inibidor de crescimento bacteriano, esse mecanismo não parece ser o principal fator limitante do crescimento microbiano quando se utiliza o CO₂ (LOSS e HOTCHKISS, 2003; DANIELS *et al.*, 1985). A inibição do crescimento de microrganismos anaeróbios corrobora com tal afirmação (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

Além do efeito inibidor de crescimento microbiano pela retirada do oxigênio, também é observado uma diminuição de reações de

degradação que envolvem a presença de oxigênio, como por exemplo a oxidação lipídica (HOTCHKISS e CHEN, 1996).

2.3.2 Influência no pH

Em alimentos (ou soluções) com elevados teores de água, o CO₂ presente no volume livre da embalagem ou recipiente solubiliza na fase aquosa do alimento formando ácido carbônico (H₂CO₃), que dissocia nos íons bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻), conforme ilustram as Equações (1), (2), (3) e (4).

Estudos sobre atmosferas de CO₂ e crescimento bacteriano mostram que o pH do meio de crescimento pode ser reduzido (OLAERTE *et al.*, 2002; ROTABAKK *et al.*, 2008b). Uma das teorias postuladas para explicar o efeito inibidor de crescimento em bactérias aeróbias deteriorantes inclui a redução do pH no meio intracelular com efeitos na atividade enzimática e transporte de substratos (WOLFE, 1980). Pesquisadores sugerem que o CO₂ gasoso aplicado a um tecido biológico solubiliza na fase aquosa extracelular sendo absorvido pela célula na forma de ácido carbônico não dissociado, que por sua vez não é reconhecido pela bomba de prótons responsável, entre outras funções, pela manutenção do pH intracelular. No interior da célula ocorre dissociação do ácido carbônico, inibição enzimática e redução do crescimento microbiano (SINGH *et al.*, 2012).



$$H = 3,3 \times 10^{-2} \text{ (mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}) \text{ (25 } ^\circ\text{C)}$$



$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2(\text{aq})]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ (25 } ^\circ\text{C)}$$



$$\frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ (25 } ^\circ\text{C)}$$



$$\frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} = 5,61 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1} (25 \text{ }^\circ\text{C})$$

Chen e Hotchkiss (1991), em estudo que avaliou o efeito do CO₂ dissolvido em queijo cottage, não observaram mudanças significativas do pH em consequência da solubilização do CO₂. Olaerte *et al.* (2002) observam uma ligeira queda do pH em queijo fresco embalado sob atmosfera modificada (0,6 – 0,8 unidades em 28 dias). Neste estudo, a diminuição do pH ocorre mais rapidamente nos primeiros sete dias em atmosferas contendo altas concentrações de CO₂ (100% de CO₂), em comparação às atmosferas contendo menores concentrações (0%, 20% e 40% de CO₂). Entretanto, não há grandes diferenças dos valores de pH entre as amostras após 28 dias de estocagem a 4 °C.

Gammariello *et al.* (2009), em estudo com *Stracciatella* (queijo fresco italiano), observaram a tendência da diminuição do pH em todas as atmosferas estudadas (30%, 50%, 75% e 95% de CO₂ na fase gasosa inicial da embalagem, além do controle em atmosfera normal e vácuo). Os autores justificam a tendência da redução do pH observada pela presença de bactérias ácido-láticas e não creditam a diminuição do pH à dissolução do CO₂ no meio aquoso do alimento.

O pH de um produto é muito influenciado pela sua condição microbiológica. Pode-se observar no trabalho de Dias (2009) que os valores de pH, ao final de 28 dias, em queijos Minas frescal produzidos com adição de fermento láctico foram menores que nos queijos produzidos por adição de CO₂ ao leite (método de acidificação), possivelmente devido à inibição de bactérias produtoras de ácidos orgânicos pelo tratamento com CO₂.

Devlieghere e Debevere (2000) avaliaram a influência da concentração de CO₂ dissolvido nos parâmetros de crescimento de microrganismos deteriorantes. Os autores observaram uma redução de 0,17 unidades de pH para concentração de CO₂ de aproximadamente 2000 ppm. O efeito tampão do meio de crescimento reforça a ação do CO₂ além da redução do pH. Os resultados do trabalho citado mostram um comportamento linear na redução da taxa de crescimento com o aumento da concentração de CO₂ dissolvido, resultado avaliado para concentrações de CO₂ variando de 0 a 2000 ppm.

O CO₂ tem sido utilizado na preservação de leite cru refrigerado (VIANA e GIGANTE, 2010; HOTCHKISS *et al.*, 2006; BARBANO e SANTOS, 2003) e na produção de queijos (DIAS, 2009; PAULA, 2010; DAGODTIM, 2011). Nesses trabalhos é evidente a redução do pH do leite com a adição de CO₂. Entretanto, a redução do pH extracelular não é suficiente para explicar o efeito inibidor do CO₂, visto que o uso de outros ácidos (HCL e H₂PO₄) para diminuição de pH não apresentam um efeito equivalente ao CO₂, possivelmente devido a maior capacidade de penetração do CO₂ nas células dos microrganismos (HAAS *et al.*, 1989; WEI *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1993; DEBS-LOUKA *et al.*, 1999). O maior poder de penetração nas células através da membrana plasmática deve-se ao comportamento apolar do CO₂ na forma gasosa, facilitando a penetração do CO₂ na dupla camada de fosfolipídios que compõe a membrana celular (GARCIA-GONZALES, 2007).

Como a solubilidade do CO₂ está relacionada com a formação de ácido carbônico e suas formas dissociadas, há uma estreita relação entre a solubilidade e o pH. De maneira geral, quanto maior o pH maior será a solubilidade do CO₂ devido à redução de prótons H⁺ e deslocamento do equilíbrio das reações de solubilização e hidratação do CO₂ e dissociação do ácido carbônico no sentido que aumenta a solubilidade do gás no meio, sendo observado maior concentração do íon bicarbonato (GILL, 1988a)

2.3.3 Penetração celular

O terceiro mecanismo é o efeito direto do CO₂ no metabolismo microbiano, não relacionado com a redução do pH ou com a remoção de O₂ (DANIELS *et al.*, 1985; GARCIA-GONZALES, 2007). O mecanismo específico de ação não é totalmente compreendido, entretanto, alguns fatores devem ser considerados (LOSS e HOTCHKISS, 2003; SINGH *et al.*, 2012; GARCIA-GONZALES, 2007):

a) Mudanças em propriedades físicas da membrana plasmática, afetando o transporte de solutos, como glicose e aminoácidos, e alterando a morfologia celular (DIXON e KELL, 1989);

b) Inibição de enzimas, principalmente as relacionadas com reações de carboxilação e descarboxilação nas quais o CO₂ reage com grupos amino de proteínas/enzimas causando alterações estruturais e na atividade (ADAMS e MOSS, 1995; HONG e PYUN 2001).

O experimento mais usual para avaliação do efeito microbiológico do CO₂ em baixas pressões é a substituição do ar entorno do meio de cultura por CO₂. Infelizmente, nem sempre o meio de cultura contém solução tampão capaz de impedir totalmente a alteração do pH devido à dissolução do CO₂ e formação de ácido carbônico no meio.

Hendricks e Hotchkiss (1997) avaliaram o efeito de atmosferas de CO₂ (0-80%) com e sem O₂ (0-40%) no crescimento de *Listeria monocytogenes*. Os resultados mostraram que o CO₂ é capaz de suprimir o crescimento mesmo quando a concentração de O₂ é mantida constante em 20% e o pH do meio não é alterado.

O equilíbrio das reações metabólicas podem ocorrer em vários níveis. A taxa de reação de cada enzima é função não apenas do pH, mas também das concentrações intracelulares dos substratos, produtos e cofatores, que são elementos primários na regulação da atividade enzimática (GARCIA-GONZALES *et al.*, 2007). Fahestil *et al.* (1963) reportam um aumento da atividade de ATP-ase mitocondrial com ação na fosforilação oxidativa que promove diminuição do nível energético e inibe enzimas relacionadas com reações de descarboxilação. O efeito final que as diferentes formas de CO₂ podem exercer sobre o metabolismo microbiano será, provavelmente, função da importância relativa das reações de carboxilação e descarboxilação (GARCIA-GONZALES *et al.*, 2007).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM O EFEITO ANTIMICROBIANO DO CO₂

O efeito antimicrobiano do CO₂ depende de muitos fatores, incluindo a pressão parcial do gás, tempo de aplicação, concentração de CO₂ dissolvido, temperatura do meio, relação entre volume de gás e volume de produto, pH, atividade de água, tipo de microrganismo, tipo do alimento e fase do crescimento microbiano (BLICKSTAD *et al.*, 1981; SINGH *et al.*, 2012). A seguir são descritos a influência dos principais fatores que envolvem inibição do CO₂ no crescimento microbiano

a) Tipo de microrganismo

O CO₂ pode exercer um efeito bacteriostático ou bactericida em alguns microrganismos e um efeito estimulante em outros

microrganismos. Normalmente, as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao CO₂ que as bactérias Gram-positivas (LAMBERT *et al.* 1991; DEVLIEGHERE e DEBEVERE, 2000).

b) Fase do crescimento microbiano

A exposição de microrganismos ao CO₂ resulta em um aumento da fase *lag* do crescimento microbiano. Bactérias em fase logarítmica de crescimento são afetadas em menor grau pela presença de CO₂, ou seja, há uma redução no efeito inibitório do CO₂. Gill e Tan (1980) demonstram que carnes frescas submetidas a atmosferas de CO₂ quando os microrganismos estão em fase lag de crescimento têm um aumento de 50% na vida de prateleira, enquanto que para uma aplicação tardia de CO₂ o aumento é de 30%.

Clark e Lentz (1969) demonstraram uma redução de 90% do efeito inibidor de crescimento microbiano em carne fresca com atraso na aplicação de CO₂. As fases lag, a 5 °C e 20% de CO₂, foram de 11 dias para aplicação imediata de CO₂ no produto fresco, 2,4 dias para aplicação de CO₂ 24 horas depois, e apenas 12 horas de fase lag com aplicação de CO₂ 48 horas após. Os autores concluem que quanto mais rápida for a aplicação e a concentração de CO₂ e quanto menor a temperatura, maior será a ampliação da vida útil do produto.

c) Concentração de gás

O principal fator limitante da concentração de CO₂ dissolvido no produto é a percepção sensorial do gás. Hotchkiss *et al.* (1999), em estudos com leite pasteurizado (2% de gordura) carbonatado, indicam que o limiar de percepção oscila entre 120 e 360 ppm de CO₂, determinado por painel de provadores treinados. O mesmo grupo de estudo, em experimentos preliminares, encontra o limiar de percepção de CO₂ dissolvido em leite integral pasteurizado em torno de 720 ppm, enquanto que resultados significativos na concentração de psicrotóxicos e na contagem total de bactérias são encontrados a partir de 75 ppm de CO₂ dissolvido.

A sensibilidade ao CO₂ é bastante variável entre as espécies de microrganismos. Concentrações ente 5% e 50% (v/v) de CO₂ causam inibição de mofos, leveduras e bactérias. Em derivados de leite embalados em atmosfera modificada, as concentrações de CO₂ na fase gasosa variam ente 10% e 100%, normalmente balanceados com N₂ como gás de enchimento para prevenir o colapso da embalagem. A concentração de CO₂ dissolvido no alimento, no equilíbrio após envase,

assim como o grau de alteração da composição e volume da fase gasosa, dependem das propriedades do material (solubilidade ao CO₂), razão entre volume do gás e volume de produto e concentração inicial de CO₂ tanto na fase gasosa quanto no produto (SIMPSON, 2009; CABRAL, 2011; SINGH *et al.*, 2012).

d) Temperatura de estocagem

A temperatura de estocagem deve ser mantida mais baixa possível devido à diminuição da solubilidade do CO₂ na fase aquosa dos alimentos com o aumento da temperatura. O aumento da eficiência do CO₂ em baixas temperaturas é relacionado com o aumento da concentração do gás dissolvido na fase aquosa dos produtos (GENIGEORGIS 1985; GILL e TAN, 1980), embora o efeito sinérgico da ação do CO₂ com a redução da temperatura tenha que ser considerado (ver Figura 2-1) (DEVLEGHERE *et al.*, 2001; LOSS e HOTCHKISS, 2003).

Quando se trata da solubilidade do CO₂ em lipídios a relação com a temperatura pode não ser trivial. A solubilidade do CO₂ nos lipídios é função não apenas da temperatura, mas também do perfil de ácidos graxos, sendo a solubilidade dependente da fração líquida dos lipídios em dada temperatura (GILL, 1998a; SIVERTSVIK *et al.*; 2004b; JAKOBSEN e BERTELSEN, 2006; CABRAL, 2011). Devido à complexa composição dos ácidos graxos que podem ser encontrados nos alimentos, a solubilidade na fase lipídica é a sobreposição do efeito do aumento de energia das moléculas com o aumento da temperatura (diminuição da solubilidade) *versus* uma possível fusão de parte dos lipídios com o aumento de temperatura (aumento da solubilidade) (GILL, 1988a; JAKOBSEN e BERTELSEN 2006).

No trabalho de Gill (1988a), ficou evidente a influência da temperatura na solubilidade do CO₂ no tecido muscular e no tecido adiposo de carnes bovina, ovina e suína. No tecido muscular, para todos os casos estudados, o comportamento da solubilidade do CO₂ é semelhante ao comportamento na água, no qual ocorre diminuição da solubilidade com o aumento da temperatura. No tecido adiposo, entretanto, a solubilidade do CO₂ aumenta com o aumento da temperatura até um pico máximo, a partir do qual a solubilidade decresce com aumento da temperatura.

Esse efeito tende a ser observado em lipídeos predominantemente formados por ácidos graxos saturados, visto que, na

faixa de temperatura de refrigeração, não ocorrem mudanças de fase de ácidos graxos insaturados (GILL, 1988; SIVERTSVIK *et al.*, 2004b; JAKOBSEN e BERTELSEN, 2004, 2006).

Maiores detalhes da solubilidade do CO₂ em lipídeos serão discutida no item a seguir.

2.5 SOLUBILIDADE DO CO₂ EM LIPÍDEOS E NA ÁGUA

O dióxido de carbono apresenta um arranjo molecular linear e simétrico (O = C = O), lhe conferindo um momento dipolo igual a zero, sendo portanto solúvel em compostos não polares e altamente solúvel em óleos e gorduras líquidas. A solubilidade do CO₂ em solventes apolares é de 3 a 8 vezes superior à solubilidade na água. Em lipídeos, o CO₂ é cerca de dez vezes mais solúvel que o O₂ e 17 vezes mais solúvel que o N₂ (JAKOBSEN *et al.*, 2009; MITZ, 1979).

Assim como a molécula de água, o CO₂ possui um comportamento único, e de certa forma anômalo, quando comparado com outras moléculas semelhantes que ocorrem na natureza. O dióxido de carbono é muito mais solúvel na água que os demais constituintes da atmosfera terrestre, sendo de 25 a 35 vezes mais solúvel que o O₂ e 50 a 60 vezes mais solúvel que o N₂ (MITZ, 1979).

A elevada solubilidade do CO₂ na água não é esperada devido ao seu arranjo molecular. Mitz (1979) relata que 99 % do CO₂ dissolvido em água está na forma gasosa e apenas 1% na forma de ácido carbônico e suas formas dissociadas.

O comportamento da solubilidade do CO₂ nos alimentos, como queijos peixes e carnes magras, tende a ser inversamente proporcional à temperatura, ou seja, possuem comportamento semelhante ao da água (JAKOBSEN e BERTELSEN, 2006; JAKOBSEN *et al.*, 2009). A solubilidade em tecidos adiposos e alimentos com elevado teor de lipídeos mostra-se mais complexa e inconsistente com relação com a temperatura (GILL, 1988). Variações no perfil de ácidos graxos e complexas mudanças de fase em diferentes misturas de triglicerídeos alteram o arranjo estrutural na fase lipídica influenciando diretamente a solubilidade do CO₂ (GILL, 1988; SIVERTSVIK *et al.*, 2004b, 2005; JAKOBSEN e BERTELSEN, 2006).

Gill (1988) avaliou a solubilidade do CO₂ em tecidos muscular e adiposo bovino, suíno e ovino, em temperaturas variando de 0 °C a 30 °C. O tecido muscular suíno absorve 73 % mais CO₂ que o tecido adiposo a 0°C. No entanto, a solubilidade do tecido adiposo aumenta em temperaturas acima de 0 °C com solubilidade máxima a 15 °C. Diferenças contudentes são observadas nas curvas de solubilidade do CO₂ nos tecidos adiposos suíno, bovino e ovino, evidenciando a complexidade da solubilidade do CO₂ na gordura.

Sivertsvik *et al.* (2004a, 2004b, 2005) proporam as Equações (5), (6) e (7) para predição da concentração de CO₂ dissolvido em água, filé de peixe cru e produtos de carne cozidos, respectivamente. A Equação (5) pode ser aplicada quando é conhecida a constante de Henry do CO₂ dissolvido no produto. As Equações (6) e (7) são adaptações da Equação (5), nas quais são substituídos as constantes de Henry do CO₂ no produto pela constante de Henry do CO₂ na água.

$$C_{CO_2}^{pred} = \frac{g/p \times P_{CO_2}^{t=0} \times M_{CO_2}}{RT + (H_{CO_2,p} \times g/p \times M_{CO_2})} \quad (5)$$

$$C_{CO_2}^{pred} = \left(\frac{\% \text{ água} + \% \text{ gordura}}{100} \right) \times \frac{g/p \times P_{CO_2}^{t=0} \times M_{CO_2}}{RT + (H_{CO_2,H_2O} \times g/p \times M_{CO_2})} \quad (6)$$

$$C_{CO_2}^{pred} = \left(\frac{\% \text{ água}}{100} \right) \times \frac{g/p \times P_{CO_2}^{t=0} \times M_{CO_2}}{RT + (H_{CO_2,H_2O} \times g/p \times M_{CO_2})} \quad (7)$$

onde g/p é a relação entre volume de gás e volume de produto, $P_{CO_2}^{t=0}$ é a pressão parcial inicial de CO₂ (Pa), M_{CO_2} é a massa molecular do CO₂ (g mol⁻¹), R é constante universal dos gases (J mol⁻¹ K⁻¹), T é a temperatura (K), $H_{CO_2,p}$ e H_{CO_2,H_2O} são as constantes de Henry do CO₂ dissolvido no produto e na água, respectivamente (Pa ppm⁻¹).

A utilização da Equação (6) para peixes sugere que as solubilidades do CO₂ na água e na fase lipídica desses produtos (elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados) são semelhantes. Observa-se que a mesma abordagem não foi adequada para prever a concentração de

CO₂ dissolvido em produtos cárneos cozidos (Equação (7)), devido ao diferente perfil lipídico entre os produtos.

Segundo Sivertsvik *et al.* (2004b), a solubilidade do CO₂ na fase lipídica é dependente de seu estado físico, sendo maior a solubilidade para ácidos graxos com baixo ponto de fusão, como é o caso dos peixes cuja composição lipídica é composta predominantemente por ácidos graxos insaturados. No caso dos produtos cárneos (salsicha e presunto), a elevada quantidade de ácidos graxos saturados, sólidos na temperatura de refrigeração, não influencia a solubilidade do CO₂. Devlieghere *et al.* (1998a) demonstram que a solubilidade é pouco influenciada pela gordura suína, sugerindo uma maior solubilidade de CO₂ em ácidos graxos insaturados (líquidos na temperatura de refrigeração).

2.6 UTILIZAÇÃO DE CO₂ EM QUEIJOS

A aplicação do CO₂ em queijos, seja no produto final ou nas etapas de produção, pode ser realizado, principalmente, por quatro vias: manutenção do leite cru carbonatado (HOTCHKISS *et al.*, 2006; ROBERTS e TORREY, 1988); acidificação do leite pasteurizado com CO₂ (DIAS, 2009; PAULA, 2010; DAGOSTIM, 2011); envase em atmosfera modificada (SINGH *et al.*, 2012; KHOSHGOZARAN *et al.*, 2012); e solubilização do CO₂ no produto acabado antes do envase (CHEN e HOTCHKISS, 1991; JAKOBSEN e RISBO, 2009; CABRAL, 2011).

2.6.1 *Manutenção do leite cru carbonatado*

A manutenção do leite cru refrigerado, embora crucial para a cadeia leiteira, favorece o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos, particularmente do gênero *Pseudomonas*, que produzem enzimas termorresistentes relacionadas a defeitos em produtos lácteos e perda de rendimento na produção de queijos (CANTONI *et al.*, 2003; MORALES *et al.*, 2005; CARDOSO, 2006; DE JONGHE *et al.*, 2011; FRANCIOSI *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2011; CAPUTO *et al.*, 2015).

A adição do CO₂ altera o pH e o ponto de congelamento do leite (MA *et al.*, 2001), entretanto essas alterações são reversíveis após a dessorção do gás. Pesquisas evidenciam que não há alteração na composição de caseínas, proteínas solúveis e vitaminas no leite

carbonatado (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996; RUAS-MADIEDO *et al.*, 1998). Segundo Ruas-Madiedo *et al.* (1996) a manutenção do leite cru carbonatado seguido de degaseificação e pasteurização é um processo adequado e não provoca efeitos negativos sensoriais e bioquímicos no leite.

Vianna e Gigante (2010) concluíram ser possível a extensão do tempo para alcançar $7,5 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ de 8 para 14 dias em leite cru carbonatado e armazenado a 4 °C. O trabalho citado também demonstrou menores contagens de microrganismos psicrotróficos e menores índices de proteólise e lipólise, possivelmente pela menor produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por esses microrganismos (VIANNA e GIGANTE, 2010).

Chang e Zhang (1992) observaram que a carbonatação aumenta a viscosidade do leite e reduz o tamanho da micela de caseína. Gevaudan *et al.* (1996) e Guillaume *et al.* (2004) conduziram acidificações (pH = 5,8-4,8) reversíveis do leite a 5 °C utilizando carbonatação pela injeção direta de CO₂ pressurizado e adição de HCL/NaOH. Quando comparado ao uso de HCL/NaOH, a carbonatação tem o benefício de manter as forças iônicas do leite constante após o restabelecimento do pH original. Os autores demonstram que a partição mineral/proteína foi restabelecida e não houve mudanças nos tamanhos e nas cargas das micelas de caseína após a carbonatação do leite na faixa de pH estudado.

Ansari *et al.* (2013) avaliaram a influência da adição de CO₂ ao leite cru na produção de iogurte probiótico. Os autores observaram um leve aumento da viscosidade e diminuição da sinerese do produto final obtido com leite tratado. Não foram observadas efeitos inibitórios de crescimento e na viabilidade das células de *Lactobacillus Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*.

Sierra *et al.* (1996) demonstraram que houve manutenção da estabilidade de tocoferóis, b-caroteno e retinol em leite cru acidificado com CO₂ (pH 6,0 e 6,4) e armazenamento refrigerado durante sete dias.

Eie *et al.* (1987) reportaram desnaturação de proteínas do soro em leite acidificado com CO₂ até pH 6,0 e submetido ao processo de secagem. Já Olano *et al.* (1992) reportam que a acidificação do leite de pH 6,9 para pH 6,2 não aumenta a desnaturação de proteínas do soro ou isomerização da lactose durante o tratamento térmico, permanecendo estável após a esterilização.

Ma *et al.*, (2001) avaliaram o impacto da adição de CO₂ ao leite cru nas performances de quatro importantes testes de rotina do leite: teste de resíduo de antibiótico, ponto de congelamento, análise dos componentes do leite por infravermelho e teste da fosfatase alcalina. Os testes foram realizados para concentrações de até 1000 ppm de CO₂ dissolvido no leite a 4 °C. Não foram observadas alterações das performances nos testes de resíduos de antibióticos. O ponto de congelamento reduziu linearmente com o aumento da concentração de CO₂ dissolvido, variando de -0,543 °H (0 ppm) a -0,595 °H (1000 ppm). Tanto a redução do índice crioscópico quanto a redução do pH foram reversíveis após remoção do CO₂. O aumento das concentrações de CO₂ no leite alteraram a absorção do espectro infravermelho no comprimento de onda de 7,651 a 7,788 μm, causando desvios da leitura do conteúdo de lactose e gordura. Por fim, a carbonatação do leite não influenciou a capacidade de detecção da fosfatase alcalina, sendo os testes utilizados seguros para a detecção de leite não pasteurizado.

Segundo Paula (2010) o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) não permite a utilização do CO₂ em laticínios, seja para manutenção do leite cru antes do tratamento térmico com o objetivo de reduzir o crescimento de psicrotóxicos, seja para acidificação do leite pasteurizado para produção de queijos.

2.6.2 Acidificação com CO₂ para coagulação do leite

A adição de CO₂ ao leite pasteurizado com intuito de reduzir o pH na produção de queijos é vista como uma prática promissora na tecnologia de processamento de queijos (DIAS, 2009; PAULA, 2010; DAGOSTIN, 2011). Ao contrário de outros ácidos adicionados ao leite para acidificação, grande parte do ácido carbônico formado na solubilização de CO₂ pode ser removido durante as etapas subsequentes de processamento, possibilitando maior controle do produto final. Sua aplicação promove uma série de benefícios tecnológicos como a diminuição do tempo de processo (MONTILLA *et al.*, 1995; McCARNEY *et al.*, 1995; RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002), a redução da quantidade de coalho necessário para coagulação (McCARNEY *et al.*, 1995; PAULA, 2010), o aumento do rendimento de produção (RUAS-MADIEDO *et al.*, 1998, 2002) e a melhoria da qualidade microbiológica do produto (PAULA, 2010).

Segundo Paula (2010) apenas com a redução da quantidade de coagulante utilizado na produção de queijo o sistema de injeção de CO₂ em escala industrial é pago após dois meses e meio. Entretanto, como exposto acima, o Sistema de Inspeção Federal brasileiro do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A.) não autoriza a adição de CO₂ ao leite.

McCarney *et al.*, (1995) observaram uma redução de 50% na quantidade de coalho utilizado para coagulação de leite cru adicionado de CO₂ (a uma concentração de aproximadamente 1300 ppm). O grau de proteólise e lipólise no queijo produzido com adição de CO₂ ao leite foi significativamente inferior após três meses de maturação a 7 °C quando comparado ao queijo controle.

Ruas-Madiedo *et al.*, (1998) em estudo com queijo produzido com leite carbonatado até pH 6,2, observaram o rendimento muito superior ao processo controle, para leite de baixa qualidade microbiológica, sendo o rendimento do processo após 7 dias de maturação a 17 °C de 10,4 % para o leite carbonatado e apenas 5,9% para o leite não carbonatado. Após 3 e 7 dias de maturação o índice de proteólise para o queijo elaborado com leite carbonatado foi significativamente menor. As frações de alfa, beta e gamma caseína não foram afetadas pelo tratamento com CO₂ e a atividade proteolítica aos 15 dias foram similares aos queijos controle e produzido com adição de CO₂ ao leite. Os autores concluem que a adição de CO₂ ao leite não alteraram as propriedades sensoriais do queijo produzido, quando comparado ao controle.

A adição de CO₂ ao leite com redução do pH resulta em menores tempos de coagulação, efeito que é utilizado para redução da quantidade de coalho adicionado ao leite (PAULA, 2010). Estudos evidenciam que a maior aptidão à coagulação do leite carbonatado é devido ao aumento do teor de cálcio iônico (Ca⁺⁺), que atua amenizando as forças de repulsão entre caseínas carregadas negativamente, aumentando a taxa de agregação no processo de coagulação (LUCEY *et al.*, 1996). Guillaume *et al.*, (2004) discutiram a formação de novas formas coloidais de fosfato de cálcio que propiciam novas propriedades de superfície das micelas de caseínas, com efeito na redução do tempo de coagulação e aumento da firmeza do gel formado.

Dias (2009) demonstrou que os diferentes métodos de produção de queijo Minas frescal utilizados em seu trabalho (adição de CO₂, adição de ácido láctico e adição de fermento lácteo) afetam

significativamente o pH do produto final. O tratamento controle (produzido com adição de cultura láctea) apresentou menor pH (5,77 - 5,15 (22° dia)) em relação aos queijos produzidos com acidificação com ácido láctico (6,30 - 5,95) ou CO₂ (6,35 - 5,54). Além disso, o pH do queijo controle diminuiu mais acentuadamente ao longo do tempo que nos demais tratamentos.

Em Dias (2009), observou-se uma redução da concentração de CO₂ dissolvido no queijo em função do tempo, apresentando 954 ppm nos primeiros dias de armazenamento e decrescendo até 337 ppm após 19 dias de armazenamento. No estudo em questão, não é citada a permeabilidade ao CO₂ da embalagem utilizada.

2.6.3 *Queijos embalados em atmosfera modificada e injeção direta de CO₂*

A atmosfera modificada é um método não térmico de preservação de alimentos que utiliza, principalmente, CO₂, O₂ e N₂ para compor uma atmosfera no interior da embalagem diferente da composição do ar atmosférico. O CO₂ possui ação antimicrobiana comprovada e é o principal gás utilizado nas misturas gasosas. O O₂ é utilizado para prevenir o crescimento de microrganismos anaeróbios e manutenção da coloração em carnes vermelhas. Já o N₂ é um gás inerte sendo utilizado principalmente para a prevenção do colapso da embalagem, como gás inerte (MEREDITH *et al.*, 2014).

Os parâmetros que determinam a quantidade de CO₂ dissolvido no produto são: solubilidade do gás no produto (função da temperatura), pressão parcial de CO₂, concentração inicial de CO₂ dissolvido no produto, relação entre volume de gás e volume de produto (grau de enchimento da embalagem) e permeabilidade da embalagem (SIVERTSVIK *et al.*, 2004a; HOTCHKISS *et al.*, 2006; CABRAL, 2011).

Alam e Goyal (2000) avaliaram a influência de diferentes atmosferas (ar, vácuo, 100% de CO₂, 100% de N₂ e 50% CO₂ / 50% N₂) na vida útil de queijo muçarela embalado em filmes de alta barreira a gases. Os autores reportam um aumento considerável na vida útil do produto embalado em atmosfera modificada, sendo 14, 90, 75 e 65 dias de vida útil em ar, 100% de CO₂, 50% CO₂ / 50% N₂ e 100% de N₂, respectivamente.

Mannheim e Soffer (1996) reportaram que atmosferas de 100% de CO₂, com aproximadamente 8 mmol kg⁻¹ de CO₂ dissolvido no produto (\approx 340 ppm), a 8 °C, são capazes de aumentar a vida útil de queijo Cottage em 150%. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves *et al.* (1996) com queijo muçarela, os quais reportam ausência do efeito negativo nas propriedades sensoriais em atmosferas ricas em CO₂, sendo a atmosfera ótima com 100% de CO₂.

A vida útil de queijos embalados em atmosfera modificada é influenciada por fatores que incluem o uso de culturas lácteas, tipo de queijo, contaminação inicial do produto, condições de estocagem, composição da atmosfera e tipo e material utilizado na embalagem (KHOSGOZARAN *et al.*, 2012).

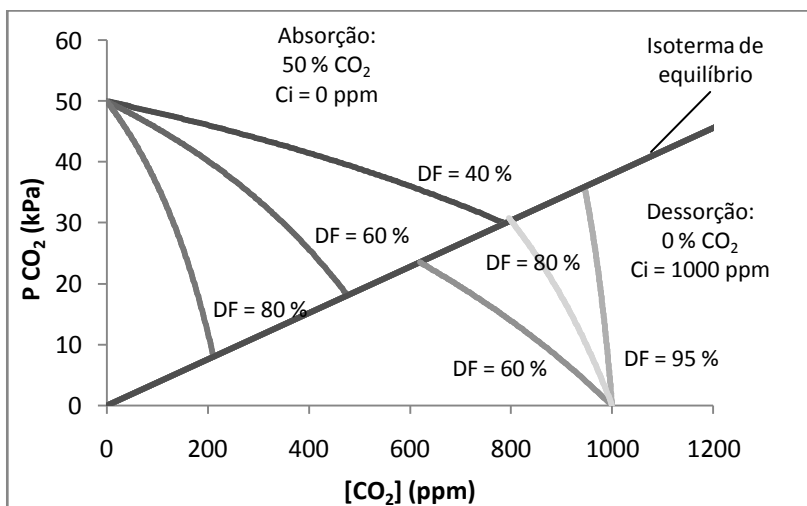
A extensão da vida útil de produtos refrigerados gera preocupações a respeito de perigos microbiológicos, incluindo listeriose e botulismo (HOTCHKISS *et al.*, 2006; DUFRESNE *et al.*, 2000). Com o uso da atmosfera modificada e consequente possível aumento da vida útil do produto existe a possibilidade do crescimento de microrganismos patogênicos antes da deterioração organoléptica do produto (OLAERTE *et al.*, 2002; DUFRESNE *et al.*, 2000; CHEN e HOTCHKISS, 1993). Em produtos refrigerados, incluindo atmosfera modificada tradicional e com pré-solubilização de CO₂, o maior risco do aumento da vida útil é o crescimento lento de alguns microrganismos patogênicos que não se manifestam em produtos com curta vida útil (HOTCHKISS *et al.*, 2006).

Olaerte *et al.* (2002) estudaram o crescimento de *L. monocytogenes* em queijo fresco embalado sob atmosfera modificada (composição gasosa inicial 0%, 20%, 40% e 100% de CO₂) a 4 °C, com e sem inoculação de *L. monocytogenes* (10³ UFC/g de queijo). Os resultados revelam a maior eficiência bacteriostática em atmosfera contendo 100 % CO₂ nas contagens de mesófilos, psicrotróficos e anaeróbios, o que remete ao aumento de vida útil do produto. Entretanto, houve crescimento de *L. monocytogenes* nas amostras inoculadas e embaladas com 100% de CO₂, detectado após 14 dias de armazenamento. O estudo demonstrou que *L. monocytogenes* é capaz de crescer em atmosferas com elevado nível de CO₂, embora a concentração populacional desse microrganismo após 28 dias de estocagem seja de 0,3 a 1,3 unidades logarítmicas aquém das amostras embaladas em ar. Nesse estudo não é citada a concentração de CO₂

dissolvido no produto, nem o grau de enchimento da embalagem, dificultando a avaliação mais criteriosa do sistema.

A Figura 2-2 ilustra possibilidades para diferentes tratamentos/condições de embalagem aplicados para queijo Minas frescal embalado a 7 °C ($H = 38,0 \text{ Pa ppm}^{-1}$), utilizando o modelo desenvolvido por CABRAL (2011), que considera embalagem de alta barreira, pressão total constante (1 atm), comportamento de gás ideal e fenômeno predominante a solubilização ou dessorção de CO_2 . O grau de enchimento da embalagem (DF) é dado pela fração volumétrica que o produto ocupa em relação ao volume total da embalagem.

Figura 2-2 - Simulação da absorção e dessorção de CO_2 em queijo Minas frescal embalado a 7 °C ($H = 38 \text{ Pa ppm}^{-1}$), em diferentes graus de enchimento (DF). Absorção em AM tradicional com 50% de CO_2 na fase gasosa inicial. Dessorção em atmosfera normal com concentração inicial de CO_2 dissolvido de 1000 ppm.



Fonte: Adaptado de Cabral (2011).

É evidente o comportamento antagônico em relação à influência do grau de enchimento da embalagem na concentração de CO_2 dissolvido no equilíbrio. Para os casos em que há absorção de CO_2 , quanto menor o grau de enchimento maior a concentração atingida no equilíbrio, ao passo que para casos em que há dessorção de CO_2 quanto

maior o grau de enchimento maior a concentração de CO₂ retida no alimento no equilíbrio.

Para queijos embalados em atmosfera modificada o volume da fase gasosa é frequentemente pequeno comparado ao volume do produto, resultando em grandes alterações na concentração e volume da fase gasosa (JAKOBSEN e RISBO, 2009). Como as embalagens para esses produtos são normalmente flexíveis ou semi-flexíveis, pode ocorrer o colapso da embalagem (absorção de CO₂ pelo produto) ou o inchamento da embalagem (desorção de CO₂ do produto) (JAKOBSEN e RISBO, 2009; CABRAL, 2011). Em alguns casos o colapso da embalagem pode ser utilizado favoravelmente dando um aspecto de vácuo no produto (por exemplo, em queijo fracionados em cubos), em outros casos mudanças no volume da embalagem podem levar a rejeição do produto pelo consumidor (SINGH *et al.*, 2012; FAVA e PIERGIOVANNI, 1993), podendo ser confundido com o processo deteriorativo conhecido como *blown pack*.

O processo chamado SGS (*Soluble gas Stabilization*) proposto por Sivertsvik (2000, 2003) consiste em solubilizar CO₂ em alimentos que não respiram antes do envase em atmosfera modificada. Visto como uma tecnologia capaz de reduzir ou eliminar o colapso da embalagem, aumentar a eficiência na ocupação dos volumes disponíveis nas embalagens sem, entretanto, comprometer a qualidade do produto final. Esse tratamento tem sido tema de pesquisas em produtos como peixes e frutos do mar (SIVERTSVIK, 2000; SIVERTSVIK e BIRKELAND, 2006; ROTABAKK *et al.*, 2008b; MENDES *et al.*, 2008; 2011; SOARE, 2013), carne de frango (ROTABAKK *et al.*, 2006; 2010; NEHLAWI *et al.*, 2013).

O processo de pré-solubilização pode ser realizado de diversas maneiras. Segundo Loss e Hotchkiss (2003), existem plantas industriais, principalmente nos EUA, que adicionam CO₂ em queijo cottage, sendo os processos mais comuns a adição de CO₂ na fase gasosa da embalagem, o borbulhamento no creme de leite antes da mistura com a massa coalhada e a dispersão direta no produto final. A colocação do alimento em um vaso pressurizado com CO₂ tem sido utilizado em pesquisas (MENDES *et al.*, 2008, 2011; ROTABAKK *et al.*, 2008b; CABRAL, 2011) e, até o momento, é desconhecida a utilização industrial desse processo. O pré-envase de produtos em embalagens flexíveis com 100% de CO₂ na fase gasosa e altas razões g/p por períodos que podem variar de 2h a 24h, seguido do envase definitivo

também tem sido utilizado em pesquisas (LIMA, 2014; AL-NEHLAWI *et al.*, 2012; ROTABAKK *et al.*; 2008a).

Chen e Hotchkiss (1991) adicionaram CO₂ no creme de leite, que posteriormente é incorporado à massa coalhada no processo de fabricação de queijo cottage. A solubilização no creme é realizada em um tanque refrigerado por 2 horas a 275 kPa de pressão de CO₂. Após a carbonatação o creme é misturado à massa em um misturador com pressão positiva de CO₂, sendo o produto envasado em embalagem de alta barreira. A concentração de CO₂ dissolvido não foi medida diretamente, sendo avaliado a composição na fase gasosa da embalagem, que entrou em equilíbrio com aproximadamente 40% de CO₂ (v/v). O processo obteve considerável aumento de vida útil, ultrapassando os 80 dias para o produto carbonatado e armazenado a 4 °C (contagem total em placas <10⁵ UFC g⁻¹), em comparação ao produto sem carbonatação que armazenado na mesma temperatura obteve contagens microbianas da mesma magnitude antes dos 40 dias e alcançou contagens superiores a 10⁷ UFC g⁻¹ no quinquagésimo dia de armazenamento.

Outros estudos com queijo cottage demonstraram a inibição de bactérias Gram negativas, *Pseudomonas* spp., psicrotróficos, bolores e leveduras e bactérias ácido lácticas pela adição de CO₂ (KOSIKOWSKI e BROWN, 1972; CHEN e HOTCHKISS, 1991; MOIR *et al.*, 1993; MANIAR *et al.*, 1994;)

Os principais trabalhos envolvendo a solubilização em alimentos em câmaras pressurizadas foram realizadas com pressões parciais de CO₂ variando de 200 a 400 kPa em processos de 30 minutos a 2 horas de duração (MENDES *et al.*, 2008; 2011; ROTABAKK *et al.*, 2008b). Lima (2014) avaliou processos de 65 horas em pressões parciais de CO₂ de 200 a 600 kPa em câmara pressurizada e também pré-solubilização em embalagens flexíveis com aproximadamente 100 kPa de CO₂ durante 2 horas.

O processo SGS, como o nome sugere, visa a estabilização dos gases solúveis no interior da embalagem final, tendo como um dos principais objetivos a redução do colapso da embalagem. Contudo, esse processo pode ser utilizado com foco no maior aproveitamento da embalagem e, na maior parte dos estudos com SGS, os produtos são embalados com baixos graus de enchimento. Nehlawi *et al.* (2013) embalaram coxas de frango em atmosfera modificada (13,4 % de O₂, 69,2 % de CO₂ e 17,4 % de N₂) após o tratamento SGS, utilizando 40 %

de enchimento da embalagem. Rotabakk *et al.* (2010) utilizaram aproximadamente 36 % de enchimento das embalagens. Em outro trabalho, Rotabakk *et al.* (2008a) avaliaram graus de enchimento variando de 24 a 48 %. Mendes *et al.* (2008) embalaram sardinha com aproximadamente 33 % de enchimento da embalagem após tratamento SGS. Já Mendes *et al.* (2011) não citaram o grau de enchimento da embalagem em estudo com polvo cozido. Lima (2014) utilizou graus de enchimento abaixo de 20 % no processo de SGS com mexilhão.

Os estudos de pré-solubilização de CO₂ com envase em embalagens flexíveis ou semi-flexíveis com atmosfera modificada apontam menores alterações no volume da embalagem em comparação com a atmosfera modificada tradicional, atingindo um dos principais objetivos do processo SGS, que é a estabilização dos gases solúveis na atmosfera modificada.

As alterações que envolvem a troca de massa de CO₂ nos sistemas de embalagem são quantificadas principalmente pelas mudanças de CO₂ na fase gasosa e volume da embalagem, podendo ter diferentes motivos (LOSS e HOTCHKISS, 2003). A diminuição da fração de CO₂ na fase gasosa da embalagem pode estar relacionada com a solubilização do gás no alimento, consumo por microrganismos anaeróbios e permeação através da embalagem, enquanto o aumento da quantidade desse gás está relacionada com a proliferação microbiana, reações bioquímicas com produção de CO₂ durante a maturação de queijos (JURIC *et al.*, 2003) além da possibilidade de dessorção de CO₂ nos casos de processos de pré-solubilização (JAKOBSEN e RISBO, 2009; KHOSHGOZARAN *et al.*, 2012; CABRAL, 2011).

Um dos métodos utilizados para quantificar as mudanças no volume da embalagem e fornecer dados para cálculos sem, contudo, necessitar de amostras destrutivas, é a medida da força de empuxo. Esse ensaio é normalmente realizado em um texturômetro, sendo o volume da amostra imersa em água determinado em função da força resultante na célula de carga (ROTABAKK *et al.*; 2007; MEREDTH *et al.*, 2014).

Modelos matemáticos são desenvolvidos para a predição das condições de equilíbrio desses sistemas (ROTABAKK *et al.*, 2008; JAKOBSEN e RISBO, 2009; SIMPSON *et al.*, 2001a,b; 2009; CABRAL, 2011; CHAIX *et al.*, 2015b). O modelo matemático de Rotabakk *et al.* (2008a) leva em consideração a solubilidade do CO₂, N₂ e O₂ no sistema. Apesar de maior precisão nos resultados devido às suas considerações, os resultados do modelo de Rotabakk *et al.* (2008a) não

diferem dos resultados encontrados por Cabral (2011), cujo modelo considera apenas solubilização de CO₂ nos alimentos, muito semelhante aos modelos de Simpson *et al.* (2009) e Jakobsen e Risbo (2009). Todos eles consideram que o CO₂ dissolvido no alimento segue a lei Henry. Simpson *et al.* (2001a) concluem que os gases N₂ e O₂ podem ser considerados inertes em produtos com elevado teor de umidade e baixos teores de lipídeos.

2.7 IMPORTÂNCIA DA EMBALAGEM

A tecnologia de embalagens ocupa uma posição estratégica no processamento de alimentos. A seleção do material adequado é uma etapa fundamental do desenvolvimento de produtos (BERK, 2013). Basicamente, as embalagens possuem quatro funções: contenção, proteção/preservação, conveniência e comunicação. Cada uma dessas funções contém diferentes tecnologias aplicadas, aspectos de engenharia e objetivos comerciais (BERK, 2013).

Em alimentos, sem dúvida alguma, a principal função das embalagens é a proteção e preservação. Utilizando barreiras em maior ou menor grau entre o alimento e o ambiente externo, as embalagens protegem os alimentos contra danos físicos, químicos, micro e microbiológicos, tendo um impacto decisivo na vida útil do produto (BERK, 2013).

Filmes de materiais plásticos representam 90% dos materiais utilizados em atmosfera modificada, sendo o restante representado por materiais cartonados, filmes de alumínio, compartimentos de metais e vidros (GOSWAMI e MANGARA, 2011).

A preservação de alimentos com atmosfera modificada ou injeção direta de CO₂ deve tomar devida atenção à permeabilidade da embalagem para gases, visto que o efeito microbiostático do CO₂ pode ser reduzido ou perdido pela permeação através do filme (HOTCHKISS *et al.*, 1999).

Gases e vapor d'água podem atravessar os materiais poliméricos das embalagens utilizadas em atmosfera modificada por difusão molecular ou através de fluxo por microfuros e poros existentes na matriz polimérica (BERK, 2013). O mecanismo pelo qual gases e vapor d'água atravessam filmes poliméricos intactos é chamado de permeação, que envolve dissolução ou adsorção em uma face do filme, difusão

molecular através do filme, e desorção na face oposta (ver Figura 2-3). Todos os fenômenos governados pela diferença de pressão parcial do permeante entre os dois lados do filme (LEWIS *et al.*, 2003; SIRACUSA, 2012). A performance da barreira de determinado filme é expressa em termos de sua permeabilidade. A permeabilidade é igual ao produto da difusividade com a solubilidade do permeante no filme, conforme Equação (8) (GOSWAMI e MANGARA, 2011; SIRACUSA, 2012).

$$k = D S \quad (8)$$

onde k é a permeabilidade, D é o coeficiente de difusão e S é a solubilidade do permeante no filme.

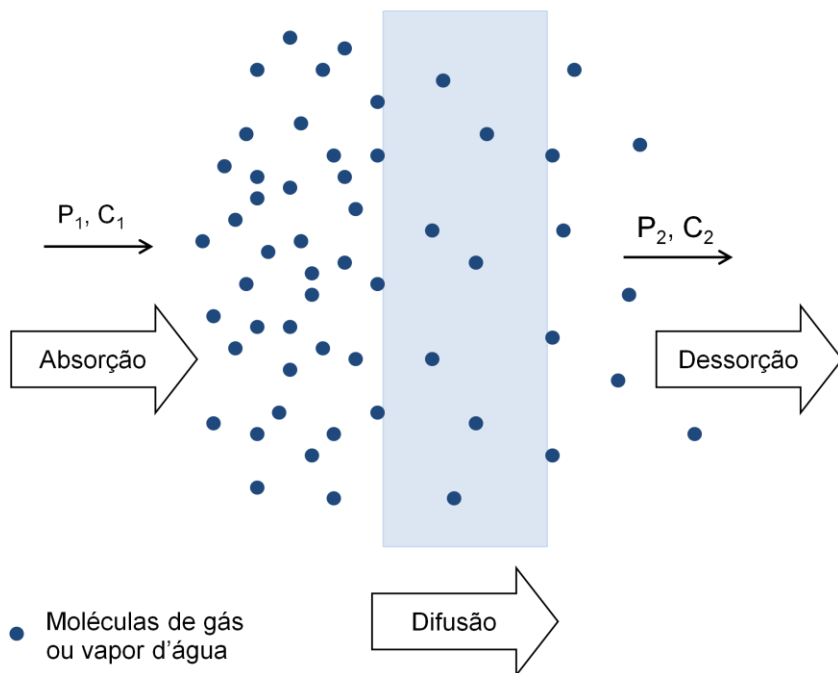
Diversos fatores podem influenciar as propriedades de barreira dos filmes poliméricos de embalagens, como o contato com o alimento e condições ambientais (temperatura, umidade relativa, etc.) A difusão através do filme é influenciada pela estrutura do filme, sua permeabilidade, espessura, área, temperatura e diferença de pressão ou concentração entre as faces opostas do filme.

Para transferência de massa em estado estacionário unidirecional, a permeabilidade é relacionada com a quantidade de permeante que atravessa o filme, de acordo com a Equação (9).

$$k = \frac{Qx}{A t \Delta P} \quad (9)$$

onde k é a permeabilidade do filme (cm^3 (stp) $\mu\text{m m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$), Q é a quantidade de permeante que atravessa o filme (cm^3 (STP)), x é a espessura do material (μm), A é a área da superfície disponível para a transferência de massa (m^2), t é o tempo (dia) e ΔP é a diferença de pressão parcial do permeante entre os dois lados do filme (kPa). Muitas unidades são adotadas para descrever a permeabilidade, de acordo com a conveniência de cada uso.

Figura 2-3 Mecanismo geral de permeação de gás e vapor d'água através de filmes plásticos poliméricos



Fonte: Adaptado de Siracusa (2012)

No caso de filmes multicamadas, co-extrudados ou laminados, a permeabilidade pode ser calculada pela espessura de cada camada e suas respectivas permeabilidades dos polímeros puros, conforme Equação (10) (ABDEL-BARY, 2003; GOSWAMI e MANGARAJ, 2011; SIRACUSA, 2012):

$$k = \frac{x_t}{\sum_{i=1}^n x_i/k_i} \quad (10)$$

onde k é a permeabilidade do filme multi camada ($\text{cm}^3 \text{ (stp)} \mu\text{m m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$), x_t é a espessura total do filme (μm), x_i é a espessura de cada

camada (μm) e k_i é a permeabilidade do polímero genérico "i" (cm^3 (stp) $\mu\text{m m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$).

A permeabilidade dos principais polímeros utilizados em embalagens flexíveis para alimentos são mostrados na Tabela 1. É possível observar que os principais polímeros utilizados em embalagens para alimentos (polietileno e polipropileno) possuem baixa barreira para O_2 e CO_2 .

Tabela 1 - Permeabilidade de filmes poliméricos utilizados em embalagens para alimentos.

Polímero	Permeabilidade ($\text{cm}^3(\text{stp}) \mu\text{m m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)		Permeabilidade vapor d'água ($\text{g } \mu\text{m m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Razão CO_2/O_2
	CO_2	O_2		
LDPE	9600	2740	18,75	3,5
PP	3120	600	-	5,2
EVA	11000	1800	187,5	6,1
PS	5500	1450		3,8
PET	60-100	12-24	16-21	4,9
Poliamida (<i>Nylon-6</i>)	101	25,4	640	4,0
Poliamida	170	100	20-56	1,7
PVDC	15	3,9	35	3,8
EVOH	0,8	0,024	33	33,3
PVOH	0,4	0,9	-	0,4

Fonte: Adaptado de Goswami e Mangaraj (2011)

Segundo Fonseca (2014), os principais materiais utilizados como barreira à umidade, O_2 e CO_2 são o EVOH, PA (poliamida), PET (politereftalato de etileno) e PVDC (poli-cloreto de vinilideno), sendo o EVOH o principal polímero de barreira a gases e outros compostos de baixa massa molecular, exceto água.

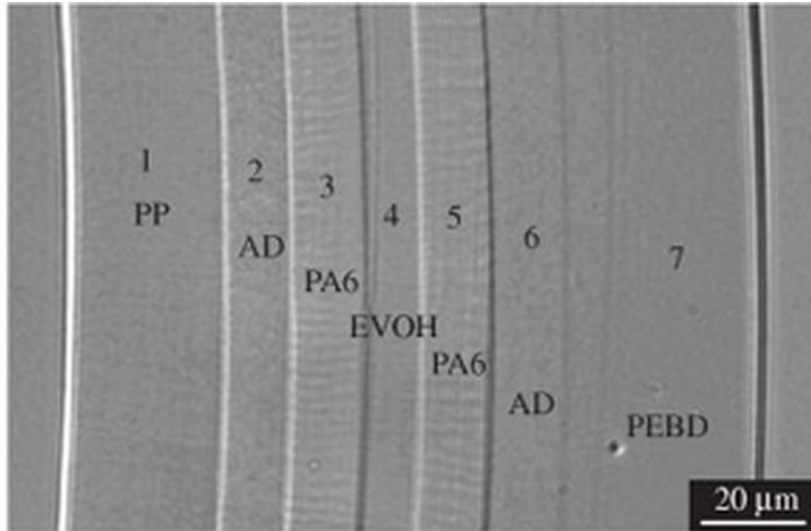
O polímero EVOH (álcool vinílico de etileno) é um copolímero de etileno com álcool vinílico. A presença de grupos -OH em sua estrutura resulta em fortes pontes de hidrogênio intermoleculares, fornecendo excelente barreira a gases, principalmente ao O₂ (GOSWAMI e MANGARAJ, 2011). Por outro lado, as pontes de hidrogênio fazem com que o material seja sensível à umidade, e a medida que umidade aumenta a barreira aos gases diminui. Por essa razão são comuns a utilização de filmes multicamadas nas quais o EVOH é incorporado em uma camada intermediária por coextrusão, revestido por poliolefinas ou outros polímeros com boa barreira ao vapor d'água, melhorando a barreira e custos envolvidos (GOSWAMI e MANGARAJ, 2011; FONSECA, 2014).

O PET (tereftalato de polietileno) também apresenta boa barreira ao O₂ e CO₂, sendo amplamente utilizado em bebidas carbonatadas. Além da maior espessura, quando comparado com filmes flexíveis, inúmeros tratamentos são utilizados para conferir melhores propriedades de barreira aos polímeros de PET (ABDEL-BARY, 2003).

A Figura 2-4 ilustra um filme multicamada de alta barreira (CRIPA *et al.* 2007). Observa-se que a retenção de CO₂, O₂, odores e aromas é realizado principalmente pela camada de EVOH, enquanto que vapores d'água são retidos pelas camadas de PA, PP e PEBD.

Segundo Hotchkiss *et al.* (2006), um dos fatores mais importantes que afetam o uso de CO₂ em produtos lácteos é a barreira insuficiente ao CO₂ dos materiais de embalagens. O benefício da adição de CO₂ no produto é mínimo se o gás é dissipado para o ambiente através da embalagem. Moir *et al.* (1993) verificaram rápido decréscimo da concentração de CO₂ em queijo cottage embalado em tubos de plásticos poliestireno. Hotchkiss *et al.*, (1997) mostram que os tempos para alcançar contagem padrão de 10⁶ UFC ml⁻¹ em leite pasteurizado refrigerado a 6,1 °C com concentrações de CO₂ de 0, 372 e 920 ppm foram de 6,4, 8,0 e 10,9 dias para embalagens de baixa barreira ao CO₂. Em embalagens de alta barreira os tempos para alcançar a mesma contagem de 10⁶ UFC ml⁻¹ foram de 9,7 e 13,4 dias para concentrações de 372 e 919 ppm de CO₂, respectivamente.

Figura 2-4 - Micrografia ótica de filme multicamada.



Fonte: Cripa *et al.* (2007).

Segundo Siracusa (2012), considerando a difusão unidirecional e que a solubilidade e o coeficiente de difusão do gás não são influenciados pela concentração do permeante, a difusão é caracterizada com o comportamento "*Fickiano*". Evidentemente, existem inúmeros casos reais em que esta hipótese não é válida, como por exemplo, quando a solubilidade e a difusividade do permeante estão relacionadas com interações entre o permeante e o polímero e influências de fluxos de vapores de solventes e água. Nesses casos são observados comportamentos difusivos não "*Fickianos*".

2.8 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A modelagem do crescimento microbiano com foco na segurança microbiológica e na deterioração de alimentos é cada vez mais aceita como metodologia eficiente na avaliação da segurança e determinação da vida útil de alimentos (ZWIETERING *et al.*, 1991; SUTHERLAND *et al.*, 1997; LONGHI, 2012; TENENHAUS-AZIZA e ELLOUZE, 2014).

Devido à complexidade dos reais fenômenos que ocorrem na biologia, os modelos matemáticos contêm, inevitavelmente, simplificações importantes. A consideração da população microbiana homogênea, descartando a possibilidade de distribuição de células no espaço ou a consideração do fenômeno ser controlado por apenas alguns fatores, quando na realidade outros fatores influenciam o fenômeno, são exemplos dessas simplificações encontradas nos modelos preditivos (BARANYI e ROBERTS, 1995).

O crescimento dos microrganismos nos alimentos é função de fatores ambientais intrínsecos (atividade de água (a_w), pH, concentração de CO_2 dissolvido, teor de NaCl, umidade, entre outros) e extrínsecos (temperatura, pressão). A microbiologia preditiva tem o objetivo de descrever matematicamente o crescimento (ou inativação) de microrganismos em condições específicas, dadas pelos fatores intrínsecos e extrínsecos. O sucesso do modelo matemático na descrição do fenômeno estudado permite sua utilização na predição do comportamento microbiano em determinadas condições, obedecendo os limites dos parâmetros utilizados na obtenção dos dados.

Basicamente, os modelos determinísticos em microbiologia preditiva são divididos em modelos primários, secundários e terciários. O crescimento microbiano é, normalmente, expresso pelo logaritmo em base 10 da concentração de células ao longo do tempo, apresentando perfil sigmoidal (ZWIETERING *et al.*, 1992; McKELLAR e LU, 2003).

Os modelos de crescimento primários são aqueles que descrevem as curvas de crescimento ou sobrevivência de microrganismos cujos parâmetros ajustáveis comumente utilizados são a duração da fase lag (λ), velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}) e população máxima na fase estacionária (A). Os modelos secundários correlacionam os parâmetros λ e μ dos modelos primários com fatores ambientais, como pH, temperatura, atividade de água, concentração de NaCl, nitratos, nitritos, CO_2 dissolvido, etc. Os modelos terciários englobam os modelos primários e secundários para a predição de crescimento em diferentes condições ambientais, normalmente transformados em *softwares* que permitem comparações entre formulações, crescimento de diferentes microrganismos, análise de risco, etc. (McKELLAR e LU, 2003; LONGHI, 2012; TENENHAUS-AZIZA e ELLOUZE, 2014).

Os modelos primários de crescimento mais utilizados são o Modelo de Gompertz, Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico (SLONGO, 2011).

Os modelos terciários/*Softwares* utilizam banco de dados de crescimento microbiano para predição do comportamento microbiano em alimentos ou meios de cultura. *Softwares* como o *ComBase*, *MicroHibro*, *FISHMAP* e o *Food Spoilage and Safe Predictor (FSSP)* são exemplos importantes da acessibilidade desses modelos (TENENHAUS-AZIZA e ELLOUZE, 2014).

Dentre os citados acima, os *Softwares* FSSP e FISHMAP possuem a ferramenta para avaliação da concentração de CO₂ dissolvido na fase aquosa no crescimento de microrganismos específicos. Embora, até o momento, o principal banco de dados disponível gratuitamente seja para peixes, a aplicação desses *softwares* é bastante versátil. O cálculo da concentração de CO₂ dissolvido é realizado com dados da solubilidade do gás na água. Por exemplo, simulando no FSSP peixe fresco embalado em 80 % de CO₂ com razão g/p de 1 (50% de enchimento da embalagem) a 7 °C, os dados de equilíbrio fornecidos pelo *software* são: 1229 mg de CO₂ L⁻¹ na fase aquosa e 47,1 % de CO₂ na fase gasosa no equilíbrio. Utilizando o ajuste de Carrol *et al.*, (1991), que correlaciona a constante de Henry do CO₂ solubilizado em água em função da temperatura, e o modelo de predição das condições de equilíbrio de Cabral (2011), para as mesmas condições iniciais, o seguinte equilíbrio é obtido após simulação: 1188 mg L⁻¹ de CO₂ dissolvido na fase aquosa e 46,1 % de CO₂ na fase gasosa no equilíbrio.

O *software Combase* possui, para algumas bactérias e condições, o efeito inibidor do CO₂, considerando atmosfera constante e concentração do gás homogênea no alimento ou meio de cultura. Nenhum *software* disponível contempla a integração entre transferência de massa no alimento, embalagem e cinéticas de composição gasosa (CHAIX *et al.*, 2015a). Recentemente, Guillard *et al.* (2016) se propões ao acoplamento dos fenômenos de transferência de massa, cinéticas respiratórias e seus impactos no crescimento de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas sp.*

Embora a consideração da solubilização do CO₂ apenas na fase aquosa do alimento possa ser utilizada em alguns casos com resultados satisfatórios, fortemente dependente do teor e composição da fração lipídica, é importante avaliar que a consideração acima não representa adequadamente sistemas com atmosfera modificada com produtos de

elevado teor lipídico e não englobam as cinéticas de alteração da composição gasosa.

Sutherland *et al.* (1997) avaliaram a capacidade de crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 em atmosferas de CO₂ variando de 10 a 80 %, com pH entre 4,5 – 7,0, temperatura entre 10 - 30 °C e concentração de NaCl entre 0,5 – 6,5 % (p/v). Os dados de crescimento obtidos foram ajustados ao modelo de Baranyi e Roberts (1994).

Os estudos de crescimento de microrganismos patogênicos na presença de CO₂ são importantes devido à preocupação gerada pela supressão do crescimento de microrganismos deteriorantes e o possível crescimento de patógenos em condições ambientais de relativa não competitividade (DUFRENSE *et al.*, 2000; HOTCHKISS *et al.*, 2006)

Diversos microrganismos tem seus parâmetros de crescimento afetados pela concentração de CO₂ dissolvido em alimentos (DIXON e KELL, 1989; MARTIN *et al.*, 2003). Roberts e Torrey (1988) avaliaram o efeito da dissolução de 20 a 30 mM de CO₂, equivalente a aproximadamente 850 a 1280 ppm, no crescimento de psicotróficos proteolíticos em leite armazenado a 7 °C. Os autores demonstram um aumento do tempo de geração (redução da velocidade de crescimento) e um aumento da fase lag de crescimento.

Martin *et al.* (2003) avaliaram o efeito da dissolução de 25 a 2600 ppm de CO₂ em leite na duração da fase lag, velocidade máxima de crescimento e população máxima de diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos medidos por condutância. O modelo de Gompertz foi ajustado aos dados. Para todos os microrganismos estudados Martin *et al.* (2003) reportam um impacto da adição de CO₂ ao leite nos parâmetros de crescimento, sendo maior a influencia da adição de CO₂ em bactérias Gram-negativas.

Guillard *et al.*, (2016), acoplaram modelos de transferência de massa do alimento e no filme da embalagem, modelos de respiração microbiana e modelos de crescimento microbiano para prever o crescimento em condições transientes de composição gasosa. Dentre os possíveis benefícios do uso do acoplamento desses modelos está a correta escolha da embalagem. Segundo os autores, muitos são os casos em que a barreira à permeação de gases da embalagem é superestimada, sem comprovação da real necessidade. Além dos custos diretos com embalagens superdimensionadas, há o impacto ambiental do uso de filmes multicamadas cuja reciclagem muitas vezes é prejudicada.

O impacto da composição gasosa no crescimento microbiano é, usualmente, avaliado com a abordagem "*pack-and-tray*", na qual o comportamento microbiano é avaliado em função da composição gasosa. Essa abordagem empírica fornece poucos dados elucidativos sobre a relação entre composição gasosa e crescimento microbiano (CHAIX *et al.*, 2015a) Ainda, poucos estudos avaliaram simultaneamente o impacto do CO₂ e O₂ no crescimento microbiano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os queijos utilizados no presente trabalho foram adquiridos diretamente de indústria local fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E.). Apenas o fluxo de produção básico é informado devido ao sigilo industrial solicitado pela empresa. De modo geral, a fabricação de queijo frescal é um processo simples e que pode variar entre diferentes regiões do Brasil e entre diferentes indústrias.

O queijo Minas frescal tradicional foi formulado a partir de leite integral padronizado (3% de gordura), homogeneizado e pasteurizado (72 °C por 15 segundos). O leite foi acidificado pela ação de fermento láctico termofílico e adição direta de ácido láctico, adicionado de CaCl_2 e coagulante (quimosina). Após coagulação a 38 °C, ocorre a mexedura lenta da massa seguida de corte manual. Após dessoragem, a massa é enformada e sofre viradas sucessivas, seguindo para a salga úmida em temperaturas inferiores a 10 °C.

O queijo Minas frescal *light* utilizado nesse trabalho foi adquirido da mesma indústria, elaborado com leite semi-desnatado pasteurizado (72°C por 15 segundos). Os processos de fabricação são semelhantes aos processos do queijo Minas tradicional, exceto pela utilização exclusiva de ácido láctico na acidificação do leite.

A gordura láctea bovina anidra foi produzido no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (PROFI-UFSC), a partir de manteiga sem sal adquirida em mercado local. O produto foi aquecido sob agitação até temperaturas ente 100 °C - 130 °C. Os resíduos sólidos não lipídicos sofrem aglomeração após aproximadamente 20-30 minutos, podendo ser retirados com filtração. A gordura clarificada foi filtrada três vezes. O resultado é uma gordura isenta de matéria sólida não lipídica e de umidade, popularmente conhecida como manteiga clarificada.

A Tabela 2 apresenta a composição lipídica, umidade, concentração de NaCl e atividade de água de queijo Minas Frescal tradicional e *light*. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC (LABCAL).

Tabela 2 - Composição lipídica, umidade, % NaCl e atividade de água de queijo Minas frescal tradicional e *light*.

	Composição queijo Minas frescal		
	Tradicional	<i>Light</i>	Método
Umidade (g/100g)	54,1	62,2	Instrução Normativa nº 68
Lípidios (g/100g)	22,2	14,0	Instrução Normativa nº 68
NaCl (g/100g)	1,20	0,87	Método: AOAC, nº 969,23
a _w	0,99	0,99	Aqualab

As densidades aparentes determinadas experimentalmente pela razão entre massa e volume das amostras são 1,03, 1,03 e 0,93 g cm⁻³, para queijo Minas frescal tradicional, *light* e gordura láctea bovina anidra, respectivamente.

3.2 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS

3.2.1 Determinação da constante de Henry do CO₂

Os procedimentos descritos a seguir forma utilizados para a determinação da constante de Henry do CO₂ dissolvido em queijo Minas frescal tradicional, queijo Minas frescal *light* e gordura láctea bovina anidra. Para os ensaios de determinação dos parâmetros físicos, os queijos utilizados foram adquiridos, no máximo, quatro dias após a produção.

Amostras cilíndricas com de 28 mm de diâmetro e massa variando entre 52 e 60g foram colocadas em um vaso hermético, conforme ilustrado pela Figura 3-1, para determinação da constante de Henry utilizando método manométrico adaptado de Siversvik *et al.* (2004a) e Cabral (2011). A altura do cilindro foi calculada em função do volume para cada experimento.

O recipiente cilíndrico encamisado foi confeccionado em aço inoxidável (tipo 316 L) e dimensões de 0,057 m de diâmetro e 0,205 m altura medidos internamente. A temperatura do sistema foi mantida constante pela passagem de água pela camisa conectada a um banho termostatzado (Quimis, 6214m2, Brasil).

Para registro da temperatura do gás e do produto, dois termopares tipo J (ferro-constantan, Salvi Casagrande, Brasil) foram instalados no interior da câmara. A pressão total do sistema foi medida por um transdutor de pressão relativa (Velki, modelo IT-TR, 4-20 mA, Brasil). O transdutor de pressão e os termopares foram ligados a um sistema de aquisição de dados (Agilent, Data Acquisition 34970A, EUA), conectado ao computador com auxílio do *software* Benchlink Data Logger 3.0 (Agilent, 2009). Foram coletados dados de pressão e temperatura a cada 30 segundos durante os experimentos.

O aparato foi equipado com duas válvulas micrométricas (Swagelok, Brasil), sendo uma conectada ao cilindro de CO₂ (Linde, 99,9% de pureza, Brasil) e outra utilizada para saída do gás, alívio da pressão e medidas da composição gasosa.

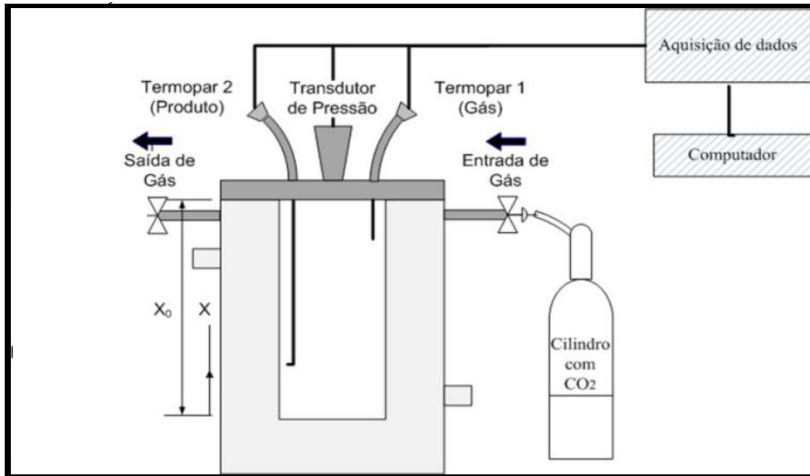
Para verificar o fechamento hermético do aparato foram realizados testes isotérmicos com CO₂ no recipiente vazio, com duração de aproximadamente 24 horas e pressão relativa de 200 kPa. O volume interno livre total do equipamento, incluindo volume livre das válvulas e conexões, é de 538 cm³, determinado pelo volume de água destilada que pode ser adicionada em seu interior.

A constante de Henry para o CO₂ dissolvido no produto foi determinada pela razão entre pressão parcial de CO₂ e concentração de CO₂ dissolvido, ambas em equilíbrio, conforme a Equação (11).

$$H_{CO_2_p} = \frac{P_{CO_2}^\infty}{C_{CO_2}^\infty} \quad (11)$$

onde $H_{CO_2_p}$ é a constante de Henry para o CO₂ no produto (Pa ppm⁻¹), $P_{CO_2}^\infty$ é a pressão parcial de CO₂ no equilíbrio (Pa) e $C_{CO_2}^\infty$ é a concentração de CO₂ dissolvido no alimento (ppm).

Figura 3-1- Aparato experimental para determinação da solubilidade e coeficiente de difusão efetivo do CO₂ em alimentos que não respiram.



A concentração de CO₂ dissolvido no alimento foi determinada por um balanço de massa entre a fase gasosa e o alimento, considerando que toda variação de pressão do sistema é devido à solubilização de CO₂. Foi utilizada a equação cúbica de estado de Van der Waals (Equação (12)) para correlacionar a variação de pressão do sistema com a variação do número de mols de CO₂, considerando que não há solubilização de N₂ e O₂ no produto.

$$n = \left\{ \left[P_{CO_2} + a \left(\frac{n}{V_g} \right)^2 \right] (V_g - nb) \right\} \div RT \quad (12)$$

onde, a e b são parâmetros da equação cúbica de estado ($a = 0,3640 \text{ J m}^3 \text{ mol}^{-2}$ e $b = 4,27 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ para o CO₂).

A equação cúbica de Van der Waals foi solucionada por método iterativo até a convergência dos valores. O valor inicial do número de mols de CO₂ no processo iterativo foi dado pela equação dos gases ideais.

Para determinação da pressão parcial de CO₂, foram calculadas as frações de CO₂ na fase gasosa para cada intervalo de tempo de

medição (30 segundos). A fração inicial de CO_2 (% CO_2) foi determinada de acordo com a Equação (13), validada por ensaios preliminares realizados com o aparato experimental vazio, cuja a composição da fase gasosa após pressurização com CO_2 foi medida com analisador de gás (Checkmate II, PBI-Dansensor, Dinamarca).

$$\% \text{CO}_2^i = 0,99 \left(\frac{P_{total}^i - P_{atm}}{P_{total}^i} \right) 100 \quad (13)$$

onde, P_{total}^i é a pressão absoluta total do sistema no início do processo e P_{atm} é a pressão atmosférica e o índice 0,99 representa o grau de pureza do gás (99%).

A fração de CO_2 durante o experimento foi determinada considerando que toda a massa de N_2 e O_2 é constante na fase gasosa do sistema (considerados inertes), de acordo com a Equação (14).

$$\% \text{CO}_2(t) = \left(\frac{n_{\text{CO}_2}(t)}{n_{\text{CO}_2}(t) + n_{inerte}} \right) 100 \quad (14)$$

onde, $\% \text{CO}_2(t)$ é a fração de CO_2 na fase gasosa em função do tempo, $n_{\text{CO}_2}(t)$ é o número de mols de CO_2 em função do tempo, determinado pela equação de Van der Waals, e n_{inerte} é o número de mols de inerte (O_2 e N_2).

O número de mol de inerte foi calculado conforme Equação (15).

$$n_{inerte} = \frac{n_{\text{CO}_2}^i}{\% \text{CO}_2^i} - n_{\text{CO}_2}^i \quad (15)$$

Por fim, a concentração de CO_2 dissolvido no alimento foi dada pela variação molar de CO_2 na fase gasosa determinada pela variação de pressão total no sistema, conforme Equação (16). Para o cálculo da constante de Henry foi considerado o tempo de equilíbrio.

$$\bar{c}_{\text{CO}_2}(t) = \frac{(n_g^i - n_g^t) M_{\text{CO}_2}}{m_p} \quad (16)$$

onde, $\bar{C}_{CO_2}(t)$ é a concentração média de CO_2 no tempo t (ppm), n_g^i é o número de mols de CO_2 na fase gasosa no início do processo de solubilização, n_g^t é o número de mols de CO_2 no tempo t , M_{CO_2} é a massa molar de CO_2 ($mg\ mol^{-1}$) e m_p é a massa de produto (kg).

Substituindo a Equação (16) na Equação (11), quando o tempo tende a infinito, obtém-se a constante de Henry do CO_2 no alimento.

3.2.1.1 Predição da constante de Henry do CO_2 em produtos lácteos

Considerando que o CO_2 solubiliza nas fases aquosa e lipídica dos alimentos, conforme descreve a literatura científica, uma abordagem para prever a constante de Henry nos produtos lácteos em função do teor de umidade e gordura será proposta.

Utilizando as técnicas descritas no item 3.2.1, foi criado um banco de dados de solubilidade (inverso da constante de Henry) do CO_2 em gordura láctea bovina anidra em função da temperatura. Os valores para a constante de Henry do CO_2 em água são obtidos de acordo com Carroll *et al.* (1991), com uma equação de ajuste da solubilidade de CO_2 na água em função da temperatura.

A concentração de CO_2 dissolvido no alimento lácteo pode, em tese, ser predita de acordo com a Equação (17), já a constante de Henry do CO_2 dissolvido no alimento poderá ser predita de acordo com a Equação (18).

$$C_{CO_2}^{\infty} = P_{CO_2}^{\infty} \left(\frac{x_a}{H_a} + \frac{x_g}{H_g} \right) \quad (17)$$

$$H_p = \left(\frac{x_a}{H_a} + \frac{x_g}{H_g} \right)^{-1} \quad (18)$$

onde, $C_{CO_2}^{\infty}$ é a concentração de CO_2 dissolvido no produto no equilíbrio (ppm), $P_{CO_2}^{\infty}$ é a pressão parcial de CO_2 no equilíbrio (Pa), x_a e x_g são as frações mássicas de água e de gordura no produto, respectivamente, e H_a e H_g são as constantes de Henry para CO_2 dissolvido em água e gordura láctea bovina anidra respectivamente ($Pa\ ppm^{-1}$).

3.2.2 Determinação do Coeficiente de Difusão Efetivo (D_{ef})

O coeficiente de difusão efetivo do CO_2 em queijo foi estimado por um algoritmo de ajuste das concentrações médias de CO_2 , calculadas pela solução numérica da segunda Lei de Fick bidimensional em coordenadas cilíndricas, aos valores experimentais obtidos pela Equação (16). Iniciando o processo iterativo de estimativa do coeficiente de difusão efetivo por um valor típico para esse coeficiente, existe um valor único que minimiza o erro entre os valores experimentais e preditos. Essa técnica implementada é análoga à estimativa do coeficiente de difusividade térmica a partir de dados experimentais proposta por Carciofi *et al.* (2002).

O modelo matemático que descreve o fenômeno difusional bidimensional em coordenadas cilíndricas é dado pela Equação (19), com apenas um parâmetro ajustável, representado pelo coeficiente de difusão efetivo (D_{ef}). As condições de contorno são representadas pelas Equações (20) (A - condição inicial; B - simetria axial; C - simetria radial; D e E ausência de resistência a transferência de massa na interface). O modelo considera apenas difusão de CO_2 na amostra de queijo e concentração inicial de CO_2 nula.

O coeficiente de difusão efetivo do CO_2 foi determinado pelo ajuste do modelo difusional em duas dimensões (Equação (19)) aos dados obtidos pela Equação (16)

$$\frac{\partial C_{CO_2}}{\partial t} = D_{ef} \left[\frac{\partial^2 C_{CO_2}}{\partial x^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial (r \partial C_{CO_2} / \partial r)}{\partial r} \right] \quad (19)$$

$$0 < x < x_0, \quad 0 < r < R, \quad t = 0, \quad C_{CO_2} = 0 \quad (20A)$$

$$0 \leq x \leq x_0, \quad r = 0, \quad t > 0, \quad \frac{\partial C_{CO_2}}{\partial r} = 0 \quad (20B)$$

$$x = 0, \quad 0 \leq r \leq R, \quad t \geq 0, \quad \frac{\partial C_{CO_2}}{\partial x} = 0 \quad (20C)$$

$$x = x_0, \quad 0 \leq r \leq R, \quad t \geq 0, \quad C_{CO_2} = C_{CO_2}^s(t) = \frac{P_{CO_2}(t)}{H} \quad (20D)$$

$$0 \leq x \leq x_0, \quad r = R, \quad t \geq 0, \quad C_{CO_2} = C_{CO_2}^s(t) = \frac{P_{CO_2}(t)}{H} \quad (20E)$$

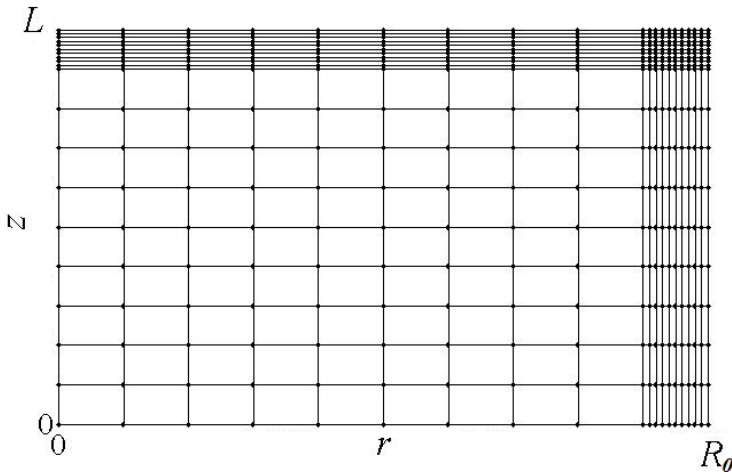
onde $C_{CO_2}^s$ é a concentração de CO_2 na superfície do queijo (calculada pela razão entre a pressão parcial de CO_2 na atmosfera e a constante de Henry experimental), D_{ef} é o coeficiente de difusão efetivo do CO_2 no queijo, H é a constante de Henry do CO_2 no produto, x_0 é a altura da peça cilíndrica de queijo e r_0 é o raio da peça cilíndrica de queijo, $P_{CO_2}(t)$ é a pressão parcial de CO_2 na fase gasosa do aparato experimental.

3.2.2.1 Solução numérica

O sistema de Equações representado pelas Equações (19) e (20) foi resolvido numericamente pelo método de diferenças finitas implícito, conforme descrito por Pantakar (1980). Uma malha refinada foi estruturada nas regiões de maior concentração, próxima à superfície da amostra, representada na Figura 3-2.

Os valores da concentração de CO_2 foram calculados variando o valor de D_{ef} de 10^{-9} a $10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, com incremento do valor de D_{ef} na ordem de $10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Os valores preditos pelo modelo foram comparados aos valores experimentais. O valor de D_{ef} que minimiza o RMSE (Equação (21)) foi considerado o valor otimizado do coeficiente.

Figura 3-2 - Representação da malha refinada nas direções axial e radial.



$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_t} (C_{CO_2p}^n - C_{CO_2e}^n)^2}{N_t}} \quad (21)$$

onde N_t é o número de dados experimentais, $C_{CO_2p}^n$ é concentração de CO_2 predito pelo modelo, $C_{CO_2e}^n$ é a concentração de CO_2 obtida experimentalmente.

A solução numérica foi validada com a solução analítica, utilizada para concentração na superfície constante. Para um cilindro finito a solução analítica é o produto da solução analítica para placa plana infinita e cilindro infinito (CRANK, 1975). Cinco termos da série foram utilizados na solução analítica.

3.3 PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO_2

O termo pré-solubilização de CO_2 é definido no presente trabalho como a solubilização do gás nas amostras antes do envase, diferindo da atmosfera modificada na qual a solubilização do gás ocorre após envase. A pré-solubilização de CO_2 nas amostras foi realizada em uma câmara cilíndrica, vertical, em aço inox (304), com 30 cm diâmetro por 20 cm de altura (medidas internas) encamisada para manutenção da temperatura com banho termostático (Quimis, 6214m2, Brasil) (

Figura 3-3). Os processos de pré-solubilização ocorreram a 7 °C. A câmara foi equipada com prateleiras perfuradas (tela "moeda") de aço inox (304) para o posicionamento das amostras, duas válvulas para entrada e saída de gás, um transmissor de pressão (Warme WTP - 4010, 0 - 10 V, Brasil) e um termopar tipo J (Casagrande, Brasil). A válvula de saída e alívio de pressão foi conectada a uma bomba de vácuo para a retirada do ar no início do processo e aumento da pressão relativa de CO_2 . Por questões de segurança, a pressão relativa máxima de trabalho adotada foi de 300 kPa.

Após a inserção das amostras de queijo na câmara de solubilização, foi realizado vácuo de 40 kPa de pressão absoluta no sistema, seguido da adição de CO_2 de grau alimentício (Linde, 99% de pureza, Brasil) até a pressão desejada. O tempo de pré-solubilização passou a ser contado após atingida a pressão de trabalho especificada. A pressão foi mantida constante durante o processo de pré-solubilização

com a regulagem da pressão da linha após o cilindro de gás com auxílio de válvula de regulagem de pressão (White Martins).

Figura 3-3 - Vaso de pressão para pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal.



Fonte: Autor

3.3.1 *Envase após pré-solubilização*

Uma vez atingido o tempo do processo de solubilização de CO₂ a câmara foi despressurizada e mantida fechada por cinco minutos, tempo padronizado para abertura da câmara. Em seguida as amostras foram embaladas imediatamente em filmes de alta barreira (Celofix, Brasil) com permeabilidades ao oxigênio (TPO₂) 55 (cm³ (stp) m⁻² dia⁻¹) e ao vapor d'água (TPVA) 62 (g m⁻² dia⁻¹). Lima (2014) utilizou a mesma embalagem em seus estudos e comprovou a elevada barreira ao

CO₂. A selagem foi realizada utilizando uma seladora bi-ativa (Selovac, Brasil). Após selagem as amostras foram armazenadas a 7 °C, sem incidência de luz. Para envase em atmosfera modificada a seladora foi ajustada para 4 segundos de vácuo, 12 segundos de gás (pressão da linha em 300 kPa) e 1,6 segundos de solda. Para envase a vácuo a seladora operou com 12 segundos de vácuo e 1,6 segundos de solda.

Duas conformações distintas foram utilizadas no estudo de pré-solubilização, descritas na Tabela 3. A Figura 3-4 apresenta fotografias das conformações descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Conformações utilizadas na pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal.

	Conformação 1	Conformação 2
Massa aproximada	30 g	20 g
Diâmetro	28 mm	72 mm
Altura aproximada	47 mm	5 mm
Envase	Ar	A.M.
Grau de enchimento (DF)	50-60%	<10%
Objetivo	Estabelecer atmosfera modificada sem adição dos gases no envase. Obter cinéticas de dessecção pelo aumento do volume.	Embarcar as amostras em condições próximas do equilíbrio e evitar alterações da composição gasosa ao longo do período de estocagem.
Experimentos	0 - queijo Minas frescal tradicional	1,2 - Queijo Minas frescal tradicional 3,4 - Queijo Minas frescal <i>light</i>

Figura 3-4 - Disposição das amostras de queijo (Conformação 1) na prateleira antes da inserção no vaso de pressão para o processo de pré-solubilização (A). Momento do envase em atmosfera modificada após processo de pré solubilização (Conformação 2) (B).



Fonte: Autor

3.3.2 Determinação da concentração de CO₂ atingida na pré-solubilização: conformação 1

A concentração inicial de CO₂ no alimento no momento do envase, após pré-solubilização, foi determinada por método indireto segundo Equação (22), a qual representa um balanço de CO₂ entre o alimento e a fase gasosa da embalagem, sendo a concentração inicial função da concentração atingida no alimento no equilíbrio ($P_{CO_2}^\infty/H_{CO_2,p}$) somada à variação da massa de CO₂ na fase gasosa da embalagem. A Equação (22) considera comportamento de gás ideal e embalagem de alta barreira. No caso do alimento ser embalado em atmosfera ausente de CO₂ ocorre, necessariamente, dessorção do gás para o volume livre da embalagem e, conseqüentemente, aumento de volume do sistema, enquanto que para os casos em que o alimento for embalado em atmosfera modificada, com pressão parcial de CO₂ diferente de zero, as condições de concentração de CO₂ dissolvido no alimento e a pressão parcial de CO₂, ambos no momento do envase, determinarão se haverá absorção ou dessorção de CO₂, conforme exemplificado na Figura 2-2 (CABRAL, 2011).

$$C_{CO_2}^{t=0} = \frac{P_{CO_2}^\infty}{H_{CO_2,p}} + \frac{M_{CO_2}}{R T m_p} (P_{CO_2}^\infty V_g^\infty - P_{CO_2}^{t=0} V_g^{t=0}) \quad (22)$$

onde, $C_{CO_2}^{t=0}$ é a concentração de CO₂ no produto no momento do envase (ppm), $P_{CO_2}^{t=0}$ é a pressão parcial no momento do envase, $V_g^{t=0}$ é o volume da fase gasosa da embalagem no momento do envase (m³), $P_{CO_2}^\infty$ é a pressão parcial no equilíbrio, determinado pelo analisador de gás (Pa), $H_{CO_2,p}$ é a constante de Henry do CO₂ no produto (Pa ppm⁻¹), V_g^∞ é o volume da fase gasosa da embalagem no equilíbrio (m³), M_{CO_2} é a massa molar do CO₂ (mg mol⁻¹) e m_p é a massa de produto (kg), R é constante universal dos gases (J mol⁻¹ K⁻¹) e T é a temperatura do sistema (K).

As amostras com CO₂ pré-solubilizado foram embaladas em atmosfera de ar e armazenadas sob refrigeração a 7 °C por 24 horas, até atingir equilíbrio ou pseudo equilíbrio. Foram realizadas leituras da composição da fase gasosa com analisador de gás (CHECKMATE II - PBI Dansensor, Dinamarca) e determinação do volume livre da embalagem utilizando o método da força resultante exercida pela embalagem imersa em água (ROTABAKK *et al.*, 2007), determinada

com auxílio de um texturômetro (TAXT2i, Stable Micro System, UK), de acordo com a Equação (23).

$$\begin{aligned}
 F_r &= F_e - F_p = \rho g V_t - m_t g \\
 \therefore V_t &= \frac{(F_r + m_t g)}{\rho g} \\
 V_t &= V_a + V_g + V_f + V_{placa} \\
 V_g &= \left(\frac{F_r + m_t g}{\rho g} \right) - (m_a / \rho_a + V_f + V_{placa}) \quad (23)
 \end{aligned}$$

onde, F_r é a força resultante dada pelo texturômetro, F_e é a força de empuxo, F_p é a força peso do sistema alimento/embalagem, ρ é a densidade da água, ρ_a é a densidade do alimento, m_t é massa total do sistema compreendido pelo alimento, filme da embalagem e fase gasosa, m_a é a massa do alimento, V_t é o volume total do sistema, V_a é o volume do alimento, V_g é o volume da fase gasosa, V_f é o volume do filme da embalagem, V_{placa} é o volume imerso da placa (probe) adaptada ao texturômetro que segura a embalagem imersa na água e g é a aceleração da gravidade. Todas as grandezas no Sistema Internacional de Unidades.

A Equação (22) permite a determinação da concentração inicial do alimento no ato de embalar com duas medidas simples, composição e volume da fase gasosa.

O volume do alimento é determinado pela razão entre massa e densidade aparente.

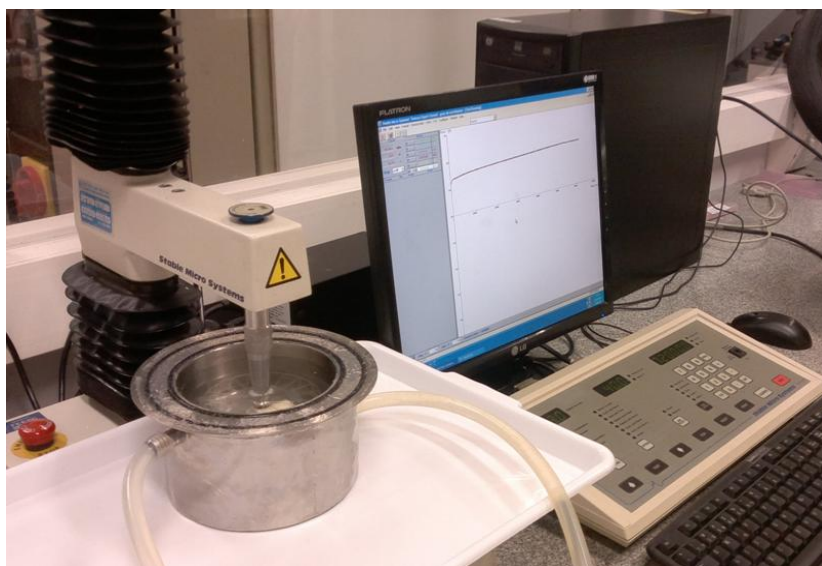
3.3.2.1 *Tempo para equilíbrio após envase (conformação 1)*

O tempo para o equilíbrio é importante pois as medidas descritas no item 3.3.2 devem ser realizadas necessariamente no equilíbrio ou muito próximo dele. O texturômetro utilizado no método do empuxo (Stable Micro System, TA.XT2i, Inglaterra) permite aquisição dos dados durante até 83 horas, com leitura de seis pontos por minuto. Deste modo, foi possível a avaliação do volume do sistema pelo método da força de empuxo de maneira contínua. Para esse

experimento, as amostras foram imersas em água a 7 °C até força constante.

Utilizando a Equação (23), o aumento do volume livre da embalagem pode ser correlacionado de modo contínuo com o aumento da força resultante devido à dessorção de CO₂ da amostra de queijo e consequente aumento do volume total da embalagem. Considerando que toda variação de volume do sistema é devido à liberação ou absorção de CO₂, a composição gasosa do volume livre da embalagem em função do tempo pode ser obtida utilizando a Equação (26), obtida das Equações (24) e (25).

Figura 3-5 - Aparato experimental desenvolvido para quantificação das alterações de volume da embalagem devido às cinéticas de dessorção de CO₂. Método contínuo utilizando o texturômetro.



Fonte: Autor

$$n_{CO_2}(t) = n_{CO_2}^{t=0} + \frac{\Delta V_g(t) P_T}{RT} \quad (24)$$

$$n_i = \frac{V_g^0 (P_T - P_{CO_2}^{t=0})}{RT} \quad (25)$$

$$\% CO_2(t) = \frac{n_{CO_2}(t)}{n_{total}(t)} = \frac{n_{CO_2}(t)}{n_{CO_2}(t) + n_i} \times 100 \quad (26)$$

onde $n_{CO_2}(t)$ é o número de mols de CO_2 em função do tempo, $\Delta V_g(t)$ é a variação de volume da fase gasosa da embalagem, P_T é a pressão total do sistema, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura, n_i é o número de mols dos gases considerados inertes (N_2 e O_2), V_g^0 é o volume da fase gasosa inicial, $\% CO_2(t)$ é fração de CO_2 em função do tempo e $n_{total}(t)$ é o número de mols total na fase gasosa. Todas as grandezas no Sistema Internacional de unidades.

3.3.3 *Influência do CO_2 no crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas - Conformação 1 embalado em ar após pré-solubilização*

Os queijos foram adquiridos diretamente do produtor após processo normal de fabricação. O leite foi acidificado pela adição de cultura láctea termofílica e adição direta de ácido láctico. Os queijos embalados a vácuo pelo fabricante foram retirados de sua embalagem original e fracionados em peças cilíndricas de aproximadamente 30 g, com 28 mm de diâmetro. Pelo menos seis amostras foram obtidas para cada peça de queijo.

A contagem de bactérias psicotróficas foi realizada pelo método descrito em *Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods* (American Public Health Association - APHA, 2001). A contagem de bactérias ácido lácticas foi realizada conforme método ISO 15214: 2003. Os limites de detecção são de 100 e 10 UFC g^{-1} para bactérias psicotróficas e ácido lácticas, respectivamente.

Para avaliar a influência do CO_2 no crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas em queijo fresco estocado a 7 °C foram utilizadas concentrações de CO_2 dissolvido no equilíbrio na embalagem final de aproximadamente 500, 1000 e 1500 ppm, além do tratamento controle sem adição de CO_2 . As amostras foram classificadas em quatro grupos: $C_{CO_2}^0$, $C_{CO_2}^{500}$, $C_{CO_2}^{1000}$ e $C_{CO_2}^{1500}$, referentes às concentrações das amostras controle embaladas a vácuo e às três concentrações atingidas no equilíbrio com o processo de pré-solubilização, em ordem crescente de concentração.

Os tratamentos necessários para alcançar as concentrações desejadas foram determinados em ensaios preliminares. As correlações entre as concentrações no envase e a de equilíbrio foram calculadas segundo modelo de equilíbrio desenvolvido por CABRAL (2011), cujos dados de entrada são: grau de enchimento da embalagem (DF), pressão parcial inicial de CO₂ na fase gasosa ($P_{CO_2}^0$), constante de Henry do CO₂ no produto ($H_{CO_2,p}$), concentração inicial de CO₂ dissolvido e temperatura.

As amostras controle foram embaladas a vácuo, semelhante ao utilizado comercialmente pelo fabricante (pressão manométrica negativa de 80 kPa).

As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata para cada grupo de microrganismos, nos tempos 1, 4, 7, 11, 14, 21, 28 e 35 dias após o processo de pré-solubilização.

3.3.4 Influência do CO₂ no crescimento de bactérias psicotróficas e ácido lácticas - Conformação 2 embalado em atmosfera modificada após pré-solubilização

O presente experimento visou manter a atmosfera e, conseqüentemente, a concentração de CO₂ dissolvido constante, ou com menor impacto possível, durante o período de estocagem. Tanto o tempo para equilíbrio quanto o impacto da produção de CO₂ pelo crescimento microbiano na composição da fase gasosa são reduzidos. Foram utilizadas amostras cuja conformação apresenta menor distância difusional, menor massa, maior área para transferência de CO₂ e menor grau de enchimento da embalagem. Nesse cenário, menos de 10% do volume total da embalagem foi preenchido com alimento.

Os binômios de processo tempo e pressão foram determinados em experimentos preliminares e simulações. Após processo de pré-solubilização as amostras foram embaladas em atmosferas de 20/40, 40/60 e 60/40 (%CO₂/N₂) (White Martins). Devido ao elevado custo dos gases e possíveis impactos da dessorção durante o envase, optou-se por padronizar o processo e composição gasosa inicial para os dois queijos estudados. Assim, as concentrações alvo de CO₂ dissolvido no equilíbrio para queijo Minas frescal tradicional foram de 500, 1000 e 1500 ppm. Para queijo Minas frescal *light*, as concentrações alvo foram de 400, 800 e 1200 ppm

As análises microbiológicas foram realizadas pelos métodos citados no item anterior nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 e 28 dias após processo de pré-solubilização, para os produtos queijo Minas frescal tradicional e queijo Minas frescal *light*.

3.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE

A fim de avaliar o impacto da adição de CO₂ nos parâmetros de qualidade do produto, foram realizadas análises de pH, umidade, perda de água (sinerese), atividade de água e análise do perfil de textura (TPA).

3.4.1 Análises de pH

O pH foi determinado para cada tratamento utilizando o pHmetro com sonda para produtos sólidos (Testo 205, Alemanha). As medidas foram realizadas em triplicata.

3.4.2 Análises de textura

A avaliação instrumental da textura foi realizada com ensaio TPA utilizando um analisador de textura digital (TAXT2i, Stable Micro System, Reino Unido) equipado com célula de carga de 25 kg. As amostras de queijo de 28 mm de diâmetro por 20 mm de altura foram comprimidas 35 % de sua altura com uma sonda de alumínio de 50 mm de diâmetro, à velocidade de 1 mm s⁻¹. As amostras foram retiradas da refrigeração (7°C) e colocadas em bolsa térmica (isolante) e imediatamente analisadas. A partir dos dados de força *versus* tempo foram derivadas as grandezas dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade (adaptado de DIAMANTINO *et al.*, 2014). A dureza é a força realizada para conseguir determinada deformação (N). A elasticidade é a velocidade com que um material deformado retorna à condição não deformada após retirada da força que promove a deformação. Coesividade é a extensão que o material suporta ser comprimido sem que ocorra ruptura. A mastigabilidade é a energia utilizada para mastigar um alimento sólido, dada pelo produto da firmeza com a coesividade (CIVILLE e SZCZESNIAK, 1973; BOURNE, 2002). Os dados reportados representam a média de 10 amostras para cada ensaio.

3.4.3 *Análises de umidade*

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico. As amostras foram colocadas para secagem em estufa a 105 °C, até atingir massa constante (IAL 2005).

3.4.4 *Sinerese*

A perda de água das amostras nos diferentes tratamentos foi avaliada por método gravimétrico em triplicata. A massa de exsudado foi dividida pela massa inicial da amostra e expressa em porcentagem.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros de textura, pH e sinerese foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statistica (8.0, USA). O teste de Tukey foi utilizado para verificar diferenças significativas com nível de significância de 95%.

3.6 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

3.6.1 *Modelo primário*

Os modelos primários disponíveis no *ComBase* (DMFit *web edition*) foram ajustados aos dados do crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas ao longo do tempo em queijo Minas frescal (tradicional e *light*) armazenado a 7 °C. Os ajustes são fornecidos pelo *software* com os valores do tempo da fase lag, velocidade máxima de crescimento e população máxima atingida. O *software* possibilita a escolha dos modelos Baranyi e Roberts completo (fases lag, exponencial e estacionária), Baranyi e Roberts sem fase lag (apenas fases exponencial e estacionária), Baranyi e Roberts sem assíntota (apenas fases lag e exponencial), além dos modelos lineares: trilinear (três retas que representam as fases lag, exponencial e estacionária), bifásico (sem fase lag) e linear (apenas fase exponencial). São fornecidos o coeficiente de regressão (R^2) os erros padrões do ajuste e dos parâmetros obtidos pelo ajuste.

O modelo de Baranyi e Roberts é apresentado nas Equações (27), (28), (29) e (30).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \left[\frac{1}{m} \right] \ln \left(1 + \frac{\exp(m\mu_{max} F(t)) - 1}{\exp(m[y_{max} - y_0])} \right) \quad (27)$$

$$F(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{max}} \right] \ln(\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max} t - h_0)) \quad (28)$$

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (29)$$

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}} \quad (30)$$

onde, $y(t)$ é a variação da concentração celular em função do tempo ($\log(\text{UFC g}^{-1})$), Y_0 é concentração celular inicial ($\log(\text{UFC g}^{-1})$), μ_{max} é a velocidade máxima de crescimento ($\log(\text{UFC g}^{-1}) \text{ dia}^{-1}$), m é um parâmetro de curvatura, h_0 é uma transformação do parâmetro q_0 que auxilia na estabilidade do ajuste, q_0 é função do estado fisiológico da célula, λ é a duração da fase lag (dia).

3.7 MODELAGEM DA TRANSFERÊNCIA DE CO₂ EM SISTEMAS COM ATMOSFERA MODIFICADA CONSIDERANDO DIFUSÃO NO ALIMENTO E PERMEAÇÃO ATRAVÉS DA EMBALAGEM

Um modelo matemático para alimentos que não respiram foi desenvolvido para prever os gradientes de concentração de CO₂, as concentrações médias e as cinéticas da fase gasosa após envase em embalagens flexíveis. A principal justificativa para o desenvolvimento do modelo apresentado na presente seção é a aplicação em sistemas em que a permeabilidade através da embalagem não possa ser negligenciada, como ocorre para sistemas com embalagens de média e baixa barreira. Assim, é possível a simulação e predição da concentração de CO₂ dissolvido no alimento em sistemas com embalagens com permeabilidade não desprezível. Além disso, o modelo de crescimento microbiológico de Baranyi e Roberts (1994) foi acoplado ao modelo de transferência de massa. Um modelo secundário linear, ajustado com

dados disponíveis no *Combase* (www.combase.cc), foi inserido no programa para alimentar os dados de μ_{\max} em função da concentração de CO_2 dissolvido. Para cada concentração de CO_2 na malha computacional foi gerado um valor de μ_{\max} que permitiu avaliar o crescimento microbiano em diferentes regiões da amostra simulada.

O modelo considera difusão bidimensional em regime transiente no alimento, representado por uma peça cilíndrica de queijo, e permeação em regime semi-estacionário unidirecional através do filme da embalagem. O modelo fornece as cinéticas de variação de CO_2 dissolvido no alimento, a pressão parcial de CO_2 , volume da fase gasosa na embalagem e o perfil de crescimento microbiológico segundo o modelo de Baranyi e Roberts (1994).

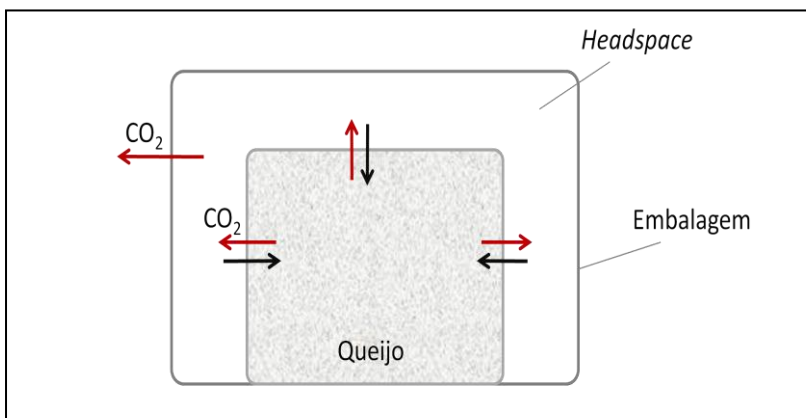
O modelagem matemática considerou que:

- A fase gasosa da embalagem possui comportamento de gás ideal, visto que sob condições normais encontradas em atmosfera modificada, o desvio do comportamento ideal pode ser negligenciado (ROTABAKK *et al.*, 2008a).
- O alimento pode absorver ou desorver CO_2 de acordo com o tratamento de pré-solubilização, com a mistura gasosa aplicada na atmosfera, com o grau de enchimento e permeabilidade da embalagem.
- A pressão total do sistema é constante e igual à pressão atmosférica (embalagens flexíveis).
- Não há resistência à transferência de massa entre o queijo e a fase gasosa da embalagem, sendo a concentração na superfície do queijo igual à concentração de equilíbrio de acordo com a Lei de Henry.
- Não há produção ou consumo de CO_2 por reações bioquímicas e microbiológicas.
- O fluxo difusivo de CO_2 na embalagem não é influenciado por possíveis fluxos contra-difusivos de outros gases;
- A concentração microbiana inicial é uniformemente distribuída na amostra.
- Embora uma face do alimento esteja em contato com a embalagem, foi considerado que essa face está em equilíbrio com a atmosfera assim como as demais faces. Assumiu-se que o erro nessa

consideração é de ordem muito inferior que a consideração de isolamento na face em contato com a embalagem.

A Figura 3-6 ilustra o queijo embalado sob atmosfera modificada. Nota-se o fluxo difusivo da fase gasosa para o alimento, do alimento para a fase gasosa e da fase gasosa para o exterior da embalagem, ou seja, o alimento pode absorver ou desorver CO_2 enquanto que o fluxo na embalagem é sempre para o exterior do sistema.

Figura 3-6 - Esquema representativo do queijo embalado em atmosfera modificada com possibilidade de pré-solubilização de CO_2 .



3.7.1 Balanço de massa na fase gasosa

A variação da massa de CO_2 na fase gasosa da embalagem pode ser dada pela variação da quantidade de CO_2 solubilizada no produto somada à quantidade de CO_2 que permeia o filme da embalagem.

$$\left\{ \begin{array}{c} \text{Variação} \\ \text{CO}_2 \\ \text{headspace} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{c} \text{Variação} \\ \text{CO}_2 \\ \text{alimento} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{c} \text{permeação} \\ \text{CO}_2 \\ \text{embalagem} \end{array} \right\} \quad (31)$$

3.7.1.1 Variação de CO₂ no alimento

O fluxo de CO₂ no alimento pode ser determinado pela variação de sua concentração média, como descrito na Equação (32)

$$N = - \frac{d\bar{C}}{dt} \times \frac{m_p}{A_p} \quad (32)$$

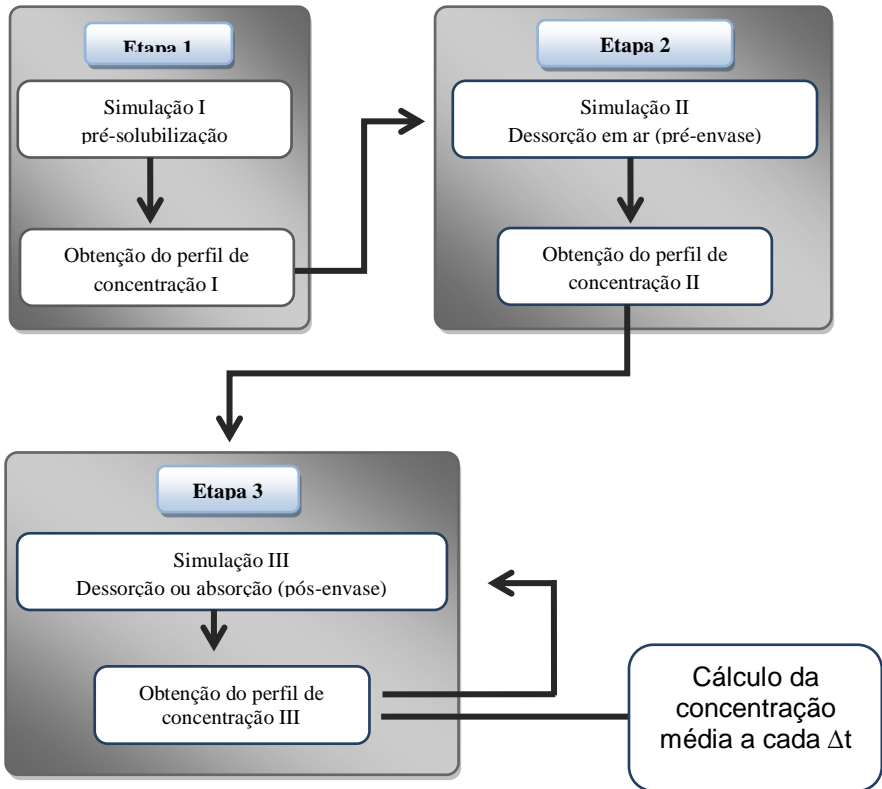
onde, N é o fluxo médio de CO₂ no produto ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$), \bar{C} é a concentração média de CO₂ no alimento (g kg^{-1}), m_p é a massa do produto (kg) e A_p é a área de troca de massa do produto com a fase gasosa da embalagem (m^2).

A concentração média em cada intervalo de tempo é obtida pelo perfil de concentração determinado pela solução do modelo difusivo bidimensional em coordenadas cilíndricas representado pela Equação (19). Entretanto, partindo do princípio que o processo de pré-solubilização deve ser o mais rápido possível e que o equilíbrio não é alcançado, o perfil de concentração inicial de CO₂ no produto não é homogêneo. Assim, as condições de simetria (Equação (20) B e C) e ausência de resistência à transferência de massa na superfície (Equação (20), D e E) são mantidas, enquanto que a condição inicial é representada por um perfil de concentração inicial que deve ser obtido por simulação do tratamento de pré-solubilização, seguido da simulação da dessorção em ar até o envase. A Figura 3-7 ilustra esse procedimento. O coeficiente de difusão efetivo utilizado nos cálculos foi aquele determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.

As principais condições utilizadas nas etapas 1, 2 e 3, ilustradas na Figura 3-7, são:

- Etapa 1: Pressão parcial de CO₂ constante e maior que zero. Concentração inicial de CO₂ homogênea e igual a zero;
- Etapa 2: Pressão parcial de CO₂ constante e próxima de zero (dessorção em ar). Concentração de CO₂ inicial representada pelo perfil de concentração I;
- Etapa 3 Pressão parcial de CO₂ variável com o tempo. Concentração de CO₂ inicial representada pelo perfil de concentração II;

Figura 3-7 - Fluxo de cálculos para obtenção da condição inicial para simulação da dessorção/absorção após envase.



O fluxo de CO_2 no alimento foi obtido com as simulações apresentadas e aplicação da Equação (32), após cálculo da concentração média para cada intervalo de tempo.

3.7.1.2 Permeação de CO_2 através da embalagem

O fluxo difusivo de um componente através de um filme, em regime estacionário, é descrito pela Equação (33).

$$N_{emb} = \frac{k (P_{CO_2}^i - P_{CO_2}^e)}{L} \quad (33)$$

onde N_{emb} é o fluxo de CO_2 através da embalagem ($g\ s^{-1}\ m^{-2}$), k é a permeabilidade da embalagem ($g\ m\ s^{-1}\ m^{-2}\ Pa^{-1}$), $P_{CO_2}^i$ e $P_{CO_2}^e$ são as pressões parciais de CO_2 (Pa) no lado interno e externo da embalagem, respectivamente, e L é a espessura da embalagem (m).

A Equação (33) foi utilizada em regime semi-estacionário, no qual a pressão parcial de CO_2 no interior da embalagem varia com o tempo promovendo a variação do fluxo.

Voltando ao balanço de massa na fase gasosa descrito pela Equação (31), obtém-se a Equação (34), que relaciona a variação de massa de CO_2 na fase gasosa com uma contribuição da variação no alimento (Equação (32)) e da permeação na embalagem (Equação (33)).

$$\frac{dm_{CO_2}}{dt} = \left(-\frac{d\bar{c}}{dt} m_p \right) - \left(\frac{k (P_{CO_2}^i - P_{CO_2}^e)}{L} A_{emb} \right) \quad (34)$$

É importante observar que a consideração da permeabilidade dos filmes da embalagem implica que o equilíbrio será alcançado com o ar atmosférico ($P_{CO_2} = 0,03\ kPa$) após longo período, em muitos casos após a vida útil do produto, ou seja, no período de interesse, as alterações na composição da fase gasosa da embalagem, na concentração de CO_2 solubilizado no produto e na taxa de permeação através da embalagem serão variáveis com o tempo, e o equilíbrio não será alcançado.

4 RESULTADOS

4.1 CONSTANTE DE HENRY E COEFICIENTE DE DIFUSÃO EFETIVO DE CO₂ EM QUEIJO FRESCAL

A constante de Henry (inverso da solubilidade) e o coeficiente de difusão efetivo determinados experimentalmente para queijo Minas frescal tradicional, queijo Minas frescal *light* e gordura láctea bovina anidra são mostrados na Tabela 4.

Devido às alterações da metodologia e refino nos cálculos, os resultados são consideravelmente diferentes daqueles obtidos em Cabral (2011), para queijo Minas frescal tradicional. As principais diferenças estão relacionadas com a diminuição do coeficiente de difusão efetivo e aumento da solubilidade.

Tabela 4 - Constante de Henry (H) e coeficiente de difusão efetivo (D_{ef}) do CO₂ em queijo Minas frescal tradicional, *light* e gordura láctea bovina anidra, determinados a 4, 7 e 10 °C.

Produto	Temperatura (°C)	H (Pa ppm ⁻¹)	D_{ef} (10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹)
Queijo Minas tradicional	4	33,9 ± 2,1 ^{aA}	3,15 ± 0,6 ^{aA}
	7	38,0 ± 3,8 ^{a,bA}	3,15 ± 0,5 ^{aA,B}
	10	50,2 ± 3,4 ^{bA}	4,50 ± 0,6 ^{aA}
Queijo Minas <i>light</i>	4	36,6 ± 0,3 ^{aA}	6,5 ± 0,8 ^{aB}
	7	50,4 ± 1,2 ^{bB}	8,7 ± 2,5 ^{aA}
	10	53,1 ± 5,7 ^{bA}	7,4 ± 0,9 ^{aB}
Gordura láctea bovina anidra	4	33,3 ± 1,0 ^{aA}	1,79 ± 0,78 ^{aA}
	7	32,6 ± 1,6 ^{aA}	1,31 ± 0,30 ^{aB}
	10	38,7 ± 5,2 ^{aB}	2,06 ± 0,32 ^{aA}

Letras minúsculas comparam os parâmetros em diferentes temperaturas para o mesmo produto. Letras maiúsculas comparam os parâmetros dos diferentes produtos em uma mesma temperatura. $p < 0,05$.

A nova metodologia proposta para a determinação da constante de Henry difere da anterior, utilizada por Cabral (2011), por não realizar vácuo no início do processo para obtenção de atmosferas ricas em CO₂. Entende-se que o vácuo antes da pressurização pode causar impregnação de CO₂ e alterar a matriz alimentícia. Assim, o procedimento de cálculo utilizado no presente trabalho corrige a pressão parcial de CO₂ com a queda de pressão total do sistema. Além disso, os cálculos foram realizados utilizando a equação de estado de Van Der Waals para realizar os cálculos na fase gasosa.

No cálculo do coeficiente de difusão efetivo do CO₂ as melhorias propostas referem-se principalmente à modelagem da difusão em duas coordenadas (bidimensional) e refino da malha nas regiões de maior concentração, uma abordagem numérica que permite maior precisão na solução das equações. Os valores do coeficiente de difusão efetivo do CO₂ em queijo Minas frescal obtidos com a metodologia descrita em Cabral (2011) foram da ordem de 10^{-8} - 10^{-9} m² s⁻¹. Embora o modelo de transferência de massa para determinação do coeficiente de difusão efetivo possa ser considerado relativamente simples, é preciso cautela na avaliação de resultados de trabalhos publicados na literatura. Sivertsvik *et al.* (2004a, b; 2005) por exemplo, determinam o coeficiente de difusão efetivo de CO₂ em diversos alimentos através da solução analítica da segunda lei de Fick. Esse procedimento é incorreto pois as soluções analíticas das equações diferenciais parciais só devem ser utilizadas caso as condições de contorno sejam constantes. O método manométrico utilizado na determinação do coeficiente de difusão efetivo baseia-se no princípio da queda de pressão do sistema para o cálculo do coeficiente. Considerando ausência de resistência à transferência de massa entre a fase gasosa e o alimento (número de Biot tende a infinito), a queda de pressão do sistema impõe que a concentração na superfície do alimento varie com o tempo. Portanto, a determinação do coeficiente de difusão efetivo de gases em alimentos pelo método manométrico deve, necessariamente, ser obtido pela solução numérica do modelo de transferência de massa.

Chaix *et al.* (2014) determinaram D_{ef} por modelos preditivos com equações empíricas determinadas em função das frações de água e gordura do alimento (carne bovina e peixe) na faixa entre 0 e 8 °C, utilizando dados de difusividade encontrados na literatura. Fabiano *et al.* (2000) determinam o D_{ef} experimentalmente pela queda da pressão parcial de CO₂ por medidas da composição gasosa da atmosfera (respirômetro tipo warbug) solucionando analiticamente a 2ª lei de Fick.

Sivertsvik *et al.* (2004a, 2004b, 2005) determinaram o coeficiente por método manométrico, também solucionando analiticamente a 2ª lei de Fick.

Simpson *et al.* (2001b) determinaram o coeficiente de difusão do CO₂ em peixe (merlusa) pelo ajuste da 2ª lei de Fick unidirecional solucionada numericamente e utilizando dados experimentais de composição gasosa da atmosfera ao redor do alimento. Fabbri *et al.* (2011) monitoram a cinética de absorção de CO₂ para determinação do D_{ef} em ovo inteiro por titulação química com NaOH, utilizando amostras destrutivas. Nesse estudo, o modelo matemático utilizado no ajuste aos dados experimentais foi solucionado numericamente.

O método de titulação para determinação da concentração de CO₂ dissolvido no produto possui desvantagem por não permitir experimentos contínuos, com grande volume de amostras, procedimentos experimentais e dispendioso em tempo e recursos.

É importante observar que o coeficiente de difusão de gases em alimentos não pode ser medido diretamente, sendo indispensável a utilização de aparatos experimentais e modelos matemáticos para sua determinação. A avaliação da difusão de gases em alimentos pode ser feita pelo acompanhamento da concentração do gás dissolvido no alimento ou pela variação de pressão parcial na atmosfera ao redor do alimento. Modelos preditivos, como equações de Wilke-Chang e Stokes-Einstein, utilizados para determinação do coeficiente de difusão estão disponíveis na literatura para água, soluções salinas e de glicose, líquidos orgânicos e soluções de etanol com várias viscosidades. A extrapolação dessas equações para alimentos sólidos é questionável pois em seu desenvolvimento não foram considerados os fenômenos que podem ocorrer na matriz alimentícia (Chaix *et al.*, 2014).

A solubilidade do CO₂ nos queijos apresentou comportamento análogo ao da água, com redução da solubilidade com incremento de temperatura. O mesmo não ocorre acentuadamente com a gordura devido ao seu perfil lipídico. Curvas de DSC (*Differential scanning calorimetry*) do queijo muçarela de leite bovino demonstram a ocorrência de um evento de mudança de fase aproximadamente a 7°C, vinculado com fusão de ácidos graxos de baixo ponto de fusão encontrados no leite (TUNICK *et al.*, 1997). Esse evento teria papel em aumentar a solubilidade do CO₂ na matriz lipídica, contrapondo o efeito do aumento de temperatura na solubilidade (GILL, 1988; JAKOBSEN e BERTELSEN, 2006).

A Tabela 5 apresenta valores encontrados na literatura para a constante de Henry e do coeficiente de difusão para alimentos que não respiram. É possível observar que nos casos citados de solução analítica da segunda lei de Fick o valor de D_{ef} é consideravelmente superior aqueles calculados por solução numérica.

Tabela 5 - Constante de Henry (H) e coeficiente de difusão efetivo (D_{ef}) do CO_2 em alimentos que não respiram.

Produto	H (Pa ppm ⁻¹)	$D_{ef} \times 10^{10}$ (m ² s ⁻¹)	T (°C)	Umidade (%)	Lipídeos (%)
Água ^a	36,3	10,5	5	100	0
Filé de frango ^b	42,8 ± 3,7	-	2	78	-
Presunto ^c	64,9 ± 6,5	39,2	4	72,3	5,7
	68,3 ± 6,2	38,1	8	72,3	5,7
Presunto ^d	108,7	5,7	22	74	3
Manteiga ^d	64,5	14,2	22	14,9	82,5
Queijo processado ^d	59,6	8,8	22	66	14
Salsicha ^c	87,5 ± 4,9	104	4	53,3	30,4
Bacalhau ^e	54,3 ± 1,4	17,2	4	82,2	0,3
Salmão ^e	57,9 ± 4,5	16,2	4	68,8	9,9
Atum ^e	46,3 ± 2,7	17,4	0	74	0,2
Wolf fish ^e	48,9 ± 4,3	15,7	0	77,6	2,5
Pacific Hake ^f	29,0	5,2	0	-	-
Molho pesto ^g	85,3	8,0	5	-	-
	67,9	-	0	49,5	10,7
Queijo semi-duro ^h	79,4	-	5	49,5	10,7
	83,2	-	10	49,5	10,7
Carne suína ⁱ	≈64	-	4	-	24
Carne ovina ⁱ	44,5	-	2	-	-
Gema do Ovo ^l	≈40	1,6	25		

a - Jähne *et al.*, 1987; b - Rotabakk *et al.* (2010); c - Sivertsvik *et al.* (2005); d - Chaix *et al.* (2015a); e - Sivertsvik *et al.* (2004b); f - Simpson *et al.* (2001b); g - Fabiano *et al.* (2001); h - Jakobsen & Risbo (2009); i - Jakobsen e Bertelsen (2004); j - Gill (1988); l - Fabbri *et al.* (2011).

4.2 PREDIÇÃO DA CONSTANTE DE HENRY EM FUNÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E LIPÍDEOS

Esse item aborda a predição da constante de Henry do CO₂ em produtos lácteos, correlacionando a solubilidade dos produtos em função da temperatura, frações de água e gordura e suas respectivas solubilidades, conforme descrito no item 3.2.1.1.

A Tabela 6 apresenta valores preditos da constante de Henry do CO₂ em queijos e peito de frango. A predição para peito de frango a 2 °C utilizou a solubilidade em gordura láctea bovina apresentado por Jakobsen *et al.*, (2009). Devido ao baixo teor lipídico do produto, o impacto da variação da solubilidade da gordura na predição da solubilidade do produto é pequeno, razão pela qual esse produto foi abordado, apresentando um dos menores desvios em relação aos valores experimentais apresentados.

Embora os desvios em relação aos valores experimentais apresentados na Tabela 6 sejam relativamente elevados, a predição pode ser considerada satisfatória, muitas vezes dentro dos desvios padrões encontrados experimentalmente. Os valores preditos servem como estimativas iniciais para avaliações e simulações de sistemas com atmosfera modificada não excluindo, contudo, a necessidade de determinações experimentais em casos cuja a solubilidade seja considerada um fator crítico.

Em aproximadamente 68% dos casos, as predições da constante de Henry foram subestimadas, refletindo em maiores solubilidades preditas. Valores preditos da constante de Henry maiores que o experimental foram encontrados apenas para os dados do presente trabalho. Em uma abordagem conservadora, é mais interessante predizer valores de solubilidade menores (constantes de Henry maiores), visto que o erro de predição implica em suposta diminuição do efeito inibidor do crescimento microbiano.

Tabela 6 - Valores experimentais (H_{exp}) e preditos (H_{predito}) da constante de Henry para produtos que não respiram em função das frações de água (x_a) e gordura (x_g). Desvio percentual em relação ao valor experimental apresentado.

Produto	Composição	T (°C)	H_{exp} (Pa/ppm)	H_{predito} (Pa/ppm)	Desvio (%)
Queijo semi- duro	$x_a = 0,536$	5	71,6	60,7	15%
	$x_g = 0,057$	10	80,5	71,5	11%
Queijo semi- duro	$x_a = 0,466$	5	79,3	62,3	21%
	$x_g = 0,107$	10	83,1	73,3	12%
Queijo semi- duro	$x_a = 0,467$	5	74,7	55,9	25%
	$x_g = 0,167$	10	81,8	65,7	20%
Queijo semi- duro	$x_a = 0,461$	5	69,7	55,9	20%
	$x_g = 0,246$	10	74,7	65,7	12%
Queijo Minas frescal tradicional	$x_a = 0,54$ $x_g = 0,22$	4	33,9	45,2	-33%
		7	38,0	48,2	-27%
		10	50,2	54,4	-8%
Queijo Minas frescal <i>light</i>	$x_a = 0,62$ $x_g = 0,14$	4	36,0	45,7	-27%
		7	50,4	45,3	10%
		10	53,1	51,8	2,4%
Queijo Minas frescal tradicional	$x_a = 0,54$ $x_g = 0,22$	4	53,4	45,25	15%
		7	48,7	48,20	1%
		10	58,6	54,43	7%
Filé de frango	$x_a = 0,78$ $x_g = 0,03$	2	42,8	40,3	6%

a - Jakobsen *et al.*, (2009); b - presente trabalho; c - Cabral (2011);
d - Rotabakk *et al.*, (2010)

4.3 PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO₂ SEGUIDO DE ENVASE EM AR: CONFORMAÇÃO 1

4.3.1 *Ensaio de pré-solubilização de CO₂ queijo Minas frescal tradicional*

A cinética de dessorção de CO₂ em peças cilíndricas de queijo em embalagens de alta barreira após processos de pré-solubilização foi obtida de modo contínuo utilizando o método da força de empuxo. As cinéticas de dessorção garantem que as leituras de volume e composição da fase gasosa realizadas 24 horas após o envase são adequadas e fornecem dados seguros para a utilização da Equação (22). Os processos de pré-solubilização foram: 260 kPa por 70 min; 260 kPa por 100 min; 260 kPa por 150 min; 260 kPa por 180 min; 360 kPa por 120 min; 360 kPa por 180 min; 360 kPa por 360 min e 360 kPa por 480 min.

Os ensaios visam determinar as condições adequadas para realização dos experimentos microbiológicos, cuja variável real é a concentração de CO₂ dissolvido no alimento. Além da determinação do binômio pressão de CO₂/tempo, foram determinados os graus de enchimento e validado o método de determinação da concentração inicial utilizando a força de empuxo e medida da composição da fase gasosa, conforme Equação (22). A Tabela 7 mostra os ensaios realizados para validação do método de determinação da concentração de CO₂ inicial e escolha do processo utilizado para o experimento microbiológico.

Tabela 7 - Ensaio de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional.

Tratamento							
Pressão CO ₂ (kPa)	Tempo (min)	DF (%)	$C_{CO_2}^{t=0}$ (ppm) ^a	$C_{CO_2}^{\infty}$ (ppm) ^b	$P_{CO_2}^{\infty}$ (kPa) ^c	$C_{CO_2}^{\infty}$ (ppm) ^d	$P_{CO_2}^{\infty}$ (kPa) ^d
260	70	56%	1309	769	28,6	741	28,2
260	70	48%	917	504	19,1	479	18,2
260	100	48%	1297	634	24,1	647	24,6
260	100	45%	1248	642	23,2	592	22,5
260	150	50%	1545	817	31,7	773	29,4
260	150	52%	1674	914	34,1	859	32,7
260	180	50%	1888	1013	37,2	915	34,8
260	180	50%	1778	920	35,0	876	33,3
360	120	53%	1631	928	35,0	855	32,5
360	120	52%	1822	964	36,6	922	35,1
360	180	55%	2257	1177	45,6	1124	42,7
360	180	45%	2656	1082	41,1	1077	40,9
360	180	59%	2269	1193	47,4	1192	45,3
360	360	60%	2936	1502	57,1	1452	55,2
360	360	57%	2770	1291	51,3	1329	50,5
360	360	70%	2149	1486	56,5	1333	50,9
360	480	44%	3296	1277	48,5	1238	47,1

a - Calculado pela Equação (22), b - Calculado pela Equação (11), c - Medido pelo analisador de gás, d - Predito pelo modelo de Cabral (2011).

A Figura 4-1 ilustra duas curvas de desorção de CO₂, expressas pelo aumento do adimensional da força resultante na célula de carga (texturômetro), como consequência do aumento do volume livre das embalagens. A Figura 4-2 mostra a fração de CO₂ na fase gasosa calculada com as Equações (23) a (26), utilizando os dados obtidos diretamente da célula de carga do texturômetro.

Figura 4-1 - Cinéticas de dessorção de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional a 7 °C, em embalagem flexível de alta barreira, após processo de pré-solubilização e envase em ar.

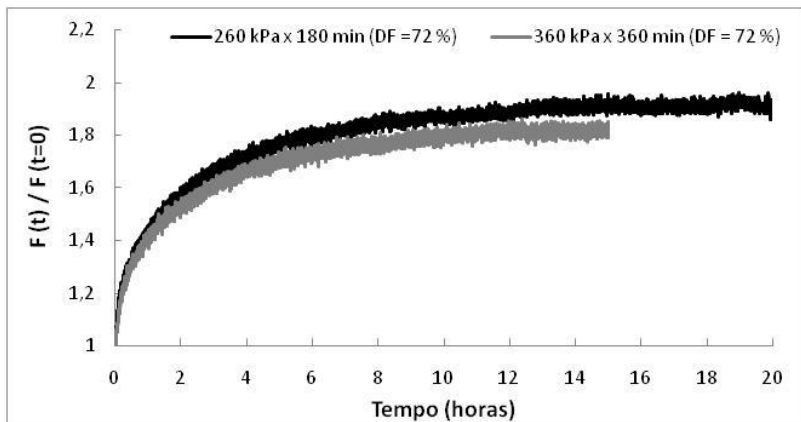
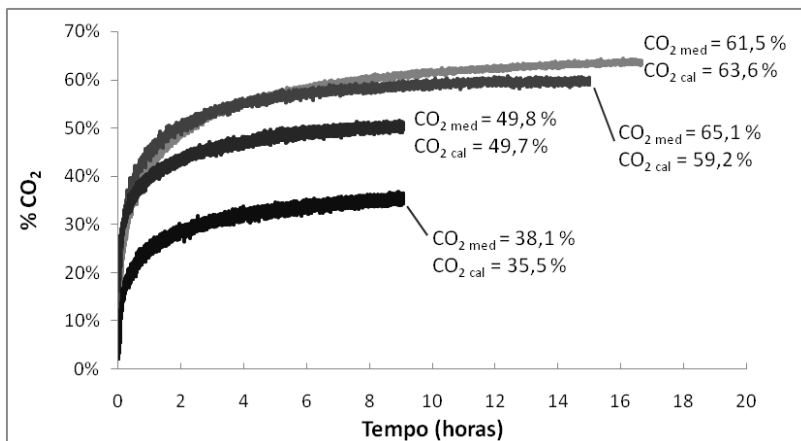


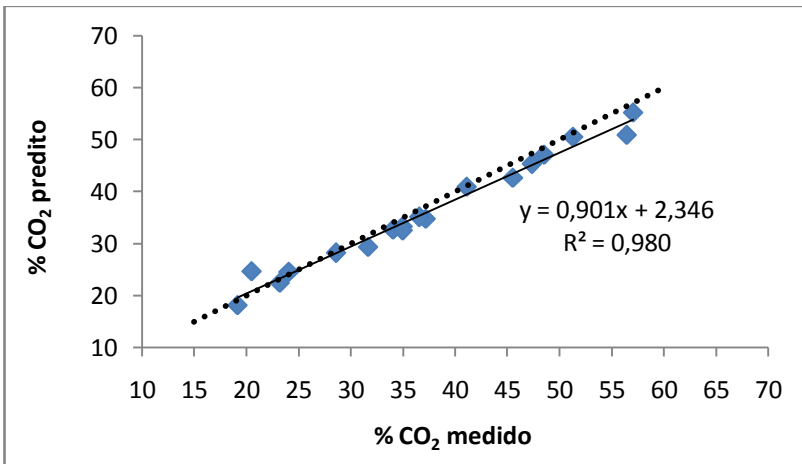
Figura 4-2 - Cinéticas da composição gasosa em embalagens de alta barreira devido a dessorção de CO₂. Fração gasosa de CO₂ medida com analisador de gás (CO_{2 med}). Fração gasosa de CO₂ calculada a partir dos dados do aumento da força de empuxo (CO_{2 cal}).



Os valores da fração volumétrica percentual de CO₂ no equilíbrio, preditos pelo modelo de Cabral (2011), foram plotados com

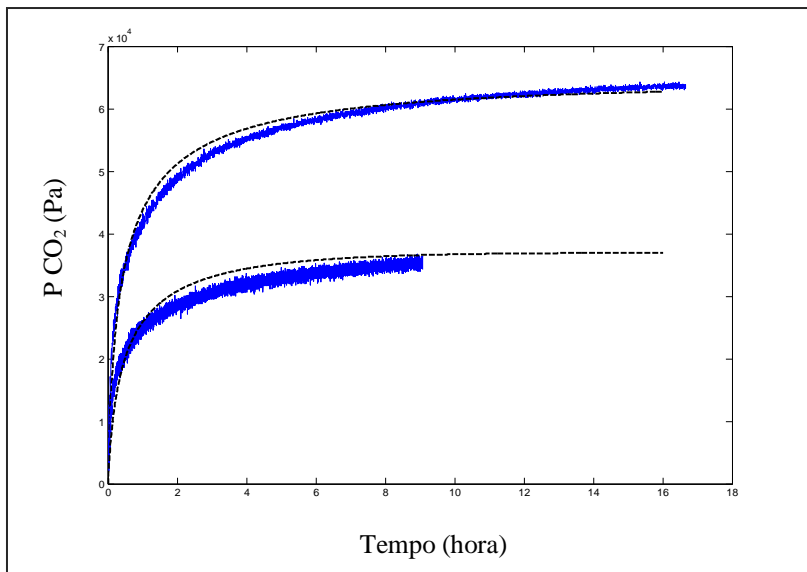
os valores medidos experimentalmente (dados da Tabela 7), conforme ilustra a Figura 4-3. Há pequena tendência em subestimar a fração de CO_2 na fase gasosa, embora as previsões possam ser consideradas boas, com desvio médio percentual de 4,4 %.

Figura 4-3 Fração volumétrica percentual de CO_2 no equilíbrio estimada pelo modelo de Cabral (2011) vs. medida experimentalmente. Linha tracejada: inclinação = 1 (predição exata). Linha contínua: ajuste linear dos dados.



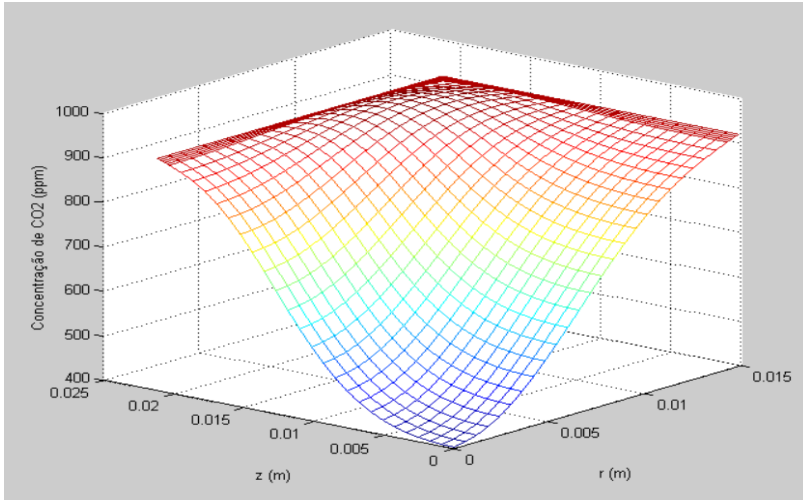
A Figura 4-4 ilustra cinéticas da fração de CO_2 na fase gasosa da embalagem após simulações dos processos de pré-solubilização, dessorção em ar antes do envase e dessorção após envase, utilizando o modelo matemático descrito no item 3.7, plotadas simultaneamente com os dados experimentais de aumento da força de empuxo correlacionados à variação da pressão parcial de CO_2 no interior da embalagem. Observa-se excelente concordância com os dados experimentais após simulação de todas as etapas envolvidas entre a pré-solubilização e pseudo-equilíbrio após envase. Os parâmetros utilizados na simulação são o coeficiente de difusão efetivo e a constante de Henry do CO_2 no produto obtidos em experimentos independentes.

Figura 4-4 - Pressão parcial de CO_2 em embalagem de alta barreira após processo de pré-solubilização de CO_2 e envase em ar. Linha tracejada: simulação. Linha azul - dados experimentais obtidos com o método da força de empuxo.



A Figura 4-5 mostra o perfil de concentração de CO_2 no interior de uma peça cilíndrica de queijo. Observa-se que, apesar da concentração média de CO_2 dissolvido no produto e da pressão parcial do gás na embalagem estarem aparentemente em equilíbrio, de acordo com o apresentado na Figura 4-4, ainda é observado um gradiente de concentração no interior do produto 16 horas após o envase.

Figura 4-5 - Perfil de concentração de CO_2 em queijo Minas frescal tradicional após pré-solubilização (260 kPa por 180 minutos), dessorção em ar antes do envase (5 minutos) e envase em ar (DF=50% e embalagem de alta barreira). Perfil 16 horas após o envase.



Os resultados das simulações aliados aos dados experimentais do aumento do volume das embalagens e da composição gasosa de equilíbrio, ou pseudo-equilíbrio, suportam os valores do coeficiente de difusão determinados, assim como o método numérico utilizado.

Até o momento, o método da força de empuxo não havia sido utilizado continuamente para avaliação das cinéticas de composição gasosa de embalagens. Embora não tenha sido objeto do presente trabalho, esse método pode ser utilizado de modo inédito para determinação do coeficiente de difusão efetivo. A determinação da solubilidade utilizando o método da força de empuxo de modo não contínuo foi descrito por Rotabakk *et al.* (2007).

Comparando o método da força de empuxo com o método manométrico, para determinação do D_{ef} , percebe-se que no primeiro o fenômeno é a redução de volume a pressão constante, enquanto que no segundo o fenômeno é a redução de pressão a volume constante (SIMPSON *et al.*, 2009). A mesma abordagem numérica pode ser utilizada para o método do empuxo. Para utilização do método da força de empuxo na determinação do coeficiente de difusão é mais prudente

utilizar o fenômeno de absorção de CO₂ e consequente redução do volume e da força de empuxo, devido à distribuição homogênea inicial tendendo a zero.

4.3.2 *Análise do perfil de textura (TPA)*

A Tabela 8 apresenta os parâmetros dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade da análise do perfil de textura (TPA) para os tratamentos com pré-solubilização de CO₂ embalados em ar e o tratamento a vácuo (Conformação 1).

A dureza de queijos frescos tende a diminuir durante o período de estocagem principalmente pela ação residual da enzima coagulante que continua agindo durante os períodos iniciais de armazenamento hidrolisando α -caseína (FOX & McSWEENEY, 2004) e pela ação de enzimas proteolíticas que degradam a matriz proteica, liberando peptídeos e aminoácidos livres (BURITI, 2005).

Os queijos tratados com CO₂ não apresentaram esse padrão na redução da dureza durante o armazenamento. Por outro lado, o tratamento a vácuo apresentou redução significativa da dureza entre o 1° e 21° dia de armazenamento. Queiroga *et al.* (2013) não encontraram reduções significativas da dureza em queijo coalho elaborado com leite bovino durante o armazenamento até 28 dias. Buriti *et al.* (2005) reportam o aumento de dureza em 14 dias de estocagem em queijo Minas frescal obtidos por diferentes tratamentos (culturas lácticas distintas). Tratamentos com cultura mesofílica tipo O apresentaram redução da dureza no 21° dia de estocagem, aumentando a fragilidade dos queijos, enquanto que tratamentos com adição de ácido láctico apresentaram aumento da dureza no 21° dia de estocagem. Segundo os autores, queijos produzidos com adição direta de ácido láctico, com queda do pH mais rápida durante a etapa de acidificação e queda do pH mais lenta durante o armazenamento, tendem sofrer menores alterações dos parâmetros de textura.

A menor atividade microbiana encontrada nos tratamentos com CO₂ conduz à ideia de impactos minimizados na textura com a redução da atividade microbiana, refletido, conforme descreveram Buriti *et al.*, (2005), em menores índices de proteólise. Contudo, a sinerese das amostras pode contrabalancear o efeito esperado da redução da dureza,

sendo que produtos com menor teor de umidade apresentam maior dureza.

O aumento da acidez durante o período de estocagem pode causar mudanças dos agregados proteicos e, conseqüentemente, alterar a textura do produto (BHASKARACHARYA e SHAH, 2001). Buriti *et al.*, (2007) observaram que queijos Minas frescal produzidos com cultura láctea homofermentativa apresentam redução da dureza após 7 dias de estocagem. No mesmo estudo foi observado que queijos elaborados com adição de ácido láctico e cultura probiótica apresentaram redução da dureza. Paula (2010) relata aumento da firmeza de queijo produzidos com leite carbonatado, assim como no tratamento controle cujo queijo foi produzido a partir de leite acidificado com ácido láctico. A maior sinerese foi acompanhada do aumento de acidez.

Queijos com valores de pH próximos do ponto isoelétrico das caseínas apresentam maiores valores de gomosidade, enquanto que queijos com pH superiores apresentam textura mais plástica (BHASKARACHARYA e SHAH, 2001). Os parâmetros coesividade e elasticidade, embora tenham apresentado algumas diferenças significativas entre os tratamentos e entre o tempo de estocagem para o mesmo tratamento, apresentam valores muito próximos, não sendo possível identificar tendência de comportamento em relação ao tempo de estocagem e entre os tratamentos aplicados.

Dentre os tratamentos investigados, a mastigabilidade do queijo embalado a vácuo apresentou diferenças mais acentuadas comparadas aos demais tratamentos. Queiroga *et al.*, (2013) não encontraram diferenças significativas nos valores de coesividade e mastigabilidade em queijo coalho.

Tabela 8 - Parâmetros da análise de perfil de Textura (TPA) em queijo Minas frescal tradicional (conformação 1).

Parâmetro	Tempo (Dia)	Tratamento		
		1520 ppm	924 ppm	451 ppm
Dureza (N)	1	28,76±3,13 ^{a,b,A}	41,45 ± 8,25 ^{c,A}	23,17 ± 3,64 ^{a,A}
	21	45,78 ± 3,74 ^{a,b,B}	34,68 ± 6,04 ^{c,A}	36,11±2,78 ^{b, c, B}
	35	37,47 ± 4,27 ^{a,C}	37,53 ± 4,70 ^{a,A}	24,34 ± 3,32 ^{b,A}
Elasticidade	1	0,91 ± 0,02 ^{a,b,A}	0,93 ± 0,01 ^{a,A}	0,87 ± 0,03 ^{b,A}
	21	0,93 ± 0,02 ^{a,b,A}	0,92 ± 0,01 ^{a,b,A}	0,94 ± 0,02 ^{b,B}
	35	0,91 ± 0,03 ^{a,A}	0,92 ± 0,01 ^{a, b,A}	0,91 ± 0,02 ^{a,B}
Coesividade	1	0,57 ± 0,01 ^{a,A}	0,59 ± 0,01 ^{b,A}	0,57 ± 0,00 ^{a,A}
	21	0,58 ± 0,01 ^{a,B}	0,58 ± 0,01 ^{a,A}	0,58 ± 0,01 ^{a,B}
	35	0,59 ± 0,00 ^{a,b,B}	0,60 ± 0,00 ^{b,B}	0,59 ± 0,01 ^{a,b,C}
Mastigabilidade (N)	1	14,86 ± 1,83 ^{a,A}	22,51 ± 4,45 ^{b,A}	11,48 ± 1,91 ^{a,A}
	21	24,87 ± 2,40 ^{a,B}	18,64 ± 3,28 ^{b,A}	19,84 ± 1,29 ^{b,B}
	35	20,10 ± 2,30 ^{a,C}	20,51 ± 2,66 ^{a,A}	13,18 ± 1,71 ^{b,A}
				Vácuo
				36,57±3,56 ^{b,c,A}
				24,94 ± 5,54 ^{d,B}
				23,16 ± 5,51 ^{b,B}
				0,93 ± 0,02 ^{a,A}
				0,91 ± 0,01 ^{a,A,B}
				0,90 ± 0,02 ^{a,B}
				0,59 ± 0,00 ^{b,A}
				0,58 ± 0,01 ^{a,B}
				0,59 ± 0,01 ^{a,A,B}
				20,22 ± 1,92 ^{b,A}
				13,26 ± 2,98 ^{c,B}
				12,21 ± 2,83 ^{b,B}

Letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos no mesmo tempo de armazenamento (p<0,05). Letras maiúsculas entre colunas comparam o mesmo tratamento em diferentes tempos de armazenamento (p<0,05).

4.3.3 *Influência da concentração de CO₂ no crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional: Conformação 1*

Os tratamentos de 260 kPa por 60 minutos, 260 kPa por 180 minutos e 360 kPa por 360 minutos foram escolhidos para a realização do experimento para avaliação do efeito da concentração de CO₂ no crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas, além do tratamento controle embalado a vácuo sem adição de CO₂. As amostras foram embaladas em ar após pré-solubilização. Tanto os processos de pré-solubilização quanto o armazenamento foram realizados a 7 °C.

A Tabela 9 mostra os tratamentos aplicados e as condições de pseudo-equilíbrio alcançadas. Como esperado, os processos com maior concentração de CO₂ pré-solubilizado apresentaram menor pH após processo devido à dissolução de CO₂ e consequente formação de maiores quantidades de ácido carbônico e suas formas dissociadas.

Tabela 9 - Tratamentos de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Experimento 0.

	Tratamento		
	260 kPa por 60 min	260 kPa por 180 min	360 kPa por 360 min
$C_{CO_2}^0$ (ppm)	850 ± 64	1706 ± 121	2864 ± 12
DF (%)	48 ± 4	49 ± 3	63 ± 2
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)	17,3 ± 2,1	35,1 ± 2,3	57,7 ± 3,3
$C_{CO_2}^\infty$ (ppm)	451 ± 56	924 ± 62	1520 ± 86
pH inicial	6,38 ± 0,02	6,38 ± 0,02	6,38 ± 0,02
pH após tratamento	6,29 ^a ± 0,04	6,23 ^{a,b} ± 0,06	6,20 ^b ± 0,06

Valores ± desvio padrão. Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$).

A Tabela 10 apresenta a evolução dos valores de pH ao longo do tempo de estocagem para os diferentes tratamentos aplicados ao queijo. Os valores de pH das amostras embaladas a vácuo, sem pré-solubilização de CO₂, apesar de maiores inicialmente, sofrem quedas mais acentuadas que nos demais tratamentos aplicados. Esse fenômeno é devido ao crescimento microbiano mais acelerado e produção de metabólitos ácidos, sendo indício de deterioração microbiana (JAY, 2005).

Tabela 10 - Evolução dos valores de pH em função do tempo de estocagem e dos tratamentos aplicados. Queijo Minas frescal tradicional (Conformação 1).

Tempo (dia)	pH			
	1520 ppm	924 ppm	451 ppm	Vácuo
1	6,20 ^{aA} ± 0,06	6,23 ^{a,bA} ± 0,06	6,29 ^{bA} ± 0,01	6,31 ^{bA} ± 0,04
7	6,09 ^{a,bB} ± 0,03	6,15 ^{aA} ± 0,05	6,05 ^{bB} ± 0,08	6,07 ^{a,bB} ± 0,06
14	5,65 ^{aC} ± 0,05	5,79 ^{bB} ± 0,06	5,58 ^{a,cC} ± 0,07	5,48 ^{cC} ± 0,08
21	5,38 ^{aD} ± 0,05	5,57 ^{bC} ± 0,10	5,17 ^{cD} ± 0,06	5,07 ^{cD} ± 0,06
28	5,43 ^{aD} ± 0,10	5,15 ^{bD} ± 0,09	5,08 ^{bD} ± 0,18	4,92 ^{bE} ± 0,07
35	5,03 ^{aE} ± 0,10	5,23 ^{bD} ± 0,08	4,87 ^{cE} ± 0,09	4,81 ^{cE} ± 0,11

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento. $p < 0,05$.

Observa-se na Tabela 11 que diferentes valores percentuais de sinerese foram encontrados para os diferentes tratamentos de pré-solubilização de CO₂. Aos 7 e 14 dias de estocagem a 7 °C após o envase houve diferença significativa entre as amostras tratadas com pré-solubilização de CO₂ e a amostra embalada a vácuo. Aos 28 dias de estocagem apenas a amostra com 924 ppm de CO₂ dissolvido diferiu significativamente dos demais tratamentos. Esse resultado está em consonância com os dados de evolução do pH das amostras dos diferentes tratamentos.

A sinerese indica a separação de fase do soro, causada, possivelmente, pela contração da matriz geleificada combinada com fenômenos de sedimentação durante o período de estocagem (HINRICHS *et al.*, 2004). O pH influi diretamente na capacidade de retenção de água na matriz alimentícia. A redução do pH e conseqüente aproximação do ponto isoeletrico das proteínas presentes no queijo diminuem a solubilidade das proteínas e levam à maior sinerese. A atividade microbiana mais intensa promoveu queda mais acentuada do pH e maior sinerese nas amostras.

Tabela 11 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo Minas frescal tradicional para os diferentes tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo.

Tempo (dia)	sinerese (%)			
	1520 ppm	924 ppm	451 ppm	Vácuo
7	Desprezível ^a	Desprezível ^a	1,36 ± 0,73 ^a	6,90 ± 2,13 ^b
14	2,89 ± 0,31 ^a	2,43 ± 0,14 ^a	3,76 ± 0,14 ^a	6,92 ± 1,88 ^b
28	8,21 ± 0,72 ^a	5,95 ± 0,77 ^b	8,34 ± 1,68 ^a	9,12 ± 0,45 ^a

^{a-b} Médias na mesma linha com letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação da composição gasosa para os tratamentos com pré-solubilização de CO₂ são apresentadas na Figura 4-6 e Figura 4-7. Observa-se o aumento da concentração de CO₂ na fase gasosa da embalagem e decréscimo da concentração de O₂, ambos em virtude do crescimento e metabolismo microbiológico, visto que o pseudo-equilíbrio na fase gasosa é alcançado em torno de 24 horas após envase. Os primeiros pontos nas curvas foram obtidos aproximadamente 24 horas após o processo de pré-solubilização e envase em ar.

Figura 4-6 - Evolução da fração de CO₂ na fase gasosa das embalagens. Envase em ar após pré-solubilização de CO₂. Conformação 1.

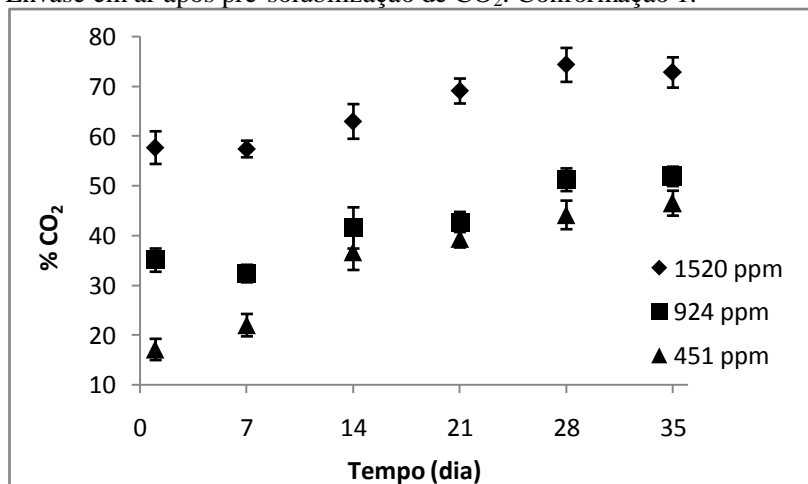
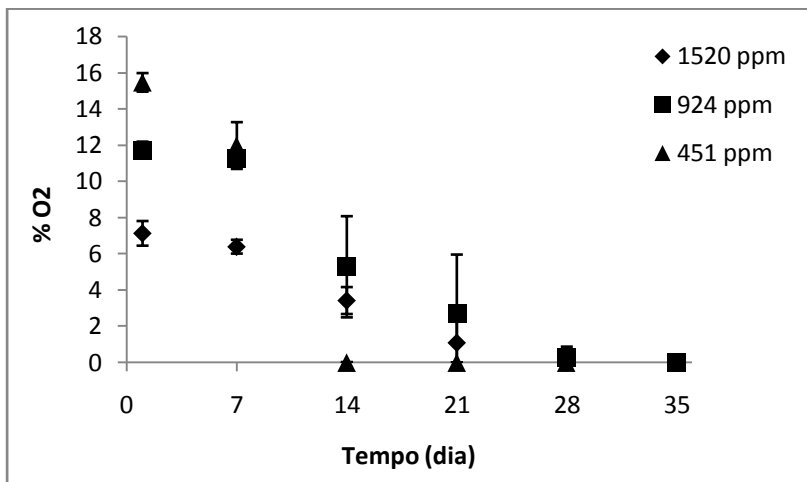


Figura 4-7 - Evolução da fração de O₂ na fase gasosa das embalagens. Envase em ar após pré-solubilização de CO₂. Conformação 1.



Guillard *et al.*, (2016) observaram rápida queda de O₂ em embalagens com atmosfera modificada, chegando em 0% em poucos dias. O fenômeno é supostamente creditado à respiração aeróbia, principalmente *P. fluorescens*. Chaix *et al.*, (2015b) indicam que a respiração de *L. monocytogenes* pode ser desprezada. Os trabalhos citados pretendem modelar os fenômenos envolvidos nas cinéticas da composição gasosa, incluindo transferência de massa no produto e filme da embalagem, respiração celular e microbiologia preditiva.

No tratamento com 451 ppm de CO₂, observa-se acentuada queda do teor de O₂ na fase gasosa e, embora as concentrações iniciais desse gás sejam superiores (15,5% de O₂), seu valor é zero em 14 dias de armazenamento. Na configuração da conformação 1, com o produto embalado em ar com grau de enchimento entre 50% e 60%, a redução do teor de O₂ é acompanhada do aumento do teor de CO₂. No tratamento com 451 ppm de CO₂, houve redução de 16% no teor de O₂, ao passo que o teor de CO₂ aumentou aproximadamente 29% no período de armazenamento.

Para o processo com 1520 ppm de CO₂, cuja a composição de pseudo-equilíbrio foi de 57,7% de CO₂ e 7,1% de O₂, houve aumento de 15,1% de CO₂ ao longo do período de estocagem. No 21º dia de armazenamento, a concentração de O₂ na fase gasosa foi de 1,1%.

Nas amostras com 924 ppm de CO₂ dissolvido, foi detectado 0,3% de O₂ no 28º dia de armazenamento, com acréscimo de 16,9% de CO₂ na atmosfera entorno do produto no final de 35 dias. A concentração de equilíbrio, 24 horas após envase, foi de 35,1% de CO₂ e 11,7% de O₂.

A estequiometria da reação de respiração é equimolar, ou seja, para cada mol de O₂ consumido é gerado um mol de CO₂, de acordo com o ciclo de Krebs. Por outro lado, em processos anaeróbios, há produção de CO₂ sem consumo de O₂ (JAY, 2005). A diferença dada entre a redução do teor de O₂ e o aumento do teor de CO₂ deve-se a reações bioquímicas e metabolismo anaeróbio, principalmente processos fermentativos de bactérias ácido lácticas.

Supondo que o oxigênio disponível na fase gasosa da embalagem seja totalmente convertido em CO₂ na respiração celular, assumi-se que a diferença entre o CO₂ total produzido (medido experimentalmente) e o CO₂ produzido por respiração microbiana (equivalente ao teor de O₂ inicial) é a quantidade de CO₂ produzida por via anaeróbia.

O incremento na fração de CO₂ na fase gasosa de 8,0%, 5,1% e 14,0% foram calculados como contribuição anaeróbia na produção de CO₂, para os experimentos com 1520, 924 e 451 ppm de CO₂ dissolvido, respectivamente. Esses valores representam $8,5 \times 10^{-5}$, $6,6 \times 10^{-5}$ e $2,4 \times 10^{-4}$ mol de CO₂ por via anaeróbia, para os experimentos com 1520, 924 e 451 ppm de CO₂ dissolvido, respectivamente.

A Tabela 12 mostra as taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ determinadas pela regressão linear dos dados de composição gasosa entre o 1º e 28º dia de armazenamento, exceto para a determinação do consumo de O₂ no experimento com 451 ppm de CO₂ dissolvido que utilizou os dados até o 14º dia de armazenamento (0% de O₂ em 14 dias).

Para os cálculos das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ foram utilizados os volumes das fases gasosas iniciais das amostras, sendo o número de mol de CO₂ calculado em função das frações volumétricas de CO₂ determinadas experimentalmente. Foi considerado que a fase gasosa possui comportamento ideal nas condições utilizadas (baixa pressão e temperatura).

Tabela 12 - Taxa de consumo de O₂ e produção de CO₂ durante experimento com conformação 1 embalado em ar após pré-solubilização de CO₂. Valores obtidos pela evolução da fração volumétrica de cada gás ao longo do período de estocagem.

Tratamento	Taxa de consumo O ₂ /produção CO ₂			
	produção CO ₂ (mol g ⁻¹ h ⁻¹)	R ²	Consumo O ₂ (mol g ⁻¹ h ⁻¹)	R ²
1520 ppm	6,8×10 ⁻⁹	0,95	2,9×10 ⁻⁹	0,97
924 ppm	1,1×10 ⁻⁸	0,86	8,4×10 ⁻⁹	0,95
451 ppm	2,0×10 ⁻⁸	0,93	2,3×10 ⁻⁸	0,93

Fabiano *et al.* (2000) observaram uma taxa de produção de CO₂ devido ao metabolismo anaeróbico de 2,0×10⁻¹⁰ e 2,4×10⁻¹⁰ mol g⁻¹ h⁻¹ para contagens iniciais (contagem total) de 2,3×10³ e 5,0×10⁵ (UFC g⁻¹), respectivamente, em molho pesto.

Guillard *et al.*, (2016) utilizaram a equação de Michaelis-Menten para modelar o consumo de O₂ e produção de CO₂ por via respiratória. Os autores não consideram o CO₂ produzido por via anaeróbia e as quantidades de CO₂ produzido são consideradas iguais às quantidades de O₂ consumido por *P. fluorescens*. Essa abordagem, provavelmente, não fornece resultados satisfatórios no caso de atmosferas pobres em O₂ e para produtos com contaminações significativas de bactérias fermentadoras cujo CO₂ é produto do metabolismo, destacadamente as BAL heterofermentativas.

O crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas, durante o período de armazenamento a 7 °C, é apresentado na Figura 4-8 e Figura 4-9, respectivamente.

Figura 4-8 - Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas fresco tradicional, armazenado a 7 °C, embalado a vácuo e em ar após processo de pré-solubilização de CO₂. Conformação 1. Experimento 0.

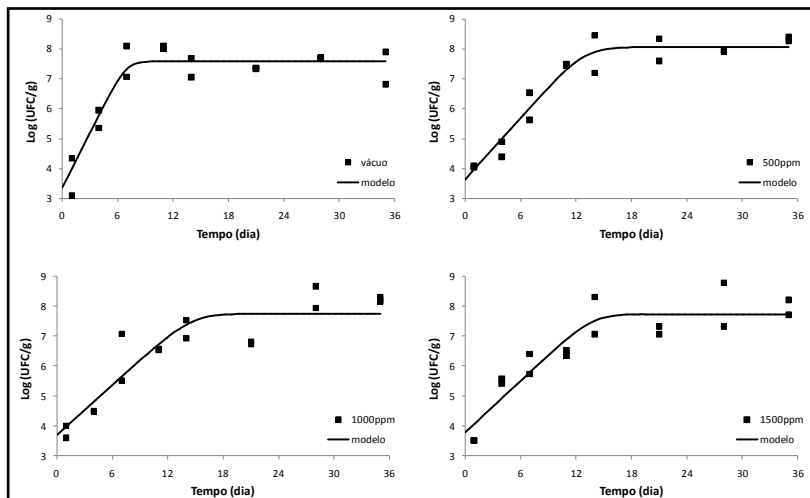
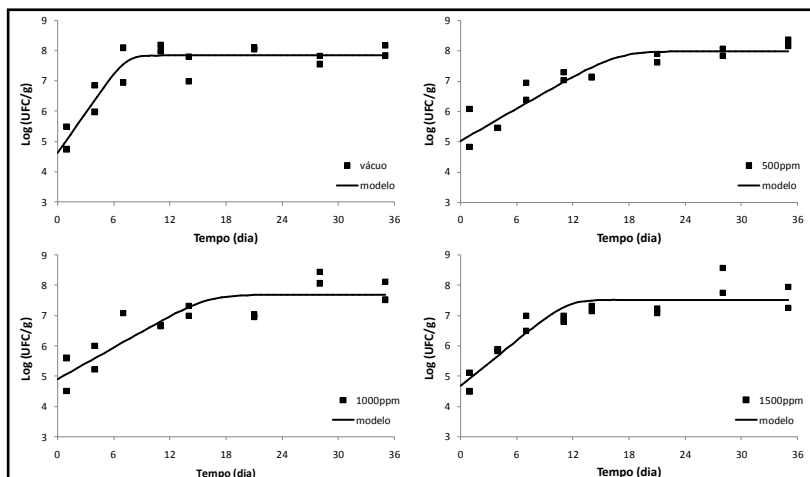


Figura 4-9 Crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresco, armazenado a 7 °C, embalado a vácuo e em ar após processo de pré-solubilização de CO₂. Conformação 1. Experimento 0.



A Tabela 13 mostra os parâmetros obtidos pelos ajustes do modelo Baranyi e Roberts (1994) aos dados de crescimento microbiano apresentados na Figura 4-8 e Figura 4-9. Para todos os casos apresentados não foi encontrada a fase lag nas curvas de crescimento. Os coeficientes de regressão dos ajustes realizados estão entre 0,85 e 0,95 para bactérias psicotróficas e entre 0,79 e 0,88 para bactérias ácido lácticas. Esses valores, embora não representem ajustes excelentes, podem ser considerados satisfatórios diante da complexidade do sistema compreendido pela microbiota deteriorante natural no alimento. A ausência de fase lag indica que o estado fisiológico das células é 1, ou seja, não houve tempo de adaptação da célula ao meio de crescimento após aplicação dos tratamentos.

As velocidades máximas de crescimento (μ_{\max}) para bactérias psicotróficas apresentaram pouca diferença entre as amostras tratadas com CO₂, contudo, houve redução de aproximadamente 50% comparado ao tratamento a vácuo. Comportamento semelhante foi observado com relação às bactérias ácido lácticas.

Tabela 13 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e após pré-solubilização de CO₂ antes do envase em ar. Conformação 1. Experimento 0.

Modelo	Tratamento			Vácuo
	1500 ppm	1000 ppm	500 ppm	
	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,34 ± 0,04	0,61 ± 0,11
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	3,78 ± 0,33	3,67 ± 0,35	3,64 ± 0,22	3,37 ± 0,34
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	7,73 ± 0,24	7,75 ± 0,26	8,07 ± 0,16	7,56 ± 0,16
R ²	0,86	0,85	0,95	0,90
Erro padrão do ajuste	0,61	0,65	0,40	0,51
Tempo para atingir 7 log (UFC/g) (dia)	11,4	12,1	9,9	6,2
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	7,7	8,3	6,9	4,3
	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,25 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,44 ± 0,08
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	4,68 ± 0,26	4,90 ± 0,29	5,03 ± 0,22	4,62 ± 0,28
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	7,52 ± 0,16	7,69 ± 0,23	7,99 ± 0,18	7,85 ± 0,14
R ²	0,85	0,79	0,88	0,88
Erro padrão do ajuste	0,45	0,55	0,42	0,43
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	9,5	12,1	11,2	5,4
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	5,3	6,3	5,5	3,1

4.4 PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO₂ SEGUIDO DE ENVASE EM ATMOSFERA MODIFICADA

Nessa conformação as amostras com tratamento de CO₂ são embaladas em condições muito próximas do equilíbrio. Apenas pequenas alterações entre a composição gasosa inicial e a composição gasosa de equilíbrio são observadas. Baixos graus de enchimento (DF%) são utilizados para reduzir o impacto do metabolismo microbiano (aeróbio ou anaeróbio) na composição gasosa ao longo do período de armazenamento refrigerado a 7°C. Foram utilizadas as misturas de 20%, 40% e 60% de CO₂, balanceados com N₂, como composição gasosa inicial para as amostras tratadas com CO₂.

São apresentados os resultados de cada repetição de experimento separadamente, pois considerou-se que, embora sejam utilizados queijos do mesmo fabricante, as amostras de lotes diferentes entre cada experimento apresentam diferenças em parâmetros como pH e contaminação inicial. Esses parâmetros podem interferir no comportamento microbiano e dificultar a compreensão dos resultados se analisados como médias de experimentos.

4.4.1 *Queijo Minas frescal tradicional*

4.4.1.1 *Experimento 1*

A Tabela 14 apresenta os tratamentos aplicados ao queijo Minas frescal tradicional utilizando a conformação 2. Embora os tratamentos sejam inferiores ao utilizado na conformação 1 com envase em ar, tanto no tempo quanto na pressão parcial de CO₂, o pH após processo foi impactado pelos tratamentos.

A Tabela 15 apresenta a evolução dos valores de pH para os diferentes tratamentos ao longo do período de estocagem a 7 °C. O armazenamento ocorreu apenas por 21 dias devido à quebra da câmara refrigerada. Os dados não foram descartados pois as curvas de crescimento microbiano foram consideradas satisfatórias, apresentando pelo menos um ponto na fase estacionária.

Os valores de pH no 1º dia de estocagem são menores para as maiores concentrações de CO₂ dissolvido, devido à formação de ácido carbônico e suas formas dissociadas. Contudo, é notório que a variação

do pH com o tempo de armazenamento é reduzida com o incremento da concentração de CO₂, fenômeno que pode ser creditado à menor atividade microbiana.

Tabela 14 - Tratamentos de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 1.

	Tratamento		
	90 kPa por 30 min	110 kPa por 60 min	160 kPa por 60 min
DF (%)	<10	<10	<10
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)	20,3±1,3	39,7±1,0	59,6±1,4
$C_{CO_2}^\infty$ (ppm)	533	1045	1568
pH inicial	6,51 ± 0,08	6,51 ± 0,08	6,51 ± 0,08
pH após tratamento	6,44 ± 0,04 ^a	6,36 ± 0,09 ^b	6,21 ± 0,03 ^b

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$)

Tabela 15 - Evolução do pH em queijo Minas frescal tradicional para os tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo ao longo do período de estocagem a 7 °C. Conformação 2, experimento 1.

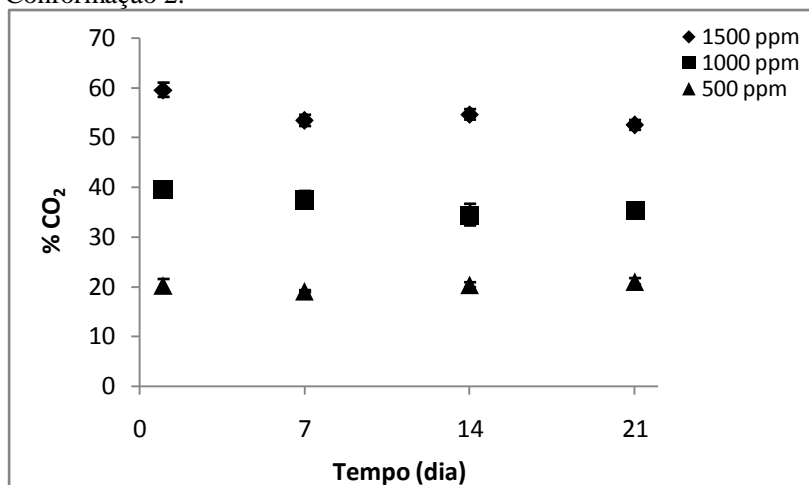
Tempo	pH			
	1568 ppm	1045 ppm	533 ppm	vácuo
1	6,21±0,03 ^{aA}	6,36±0,09 ^{bA}	6,44±0,04 ^{b,cA}	6,52±0,01 ^{cA}
8	6,10±0,03 ^{a,bA}	5,85±0,31 ^{aB}	6,22±0,03 ^{bB}	6,12±0,06 ^{a,bB}
15	6,08±0,07 ^{aA,B}	5,93±0,05 ^{aB}	5,42±0,14 ^{bC}	5,59±0,11 ^{bC}
21	5,91±0,15 ^{aB}	5,71±0,12 ^{a,bB}	5,47±0,07 ^{b,cC}	5,59±0,09 ^{cC}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$). Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento para o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

A Figura 4-10 e a Figura 4-11 apresentam a evolução das frações de CO₂ e O₂ na fase gasosa das embalagens, respectivamente. Embora possa ser notada uma pequena redução dos valores percentuais

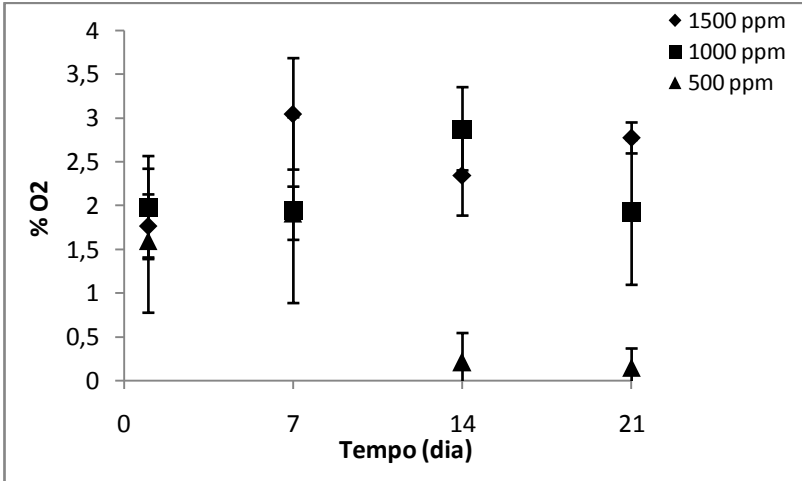
de CO_2 na fase gasosa das embalagens ao longo do período de estocagem, é possível concluir que o objetivo da utilização da conformação 2 foi alcançado, e os níveis de CO_2 ficaram estabilizados durante o período de armazenamento. Comparando com a Figura 4-6 verifica-se que a configuração experimental utilizada na conformação 1 não garante a manutenção da composição gasosa durante o armazenamento do produto. Assim, com a conformação 2 é possível estimar os parâmetros da modelagem e crescimento microbiano com condições estáticas, análogo ao crescimento microbiano sob condições isotérmicas.

Figura 4-10 - Evolução da fração de CO_2 , ao longo do período e estocagem a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2.



Na Figura 4-11 observa-se redução da fração de O_2 para o tratamento com 500 ppm, com valores abaixo de 0,5% aos 14 dias de armazenamento. O consumo de O_2 é devido à respiração microbiana sob condições restritas de O_2 . Certas bactérias apresentam crescimento acentuado em condições de microaerofilia, como por exemplo os lactobacilos (Jay, 2005). O consumo de O_2 pela respiração celular pode estimular o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios e microaerófilos.

Figura 4-11 - Evolução da fração de O_2 , ao longo do período e estocagem a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2.



Para os experimentos com conformação 2 não é possível o cálculo das quantidades de O_2 consumido e CO_2 liberado pelo metabolismo microbiano devido à pequena variação da composição gasosa. Esses cálculos foram realizados apenas para o experimento na conformação 1.

A Figura 4-12 e Figura 4-13 apresentam os dados experimentais de crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido láctico, respectivamente, assim como os modelos ajustados aos dados experimentais.

Figura 4-12 - Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas fresco tradicional, armazenado a 7 °C, embalado vácuo e em atmosfera modificada após processo de pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 1.

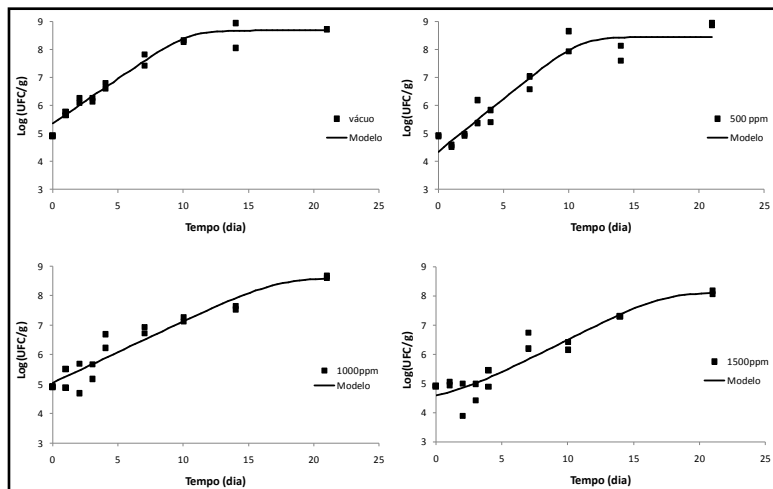
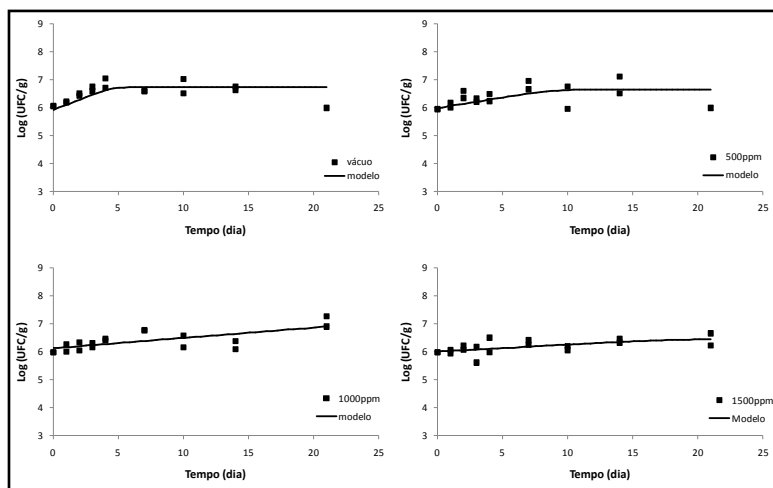


Figura 4-13 - Crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresco tradicional, armazenado a 7 °C, embalado vácuo e em atmosfera modificada após processo de pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 1.



A Tabela 16 apresenta os parâmetros obtidos do ajuste matemático do modelo Baranyi e Roberts (1994) aos dados experimentais. Nesse experimento o parâmetro μ_{\max} para bactérias psicotróficas foi de 0,23 e 0,21 ($\log(\text{UFC g}^{-1})\text{dia}^{-1}$), para os tratamentos com 1568 e 1045 ppm de CO_2 dissolvido. O tratamento com 533 ppm apresentou o maior μ_{\max} dentre os experimentos, embora seja valor próximo ao tratamento a vácuo. Se a fase lag do tratamento com 1568 ppm for desprezada o μ_{\max} assume o valor de $0,20 \pm 0,03$ ($\log(\text{UFC g}^{-1})\text{dia}^{-1}$) com R^2 de 0,87. É evidente que a presença da fase lag aumenta o valor de μ_{\max} obtido pelo ajuste. É possível considerar que as células microbianas estejam adaptadas ao meio de crescimento, visto que já foi detectado crescimento microbiano entre as etapas de fabricação do produto (LISITA, 2005).

O crescimento de BAL no presente experimento apresentou comportamento não esperado com menos de 1 $\log(\text{UFC g}^{-1})$ de crescimento para todos os tratamentos. Esse comportamento pode ser devido a falhas durante as etapas de fabricação do produto e/ou problemas relacionados à qualidade do fermento utilizado. O tratamento a vácuo apresentou crescimento de BAL mais acentuado, refletindo nos valores de pH encontrados (ver Tabela 15).

Tabela 16 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 1.

Modelo	Tratamento			Vácuo
	1500 ppm	1000 ppm	500 ppm	
Bactérias psicrotróficas				
Fase lag (dia)	1,90 ± 2,91	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,23 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,33 ± 0,03
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	4,62 ± 0,30	5,04 ± 0,17	4,35 ± 0,22	5,31 ± 0,14
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	8,13 ± 0,37	8,63 ± 0,34	8,46 ± 0,23	8,68 ± 0,14
R ²	0,87	0,89	0,92	0,95
Erro padrão do ajuste	0,46	0,41	0,45	0,28
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	12,3	9,3	7,1	5,1
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	7,8	4,6	4,4	2,1
Bactérias ácido lácticas				
Modelo	Baranyi e Roberts	linear	Baranyi e Roberts	Baranyi e Roberts
Fase lag (dia)	0	0	0	0
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,11	0,18 ± 0,03
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	6,01 ± 0,07	6,13 ± 0,12	5,99 ± 0,13	5,92 ± 0,08
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	6,45 ± 0,16	-	6,65 ± 0,13	6,7 ± 0,05
R ²	0,53	0,50	0,61	0,91
Erro padrão do ajuste	0,13	0,26	0,20	0,1

4.4.1.2 Experimento 2

A Tabela 17 apresenta os tratamentos aplicados ao queijo Minas frescal tradicional utilizando a conformação 2. Devido ao defeito ocorrido com o equipamento, não foram realizadas as análises de composição gasosa para essa repetição. A concentração de CO₂ dissolvido foi declarada em função das concentrações alvo de 1500ppm, 1000ppm e 500ppm.

Assim como no experimento 1 na conformação 2, o pH foi impactado pelos tratamentos, embora os tratamentos não apresentem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), nota-se a tendência de redução do pH nos tratamentos com dissolução de CO₂.

Tabela 17 - Tratamentos de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 2.

	Tratamento		
	90 kPa por 30 min	110 kPa por 60 min	160 kPa por 60 min
DF (%)	<10	<10	<10
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)*	-	-	-
$C_{CO_2}^\infty$ (ppm)**	500	1000	1500
pH inicial	6,55 ± 0,05	6,55 ± 0,05	6,55 ± 0,05
pH após tratamento	6,32 ± 0,07 ^a	6,31 ± 0,07 ^a	6,31 ± 0,10 ^a

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$). * Não determinado. ** Estimado em função da composição gasosa inicial utilizada.

A evolução do pH ao longo do período de estocagem é apresentada na Tabela 18. Assim como no experimento anterior, para o mesmo produto e conformação, observa-se queda mais acentuada do pH no tratamento a vácuo, o qual obteve diferença significativa em todas as medidas ao longo do armazenamento. Ao final de 28 dias de armazenamento os valores de pH foram maiores para maiores concentrações de CO₂.

Tabela 18 - Evolução do pH em queijo Minas frescal tradicional para os tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo ao longo do período de estocagem a 7 °C. Conformação 2, experimento 2.

Tempo (dia)	pH			
	1500 ppm	1000 ppm	500 ppm	vácuo
1	6,31±0,10 ^{aA}	6,31±0,07 ^{aA}	6,32±0,07 ^{aA}	6,30±0,02 ^{aA}
7	6,24±0,11 ^{a,bA}	6,22±0,10 ^{a,bA}	6,33±0,09 ^{aA}	6,10±0,04 ^{bB}
14	6,16±0,04 ^{aA}	6,04±0,05 ^{aB}	5,87±0,07 ^{bB}	5,66±0,08 ^{cC}
21	5,89±0,07 ^{aB}	5,77±0,04 ^{bC}	5,53±0,04 ^{cC}	5,49±0,04 ^{cD}
28	5,54±0,05 ^{aC}	5,41±0,06 ^{bD}	5,34±0,04 ^{bD}	5,32±0,06 ^{bE}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento para o mesmo tratamento. ($p < 0,05$).

A Figura 4-14 apresenta as curvas de crescimento de bactérias psicotróficas para os tratamentos aplicados, enquanto que a Figura 4-15 Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 2.

Figura 4-15 apresenta as curvas de crescimento para bactérias ácido lácticas. Os coeficientes de regressão para os ajustes de bactérias psicotróficas foram entre 0,92 e 0,98, valores que revelam bons ajustes. Para BAL, os ajustes foram com qualidade inferior, influenciados pela distribuição dos dados experimentais. Os valores do coeficiente de regressão oscilaram entre 0,32 e 0,86. O valor de $R^2=0,32$ denota ajuste de qualidade muito ruim. Os dados experimentais demonstraram grande inconsistência para o tratamento com 1500 ppm de CO₂ dissolvido. Contudo, ainda é possível verificar impacto da concentração de CO₂ no crescimento de BAL, principalmente na população máxima atingida. Os tratamentos 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm e vácuo atingiram 6,7, 7,4, 7,9 e 8,1 log(UFC g⁻¹), respectivamente. A baixa contagem de BAL reflete nos maiores valores de pH e suportam os dados apresentados na Tabela 18.

Figura 4-14 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 2

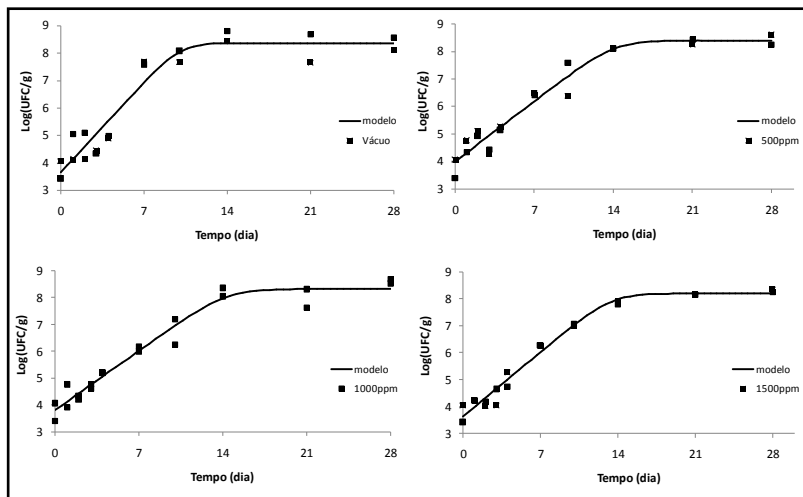
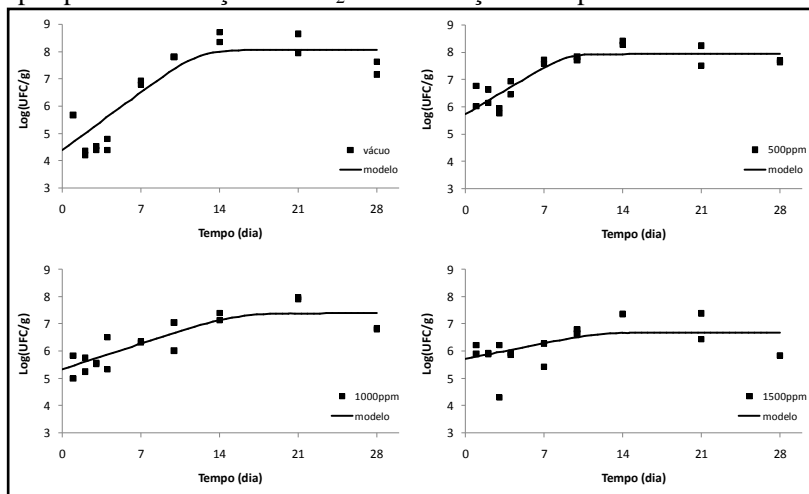


Figura 4-15 Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 2.



Para bactérias psicotróficas, os valores de μ_{\max} apresentaram pequenas diferenças entre os tratamentos com CO_2 . Um aumento de μ_{\max} na ordem de 40%-50% é observado entre os tratamentos com CO_2 e o tratamento a vácuo.

Tabela 19- Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 2.

Modelo	Tratamento			
	1500 ppm	1000 ppm	500 ppm	Vácuo
Bactérias psicrotróficas				
Modelo	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,34 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,47 ± 0,06
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	3,63 ± 0,11	3,81 ± 0,14	4,00 ± 0,15	3,65 ± 0,24
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	8,21 ± 0,12	8,32 ± 0,17	8,40 ± 0,18	8,36 ± 0,22
R ²	0,98	0,96	0,96	0,92
Erro padrão do ajuste	0,26	0,35	0,36	0,55
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	9,9	10,1	9,6	7,2
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	6,9	6,9	6,4	5
Bactérias ácido lácticas				
Modelo	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,12 ± 0,07	0,17 ± 0,08	0,37 ± 0,11	0,41 ± 0,07
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	5,34 ± 0,33	4,97 ± 0,25	5,23 ± 0,34	3,68 ± 0,34
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	6,70 ± 0,29	7,38 ± 0,26	7,92 ± 0,20	8,10 ± 0,27
R ²	0,32	0,73	0,74	0,86
Erro padrão do ajuste	0,68	0,55	0,58	0,65
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	-	12,2	4,6	8,4
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	4,9	5,4	2,2	5,4

4.4.2 Queijo Minas frescal light

Optou-se por manter o mesmo processo de pré-solubilização e, por questões econômicas, as mesmas misturas gasosas de 20%, 40% e 60% de CO₂ balanceado com N₂. Em virtude das diferenças de solubilidades entre o produto tradicional e o *light*, as concentrações de equilíbrio são consideravelmente diferentes daquelas obtidas para o produto tradicional.

4.4.2.1 Experimento 3

A Tabela 20 apresenta os tratamentos e as condições pós-processo para queijo Minas frescal *light*. Os tratamentos impactaram o pH da amostra significativamente, com redução de 0,34, 0,21 e 0,10 unidades para os tratamentos 160 kPa por 60 minutos, 110 kPa por 60 minutos e 90 kPa por 30 minutos, respectivamente.

A Tabela 21 apresenta a evolução do pH ao longo do período de estocagem. Por não apresentar adição de culturas lácticas no processamento, a queda no pH foi menos acentuada que no queijo tradicional, principalmente nos tratamentos com CO₂. O tratamento a vácuo mostrou maiores alterações do pH que pode ser correlacionado com maior desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

Tabela 20 - Tratamentos de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal *light*, parâmetros de embalagem e condições após tratamento. Conformação 2. Experimento 3.

	Tratamento		
	90 kPa por 30 min	110 kPa por 60 min	160 kPa por 60 min
DF (%)	<10	<10	<10
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)	20,4±0,4	39,9±0,0	58,7±0,3
$C_{CO_2}^\infty$ (ppm)	404	791	1165
pH inicial	6,56±0,03	6,56±0,03	6,56±0,03
pH após tratamento	6,46 ^a ± 0,04	6,35 ^b ± 0,03	6,22 ^c ± 0,03

Valores ± desvio padrão. Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$).

Nos tratamentos com 1165 ppm e 791 ppm foram observados aumentos não significativos do pH entre o 14º e 24º dia de estocagem.

Segundo Jay (2005), a proliferação de alguns fungos na superfície de queijos pode ser seguido de aumento do pH.

Tabela 21 - Evolução do pH em queijo Minas frescal *light* para os tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo. Conformação 2, experimento 3.

Tempo (dia)	pH			
	1165 ppm	791 ppm	404 ppm	Vácuo
1	6,42±0,12 ^{aA}	6,44±0,06 ^{aA}	6,51±0,05 ^{aA}	6,47±0,05 ^{aA}
7	6,43±0,08 ^{aA}	6,49±0,05 ^{aA}	6,58±0,01 ^{aB}	6,48±0,15 ^{aA}
14	6,38±0,10 ^{aA}	6,26±0,01 ^{bB}	6,42±0,02 ^{aC}	6,38±0,03 ^{aA}
21	6,46±0,07 ^{aA}	6,29±0,12 ^{bB}	6,21±0,03 ^{bD}	5,88±0,04 ^{cB}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento. $p < 0,05$.

O menor pH do tratamento com 1165 ppm de CO₂ no primeiro dia de estocagem pode justificar a maior sinerese encontrada nesse ponto, embora não haja diferenças significativas entre os tratamentos no primeiro dia de estocagem, conforme mostra a Tabela 22. Nenhum tratamento apresentou diferenças significativas de sinerese ao longo do período de estocagem.

Tabela 22 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo *light* para os diferentes tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo. Conformação 2. Experimento 3.

Tempo (dia)	Sinerese (%)			
	1165 ppm	791 ppm	404 ppm	Vácuo
1	4,8±2,3 ^{aA}	2,0±0,2 ^{aA}	0,3±0,4 ^{aA}	2,2±1,4 ^{aA}
9	1,1±1,1 ^{aA}	0,5±0,6 ^{aA}	0,0±0,0 ^{aA}	1,5±1,3 ^{aA}
16	3,9±0,6 ^{aA}	1,9±0,3 ^{aA}	2,7±1,9 ^{aA}	7,7±8,7 ^{aA}
22	4,2±1,2 ^{abA}	1,6±1,6 ^{aA}	4,3±1,1 ^{abA}	6,5±0,1 ^{baA}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento. $p < 0,05$.

A Figura 4-16 e Figura 4-17 apresentam as evoluções das frações de CO_2 e O_2 na fase gasosa das embalagens, respectivamente. Assim como no experimento 1, uma leve redução dos valores percentuais de CO_2 na fase gasosa das embalagens ao longo do período de estocagem foi observada, mostrando que os níveis de CO_2 permaneceram estáveis durante o período de armazenamento. Na Figura 4-16 não foi observado redução acentuada da fração de O_2 para os tratamentos com adição de CO_2 , indicando baixa atividade de microrganismos aeróbios responsáveis pelo consumo de O_2 e estabelecimento de atmosferas anóxicas.

Figura 4-16 - Evolução da fração de CO_2 , ao longo do período de estocagem de queijo Minas frescal *light* a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2. Experimento 3. Médias \pm desvio padrão.

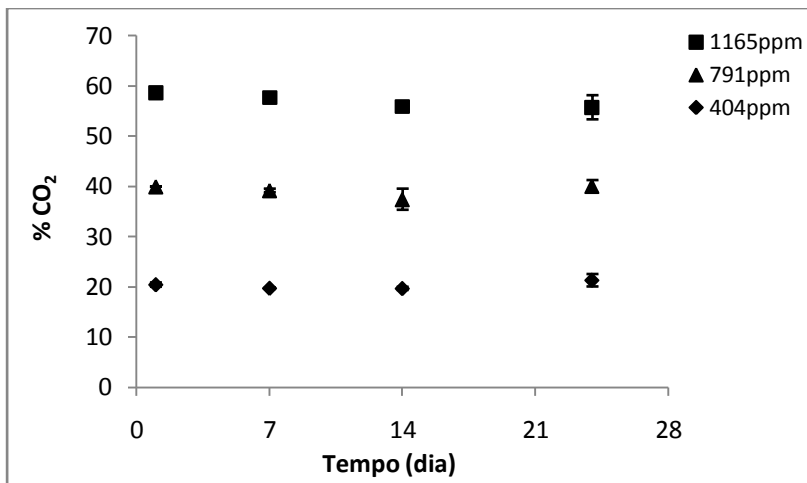
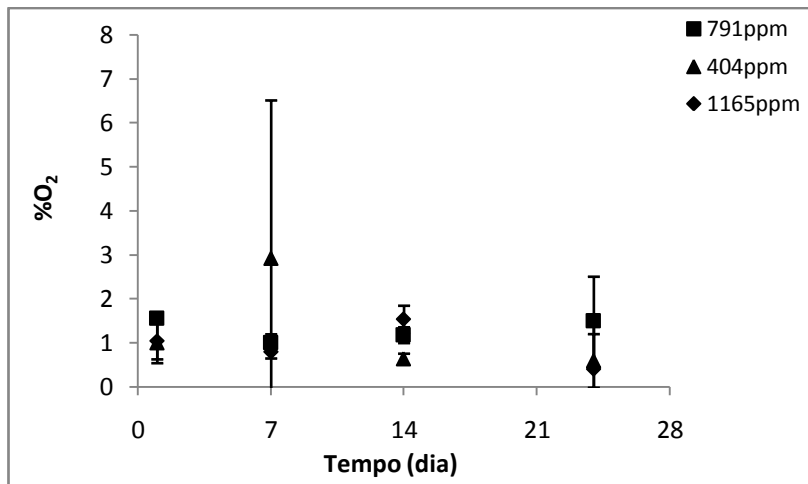


Figura 4-17 - Evolução da fração de O_2 , ao longo do período e estocagem de queijo Minas frescal *light* a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2. Experimento 3. Médias \pm desvio padrão.



As Figura 4-18 e Figura 4-19 apresentam as curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo minas frescal *light* (experimento 3). As curvas apresentaram bons ajustes, com coeficientes de regressão entre 0,89 e 0,95 para psicrotróficos e 0,88 a 0,97 para bactérias ácido lácticas.

O menor valor de μ_{max} para psicrotróficos, dentre todos os experimentos (0, 1, 2, 3 e 4) foi obtido no tratamento com 1165 ppm de CO_2 dissolvido. Para todos os tratamentos com CO_2 a redução desse parâmetro foi no mínimo de 50% em comparação com o tratamento a vácuo.

Para BAL observou-se efeito semelhante, com redução das velocidades de crescimento em relação ao tratamento a vácuo. A população máxima não apresentou diferenças acentuadas entre os tratamentos. Os parâmetros dos ajustes para o experimento 3 podem ser visualizados na Tabela 23.

Figura 4-18 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas fresco *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 3.

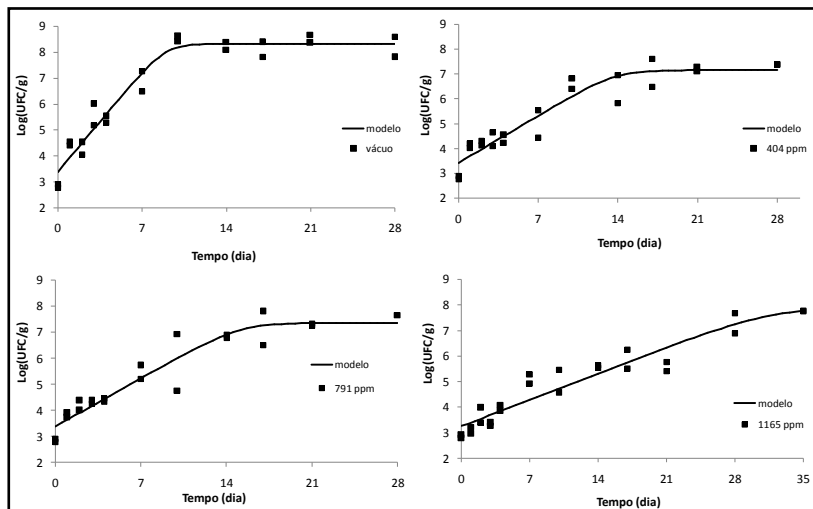


Figura 4-19 - Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresco *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 3.

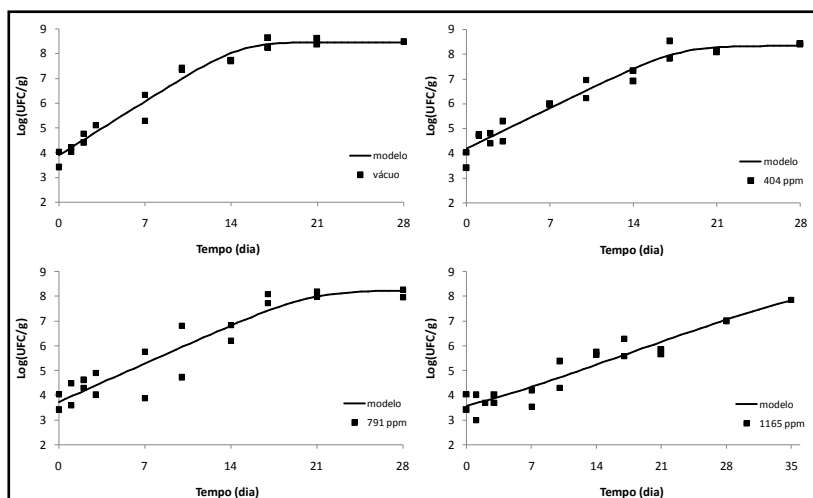


Tabela 23 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 3.

Modelo	Tratamento			
	1165 ppm	791 ppm	404 ppm	Vácuo
	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,15±0,01	0,26±0,03	0,27±0,04	0,55±0,06
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	3,26±0,16	3,38±0,20	3,43±0,20	3,38±0,21
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	7,89±0,53	7,36±0,26	7,16±0,21	8,32±0,15
R ²	0,90	0,90	0,89	0,95
Erro padrão do ajuste	0,49	0,50	0,51	0,45
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	26,0	14,5	14,3	6,6
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	18,8	10,0	9,6	4,8
	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	1,56±4,00	0,22±0,03	0,23±0,02	0,31±0,02
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	0,13±0,02	3,73 ±0,24	4,17 ±0,13	3,90±0,13
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	8,38±2,30	8,24±0,42	8,33±0,18	8,46±0,16
R ²	0,89	0,87	0,96	0,97
Erro padrão do ajuste	0,44	0,63	0,33	0,32
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	27,5	14,9	12,1	10,0
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	19,8	10,3	7,8	6,8

4.4.2.2 Experimento 4

A Tabela 24 apresenta os parâmetros de processo para queijo Minas frescal *light*. Dentre os tratamentos realizados, apenas o tratamento de 160 kPa por 60 minutos apresentou diferenças significativas de pH após processo em relação aos demais tratamentos com pré-solubilização de CO₂.

A Tabela 25 apresenta a evolução do pH para os diferentes tratamentos ao longo do período de estocagem. Os tratamentos a vácuo e com 387 ppm de CO₂ dissolvido apresentaram queda mais acentuada do pH em comparação com os tratamentos com 1097 ppm e 722 ppm. A ausência de fermento láctico implica em maiores valores de pH ao final do período de armazenamento, assim como observado no experimento 3.

Tabela 24 - Tratamentos de pré-solubilização de CO₂ em queijo Minas frescal *light*, parâmetros de embalagem e condições após tratamento Conformação 2, experimento 4.

	Tratamento		
	90 kPa por 30 min	110 kPa por 60 min	160 kPa por 60 min
DF (%)	<10	<10	<10
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)	19,5±0,9	36,4±0,8	55,3±1,2
$C_{CO_2}^\infty$ (ppm)	387	722	1097
pH inicial	6,63±0,03	6,63±0,03	6,63±0,03
pH após tratamento	6,53 ^a ± 0,02	6,43 ^a ± 0,03	6,38 ^b ± 0,05

Valores ± desvio padrão. Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 25 - Evolução do pH em queijo Minas frescal *light* para os tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo. Conformação 2, experimento 4.

Tempo	pH			
	1097 ppm	722 ppm	387 ppm	Vácuo
1	6,43±0,05 ^{aA}	6,53±0,02 ^{abA}	6,46±0,08 ^{aA}	6,61±0,01 ^{bA}
8	6,33±0,04 ^{aAB}	6,36±0,02 ^{abB}	6,49±0,02 ^{cA}	6,47±0,11 ^{bcA}
17	6,28±0,06 ^{abB}	6,43±0,04 ^{bc}	6,15±0,08 ^{cb}	6,23±0,04 ^{acB}
23	6,28±0,06 ^{abB}	6,27±0,03 ^{ad}	5,82±0,14 ^{bc}	5,96±0,14 ^{bc}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento. $p < 0,05$.

A Tabela 26 apresenta os valores de sinerese ao longo do período de estocagem. Valores iniciais elevados foram encontrados para o tratamento com 1097 ppm de CO₂ dissolvido (1º dia após envase), embora não tenham apresentado diferença significativamente entre os tratamentos. O tratamento a vácuo apresentou maior índices de sinerese, seguido do tratamento com 387 ppm de CO₂. Os valores de sinerese dos tratamento com 1097 ppm e 722 ppm não diferiram significativamente ao longo do período de estocagem.

Tabela 26 - Evolução da sinerese nas amostras de queijo Minas frescal *light* para os diferentes tratamentos com CO₂ e embalado a vácuo. Conformação 2. experimento 4.

Tempo (dia)	Sinerese (%)			
	1097 ppm	722 ppm	387 ppm	Vácuo
1	6,8±1,0 ^{aA}	3,4±4,2 ^{aA}	3,5±0,6 ^{aA}	3,3±0,1 ^{aA}
17	4,7±0,7 ^{aA}	2,3±2,4 ^{aA}	3,1±0,1 ^{aA}	11,0±0,2 ^{bB}
23	5,4±0,2 ^{aA}	5,1±0,9 ^{aA}	9,4±1,3 ^{abB}	12,7±2,8 ^{bB}
29	5,8±1,4 ^{aA}	4,1±1,1 ^{aA}	10,5±1,2 ^{bB}	14,7±0,8 ^{bB}

Letras minúsculas entre colunas diferem quanto ao tratamento. Letras maiúsculas entre linhas diferem quanto ao período de armazenamento. $p < 0,05$.

A Figura 4-20 e Figura 4-21 apresentam as evoluções da composição gasosa da embalagem ao longo do período de estocagem. Os teores de CO_2 permaneceram pouco alterados nos tratamentos com 1097 ppm e 722 ppm. Um aumento de 18,0% para 25,6% de CO_2 foi observado no tratamento com 387 ppm, o que é correlacionado com a queda dos teores de O_2 e, principalmente, pela produção de CO_2 por via aeróbica e anaeróbica, sendo detectada condições anóxicas em 17 dias. No 29º dia de armazenamento os teores de O_2 na fase gasosa eram de 0% para os tratamentos com 722 ppm e 387 ppm, e 0,5% para o tratamento com 1097 ppm, indicando menor atividade aeróbica neste último tratamento.

Figura 4-20 - Evolução da fração de CO_2 , ao longo do período e estocagem de queijo Minas *light* a 7 °C, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2. Experimento 4. Médias \pm desvio padrão.

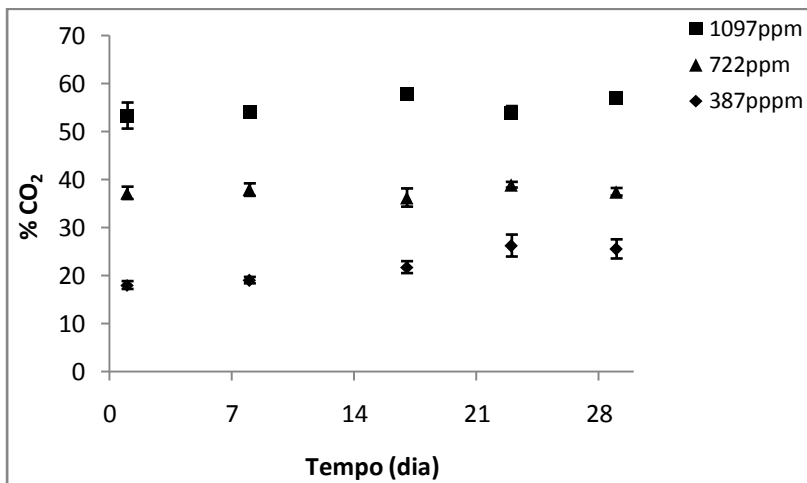
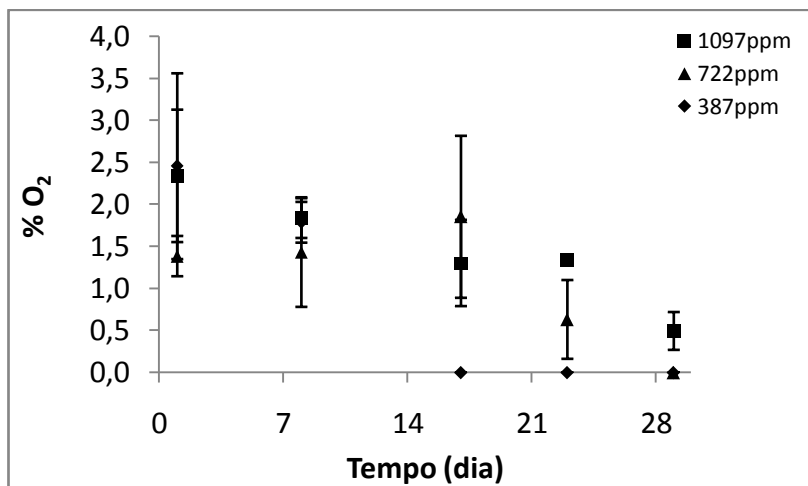


Figura 4-21 - Evolução da fração de O_2 , ao longo do período e estocagem de queijo Minas *light* a $7^\circ C$, para os tratamentos com adição de CO_2 . Conformação 2. Experimento 4.



A Figura 4-22 e Figura 4-23 apresentam as curvas de crescimento para bactérias psicotróficas e ácido lácticas para queijo Minas frescal *light* (experimento 4). O maior valor de μ_{max} para PSI dentre todos os experimentos realizados foi encontrado para o tratamento a vácuo ($0,87 \log(UFC \ g^{-1})\text{dia}^{-1}$). Para BAL, os tratamentos com 1097 ppm e 722 ppm apresentaram fase lag de 12,13 e 3,26 dias, respectivamente, não apresentando a fase estacionária (sem assíntota).

Figura 4-22 - Curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo Minas fresco *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 4.

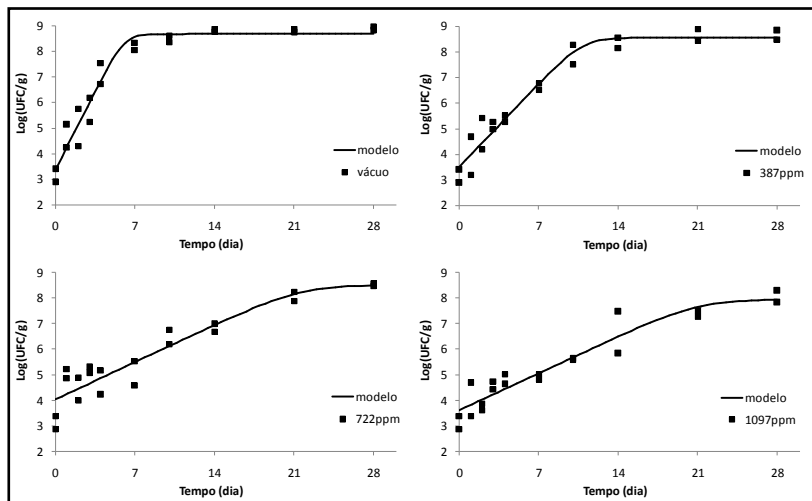


Figura 4-23 - Curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas em queijo Minas fresco *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 4.

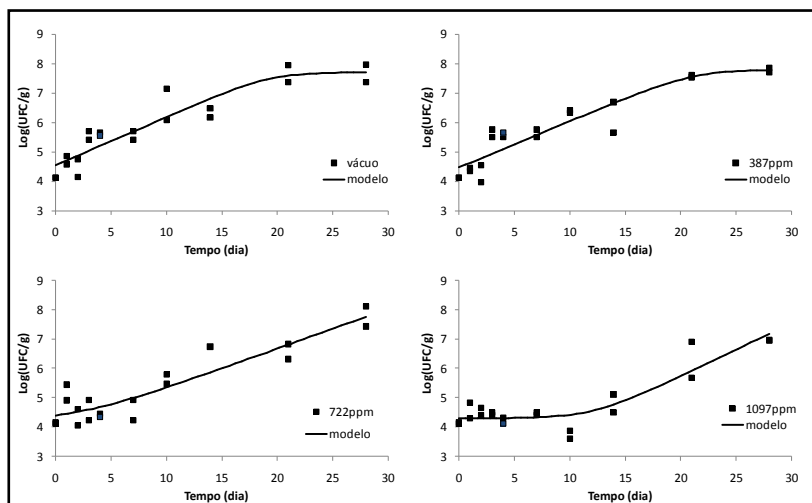


Tabela 27 - Parâmetros dos ajustes para crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal *light* embalado a vácuo e em atmosfera modificada após pré-solubilização de CO₂. Conformação 2. Experimento 4.

Modelo	Tratamento			
	1097 ppm	722 ppm	387 ppm	Vácuo
Bactérias psicrotróficas				
Modelo	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	0,21±0,02	0,21±0,03	0,46±0,04	0,87±0,11
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	3,61±0,18	4,04±0,22	3,51±0,19	3,83±0,26
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	7,94±0,35	8,51±0,43	8,56±0,19	8,68±0,16
R ²	0,91	0,87	0,95	0,95
Erro padrão do ajuste	0,49	0,59	0,45	0,48
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	16,6	14,3	7,5	4,2
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	11,6	9,4	5,4	3,0
Bactérias ácido lácticas				
Modelo	Baranyi e Roberts			
Fase lag (dia)	Sem lag	Sem lag	Sem lag	Sem lag
μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)	12,13±2,38	3,26±3,89	0,16±0,02	0,16±0,03
Valor inicial (log(UFC g ⁻¹))	0,18±0,03	0,14±0,02	4,48±0,17	4,54±0,18
Valor final (log(UFC g ⁻¹))	4,31±0,12	4,40±0,23	7,81±0,34	7,72±0,29
R ²	Sem assíntota	Sem assíntota	0,86	0,85
Erro padrão do ajuste	0,83	0,84	0,47	0,47
Tempo para atingir 7 log(UFC/g) (dia)	0,41	0,49	16,2	15,2
Tempo para atingir 6 log(UFC/g) (dia)	27,0	14,7	9,7	8,8

4.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

O queijo Minas frescal tradicional apresentou contagens iniciais de bactérias psicrotróficas de $3,77 \pm 0,41$, $4,86 \pm 0,20$ e $3,73 \pm 0,45$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ para os experimentos 0, 1 e 2, respectivamente. Para bactérias ácido lácticas as concentrações microbianas iniciais foram de $5,10 \pm 0,57$, $5,97 \pm 0,09$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ para os experimentos 0 e 1. No experimento 2 a contagem inicial foi prejudicada por fatores desconhecidos, não houve crescimento nas placas para diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . No primeiro dia após o processamento a contagem média de bactérias ácido lácticas (quatro tratamentos) foi de $5,92 \pm 0,54$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$.

Para o queijo Minas frescal *light* as concentrações iniciais de psicrotróficos foram de $2,84 \pm 0,09$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ e $3,13 \pm 0,36$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ para os experimentos 3 e 4. As contagens iniciais de bactérias ácido lácticas foram de $3,83 \pm 0,45$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ e $4,13 \pm 0,01$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$, para os experimentos 3 e 4. Tanto as contagens iniciais de PSI quanto de BAL foram menores do produto *light*, sendo a ausência de fermento lácteo a justificativa para menores contagens de BAL.

As variações da concentração microbiana inicial encontradas para queijos frescos descritas na literatura suportam os resultados encontrados no presente trabalho. As variações são resultados das práticas industriais e qualidade da matéria-prima. As características do produto e processamento como pH, a_w , [NaCl], temperaturas durante processamento e elevada manipulação, sugerem que as contaminações iniciais são normalmente elevadas.

Lisita (2005) avaliou o crescimento de mesófilos e psicrotróficos durante as etapas de fabricação de queijo Minas frescal em indústria fiscalizada pelo S.I.F.. Os resultados são preocupantes em relação à capacidade de crescimento dos microrganismos durante as etapas de produção. Durante a coagulação observou-se aumento de $1,7$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ na contagem de mesófilos aeróbios. Valores $0,37$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$ foram encontrados para o aumento de psicrotróficos durante a salga refrigerada. O mesmo trabalho revela grandes variações nas contagens de psicrotróficos após o processo de salga ($5-9$ $\log(\text{UFC g}^{-1})$).

Sangaletti (2007) mostrou diferentes níveis da população total de bactérias lácticas em queijo Minas frescal comercial após 30 dias de armazenamento a 4°C , valores que variam entre $7,65$ e

11,14 log(UFC g⁻¹), mostrando grande dispersão dos valores entre diferentes amostras. A Tabela 28 apresenta concentrações microbianas para queijo minas frescal e produtos correlatos.

Tabela 28 - Valores de contagens microbiana iniciais e finais para queijos frescos encontrados na literatura.

Produto	Análise	N ₀ log(CFU/g)	N _t log(CFU/g)	Armazenamento
Queijo frescal ^a	Minas Contagem mesófilos totais	3,1-5,1	7,1 - 8,7	5°C 40 dias
Queijo frescal ^b (Industrializado)	Minas Psicrotróficos	2,5-4,2	11,1-12,4	4°C 30 dias
	Mesófilos	2,7-4,9	11,4-11,62	4°C 30 dias
	BAL	2,5-4,9	7,6-11,1	4°C 30 dias
Muçarela fresca ^c	Pseudomonas	-	>7	10°C 5 dias
Muçarela fresca ^d	Pseudomonas	3	>7	8 °C 7 dias
Fiordilatte ^e	Pseudomonas	>3	>7	4°C 9 dias
Fiordilatte ^e	Mesófilos	6	7,7	4°C 9 dias
Muçarela fresca ^f	Psicrotróficos não ácido lácticos	2,2-4	6-6,5	4°C 7 dias
Queijo frescal ^g	Minas Psicrotróficos	6,5	-	após salga 9°C
Queijo frescal ^h	Minas BAL	6,3-8,4	7,2-8,9	5°C 21 dias
Queijo búfala ⁱ	fresco Psicrotróficos	2,76	6,78	4°C 20 dias
Queijo espanhol ^j	azul Psicrotróficos	2,3-5,6	7,2	10°C 60 dias

a - Paula (2010); b - Sangaletti (2007); c - Ricciardi *et al.*,(2015); d - Lucera *et al.*,(2014); e - Conte *et al.*, (2013); f - Baruzzi *et al.* (2012); g - Lisita (2005); h - Buriti *et al.*, (2005); i -Mushtaq *et al.*, (2015); j - Diezhandino *et al.*, (2015)

Analisando os perfis de crescimento apresentados no presente trabalho, observa-se que a fase lag de crescimento foi encontrada em poucas curvas. Para bactérias psicotróficas, o ajuste do tratamento com 1500ppm, experimento 1, apresentou fase lag pouco expressiva, e o ajuste sem a fase lag é possível com impacto reduzido na qualidade do ajuste.

Para BAL também não houve frequência elevada de fases lag nos ajustes para queijos produzidos com adição de cultura láctica. Nesses produtos não é esperado fase lag, visto que a ativação desses microrganismos é rápida. Nos queijos *light* produzidos sem adição de cultura láctica foram observadas fases lag mais expressivas no experimento 4 com valores de $12,13 \pm 2,38$ e $3,26 \pm 3,89$ dias para amostras contendo 1097 ppm e 722 ppm, respectivamente. Ambos os ajustes não apresentaram assíntota.

Variações da concentração microbiana final de BAL entre 6,45 e 8,46 $\log(\text{UFC g}^{-1})$ foram encontradas nos ajustes para os cinco experimentos realizados. Em três dos cinco experimentos as menores concentrações finais foram obtidas no tratamento com maior concentração de CO_2 . Para o queijo *light*, as menores concentrações finais de BAL foram nos tratamentos intermediários (791 e 722 ppm).

O queijo Minas tradicional utilizado no presente estudo foi elaborado com adição de ácido láctico e cultura láctica para acidificação do leite antes da coagulação. Normalmente, os fabricantes preferem a acidificação direta com ácido láctico (SANGELETTI, 2007). A cultura láctica utilizada no queijo Minas frescal tradicional foi termofílica, composta predominantemente por *L. thermophilus*.

Atmosferas enriquecidas com CO_2 podem apresentar um efeito estimulante no crescimento de algumas bactérias ácido lácticas (WANG *et al.*, 1998, 2000; NICOLOFF *et al.*, 2000, 2005; ARSÈNE-PLOETZE *et al.*, 2006). Elevadas concentrações de CO_2 podem resultar em diversos efeitos na fisiologia celular, como alteração das propriedades da membrana celular, alteração do pH intracelular e alterações em reações de carboxilação. Em algumas bactérias ácido lácticas o CO_2 é utilizado como substrato em reações anapleróticas (reações auxiliares de manutenção do equilíbrio metabólico) e biossíntese de aminoácidos e pirimidinas.

Dois reações anapleróticas controladas por atividade enzimática e capazes de fixar CO_2 em moléculas orgânicas merecem destaque:

biossíntese de aminoácidos e pirimidina governada pelas enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase e carbamoil fosfato sintetase, que catalisam a fixação de CO₂ em fosfoenolpiruvato e glutamina, respectivamente. Arioli *et al.* (2007) demonstraram que a fixação de CO₂ pela atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase é fundamental para o biossíntese de ácido aspártico e para o crescimento de *S. thermophilus* em leite. Células mutantes, com supressão das enzimas citadas, tiveram atividades comparadas às células normais em atmosfera de 100% N₂. Aumento de atividade é observado nas células normais após estabelecimento de atmosferas com CO₂.

Contudo, os resultados apresentados no presente trabalho, mesmo para os queijos elaborados com cultura láctica, mostram tendência de redução do crescimento de BAL com processo de pré-solubilização de CO₂. No experimento 1, o crescimento total foi inferior a 1 log, não ultrapassando 10⁷ log(UFC g⁻¹).

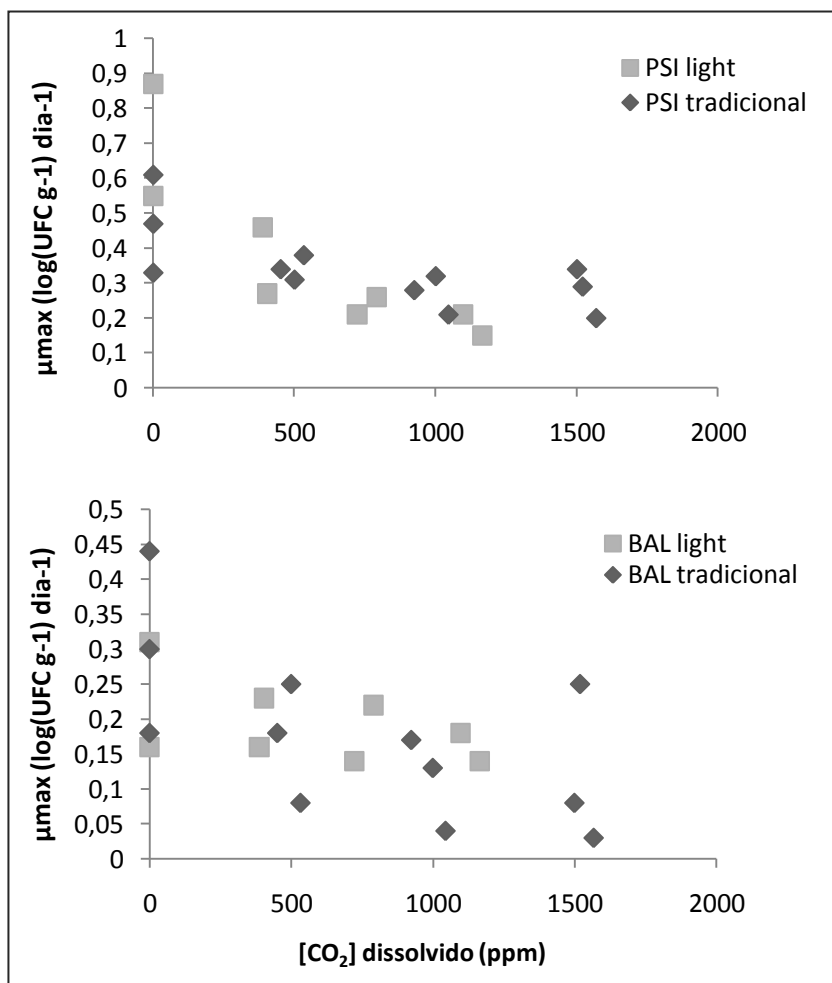
Valores de μ_{\max} (log(UFC g⁻¹)dia⁻¹) de 0,28±0,07, 0,27±0,06, 0,34±0,04 e 0,47±0,14 foram ajustados para o crescimento de psicotróficos em queijo Minas frescal tradicional para concentrações de CO₂ dissolvido de 1544±34, 984±86, 492±58 ppm e envase a vácuo, respectivamente. Para o mesmo produto e concentrações, os valores de μ_{\max} (log(UFC g⁻¹)dia⁻¹) para BAL foram de 0,13±0,11, 0,13±0,08, 0,21±0,15 e 0,34±0,14 (log(UFC g⁻¹)dia⁻¹). Os desvios padrões elevados para BAL são devido ao experimento 1, cujo crescimento de BAL foi muito pequeno. Excluindo esses dados os valores são 0,19±0,09, 0,18±0,01, 0,28±0,13 e 0,43±0,02.

Para queijo *light* valores de μ_{\max} (log(UFC g⁻¹)dia⁻¹) para psicotróficos foram de 0,18±0,04, 0,23±0,03, 0,36±0,13 e 0,71±0,23 para concentrações de 1131±48, 756±49, 395±12 ppm de CO₂ e vácuo, respectivamente. Para BAL valores de μ_{\max} (log(UFC g⁻¹)dia⁻¹) de 0,16±0,03, 0,18±0,06, 0,20±0,05 e 0,24±0,11 para concentrações de 1131±48, 756±49, 395±12 ppm de CO₂ e vácuo, respectivamente.

A Figura 4-24 apresenta os valores de μ_{\max} obtidos pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) nas concentrações de CO₂ dissolvido avaliadas. Em ambos os grupos microbiológicos considerados é possível detectar a influência do CO₂ no valor de μ_{\max} . Embora os dados tenham considerável variância, há tendência de redução do μ_{\max} com aumento da concentração de CO₂. Microrganismos psicotróficos em queijo *light* apresentaram maior sensibilidade ao CO₂. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito da gordura na matriz alimentícia. É possível que quantidades

significativas de CO_2 se deslocem para a fase lipídica no produto tradicional, diminuindo a concentração e o efeito bacteriostático na fase aquosa. Para o produto tradicional (22% de gorduras totais), aproximadamente 32% do total de CO_2 dissolvido está na fase lipídica, o que, em tese, pode reduzir o efeito bacteriostático na fase aquosa do produto.

Figura 4-24 - Velocidades máximas de crescimento em função da concentração de CO_2 dissolvido, para bactérias psicrotróficas (PSI) e ácido lácticas (BAL), em queijos Minas frescal tradicional e *light*.



Alfaro *et al.*, (2013) modelaram o efeito da temperatura e da concentração de CO₂ no crescimento de bactérias deteriorantes em peixe e meio de cultura. A 6°C os valores de μ_{\max} (h⁻¹) obtidos em meio de cultura para as bactérias *Carnobacterium maltaromaticum*, *Serratia proteamaculans*, *Shewanella baltica*, *Yersinia intermedia*, foram de 0,0836, 0,1201, 0,1205, 0,1384 para atmosferas isentas de CO₂. Para crescimento das culturas mistas a 6 °C obteve-se μ_{\max} (h⁻¹) de 0,1006, 0,0890, 0,0584, 0,0609 e 0,0304 para atmosferas de 0, 25, 50, 75 e 100% de CO₂. Para os cinco microrganismos estudados os valores obtidos para μ_{\max} a 6 °C foram superiores com atmosfera de 75% de CO₂ quando comparado com a atmosfera de 50% de CO₂. Foram feitas modelagens do crescimento dos microrganismos citados em condições flutuantes de temperatura em ar e atmosfera modificada. As concentrações de O₂ e CO₂ foram consideradas constantes ao longo do período de estocagem (g/p=10).

O *software* FSSP (modelo terciário de microbiologia preditiva) prevê redução de velocidades máximas de crescimento de BAL em função do aumento da concentração de CO₂. A predição de crescimento de BAL a 7°C, pH 6,2 e 1,5% NaCl, em meio de cultura, apresenta velocidades de crescimento de 1,53, 1,69, 1,84 e 2,00 (dia⁻¹) para atmosferas de 60%, 40%, 20% e 0% de CO₂ na fase gasosa em equilíbrio.

O ajuste dos valores de $\sqrt{\mu_{\max}}$ em função da concentração de CO₂ dissolvido são apresentados da Tabela 29.

Tabela 29 - Ajuste linear de μ_{\max} em função da concentração de CO₂ dissolvido para bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal tradicional e *light*.

Produto	Microrganismos	$\mu_{\max} = (A + B[CO_2])^2$ [log(UFC g ⁻¹)dia ⁻¹]			Intervalo de [CO ₂]
		A	B	R ²	
Tradicional	PSI	0,67	-1,20×10 ⁻⁴	0,73	0-1544 ppm
	BAL	0,55	-1,46×10 ⁻⁴	0,84	
<i>Light</i>	PSI	0,80	-3,67×10 ⁻⁴	0,88	0-1131 ppm
	BAL	0,48	-0,73×10 ⁻⁴	0,96	

Outros valores de μ_{\max} de bactérias, principalmente patogênicas, em função da fração de CO_2 na fase gasosa podem ser observadas na Tabela 30.

Powell *et al.*, (2015) avaliaram a modelagem preditiva de bactérias deteriorantes em salmão em atmosferas de 30% a 98% de CO_2 (g/p=3) e compararam os valores encontrados de μ_{\max} com os valores utilizados no *FSSP* e no *FISHMAP* (ambos modelos terciários). A 10°C , com concentração inicial de 10^3 UFC g^{-1} , o tempo predito no *FSSP* para alcançar 10^6 UFC g^{-1} foi de 1,7 dias. Com os dados de Powell *et al.*, (2015), ajustados no *Combase* (BARANYI e ROBERTS, 1994), o tempo para alcançar 10^6 UFC g^{-1} foi de 3 dias. Os autores justificam que a utilização da microbiota natural pode levar às diferenças encontradas.

Tabela 30 - Velocidades máximas de crescimento (μ_{\max}) diferentes bactérias em função da fração de CO_2 na fase gasosa. Condições: pH 6,2, 7°C e a_w 0,99.

Bactéria	μ_{\max} (log(UFC g^{-1})/dia)				Fonte
	Atmosfera de equilíbrio (% CO_2)				
	0%	20%	40%	60%	
<i>L. monocytogenes</i>	0,67	0,53	0,43	0,34	Combase
<i>E. coli</i>	0,62	0,62	0,58	0,50	Combase
<i>B. cereus</i>	0,70	0,62	0,55	0,50	Combase
<i>Salmonela spp.</i>	0,34	0,24	0,19	0,14	Combase
<i>Y. enterocolítica</i>	1,03	0,74	0,58	0,46	Combase
BAL	0,87	0,80	0,73	0,66	FSSP

A Tabela 31 apresenta dados de velocidades máximas de crescimento, obtidas pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994), utilizando dados de contagens microbiológicas disponíveis na literatura. Nota-se grande dispersão dos valores encontrados nos valores de μ_{\max} para psicotróficos, *Pseudomonas* e BAL.

Tabela 31 - Velocidades máximas de crescimento de microrganismos em queijos obtidas pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) com dados disponíveis na literatura científica.

Produto	Microrganismo	T (°C)	μ_{\max} (log(UFC g ⁻¹) dia ⁻¹)
Queijo Minas frescal ^a	Psicrotróficos	4°C	0,39±0,09
Queijo Minas frescal ^a	BAL	4°C	0,21±0,02
Muçarela fresca ^b	Pseudomonas	8°C	1,77±0,12
Queijo fresco (fiordilatte) ^c	Pseudomonas	4°C	1,18±0,09
	BAL	4°C	0,20±0,00
Queijo fresco do Himalaia ^d	Psicrotróficos	4°C	0,2
Queijo azul espanhol (em maturação) ^e	Psicrotróficos	10°C	1,63±0,14
		3°C	0,65±0,10
Queijo fresco ^f	Pseudomonas	7°C	1,17±0,10

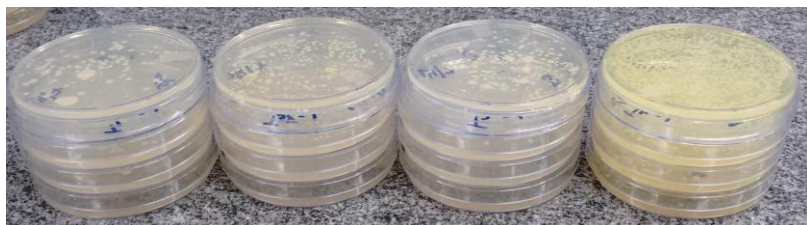
a - Sangaletti (2007); b - Lucera *et al.*, (2014); c - Conte *et al.*, (2013); d - Mushtaq *et al.* (2015); e - Diezhandino *et al.*, (2015); f - Yepes *et al.*, (1999).

Os valores finais do pH para os experimentos com queijo Minas frescal *light* foram superiores aos valores para queijo tradicional. A ausência de cultura láctica nesses queijos resultou em valores finais de pH acima de 6,20 para os tratamentos com mais de 700 ppm de CO₂ dissolvido. Apenas os tratamentos com aproximadamente 400 ppm de CO₂ e vácuo tiveram valores de pH abaixo de 6. Esses dados estão em concordância com as curvas de crescimento apresentadas. Os dados de pH e sinerese estão relacionados com as cinéticas de deterioração do produto, podendo ser utilizadas como indicativos de deterioração. O aumento da acidez está relacionado com o aumento da população dos microrganismos mesófilos, psicrotróficos e principalmente bactérias ácido lácticas (SANGALETTI, 2007)

A Figura 4-25 apresenta fotografia de placas incubadas a 7 °C por 10 dias para contagem de bactérias psicrotróficas. Observa-se distinção na coloração do meio de cultura entre o tratamento a vácuo e os tratamentos com CO₂. Sabe-se que diversas espécies do gênero *Pseudomonas* são produtoras de pigmentos de coloração fluorescente verde-amarelo chamados pyoverdinas. Esses pigmentos podem ser facilmente identificados (MEYER, 2000).

Embora as análises comprobatórias não tenham sido realizadas e o fenômeno não tenha ocorrido em todos os plaqueamentos, é possível supor que a microbiota deteriorante predominante seja diferente entre os tratamentos a vácuo e os tratamentos com CO₂.

Figura 4-25 - Placas incubadas a 7°C por 10 dias para amostras dos tratamentos com CO₂ e vácuo. Da esquerda para direita: 1500ppm, 1000ppm, 500 ppm e vácuo.



Fonte: Autor

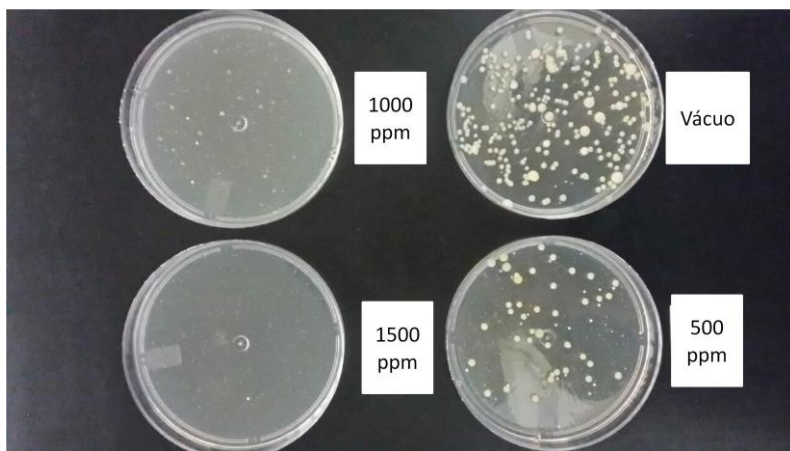
Chen e Hotchkiss (1991), em estudo com queijo cottage, mostraram que a porcentagem de bactérias gram-negativas no produto com CO₂ dissolvido é menor que a quantidade de bactérias gram-positivas. Contudo, o mesmo não ocorre no produto sem adição de CO₂, no qual a microbiota predominante é formada por bactérias gram-negativas. Em amostras contendo CO₂ a quantidade de bactérias gram-negativas diminuiu durante o tempo de armazenamento (80 dias a 4 °C). Na temperatura de 7 °C, observou-se crescimento de bactérias gram-negativas a partir do 30° dia de estocagem.

Lo *et al.*, (2016) avaliaram o efeito da carbonatação de soro de leite na atividade microbiana do produto. Os autores mostram amplo perfil microbiológico antes da deterioração, contudo apenas um ou dois gêneros dominam o produto deteriorado. A microbiota do soro de leite deteriorado é similar à do leite. Amostras pasteurizadas foram deterioradas basicamente por *Bacillus sp.* ou *Pseudomonas sp.* não

havendo diferenças da microbiota deteriorante entre as amostras carbonatadas e não carbonatadas. Os tratamentos com CO₂ apresentaram eficiência na conservação do soro de leite.

Diferenças de fisiologia das colônias também foram observadas no presente trabalho. A Figura 4-26 apresenta fotografia de placas incubadas a 7°C por 10 dias, nas mesmas diluições, no final do período de estocagem (28 dias), no qual a população máxima já foi alcançada. As colônias diferiram consideravelmente quanto ao diâmetro. Nos tratamentos com CO₂ a ocorrência de colônias pequenas foi superior quando comparado às colônias do tratamento a vácuo, as quais eram predominantemente grandes (maiores que 2 mm de diâmetro).

Figura 4-26 - Exemplo de placas na mesma diluição para diferentes tratamentos com contagens similares e tamanho de colônias diferentes.



Fonte: Autor

4.5.1 Variabilidade de parâmetros de crescimento de microrganismos

É de conhecimento científico que os parâmetros de crescimento de determinados microrganismos ou grupos de microrganismos apresentam distribuição probabilística de ocorrência. A avaliação da evolução microbiana em alimentos naturalmente contaminados pode levar em consideração essa variabilidade, normalmente com abordagem da modelagem estocástica, utilizada no intuito de englobar essas

variações de parâmetros e propor respostas probabilísticas (AUGUSTIN *et al.*, 2011).

Há incertezas, ou distribuições de ocorrência, na população microbiana inicial, tipos de microrganismos presentes e interações entre eles, variações de pH, atividade de água, oscilações de temperatura, estado fisiológico da célula, velocidade máxima de crescimento, entre outros. As diversas incertezas existentes são responsáveis por propagações de erros nas predições determinísticas (CHAIX *et al.*, 2015b).

Dentre os parâmetros citados, a velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}), o estado fisiológico da célula (α) e a duração da fase lag são considerados os mais importantes. A variabilidade desses parâmetros pode ser obtida por uma série de experimentos ("challenge tests") capazes de identificar e quantificar probabilisticamente a distribuição e frequência de ocorrência dos parâmetros. Augustin *et al.* (2011) encontraram o residual de variabilidade correspondente ao coeficiente de variação de aproximadamente 20% para μ_{\max} e 130% para o produto de $\mu_{\max} \times \text{lag}$ para *L. monocytogenes*.

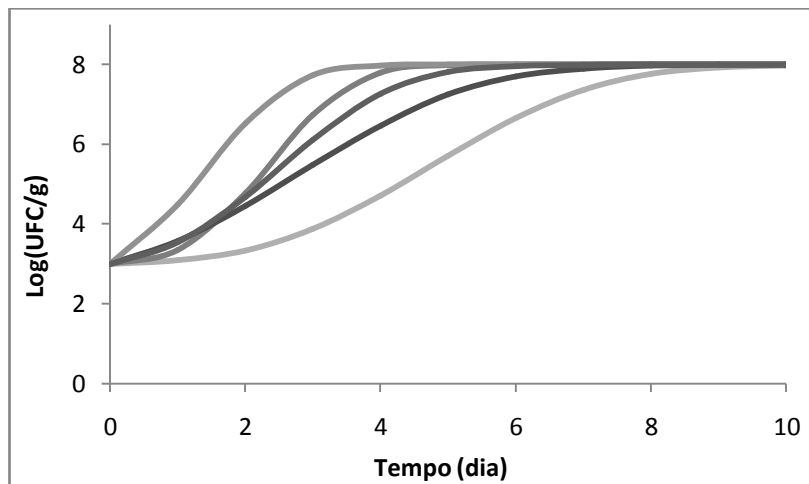
Analisando dados disponíveis para o gênero *Pseudomonas sp.* a 7°C, pH=6,2, e $a_w=0,99$, a maior frequência da velocidade máxima de crescimento é de 1,68 log(UFC g⁻¹ dia⁻¹), com desvio oscilando entre 1,17 e 2,40 log(UFC g⁻¹ dia⁻¹). Em aproximadamente 68% dos casos a velocidade máxima de crescimento de *Pseudomonas* estará dentro dos valores citados (www.combase.cc). Esses valores estão na faixa encontrada por Lucera *et al.*, (2014) e Yepes *et al.*, (1999), para o mesmo microrganismo.

O estado fisiológico da célula é um número adimensional entre 0 e 1 que expressa o quão adaptada a célula está no ambiente em que foi exposta. Se o valor é 0 o crescimento não é observado (fase lag infinita) e, por outro lado, se o valor for 1 o crescimento ocorre imediatamente (sem fase lag). A duração da fase lag depende não somente das condições ambientais mas também do histórico da célula. Células submetidas a *stress* (térmico, químico, osmótico, etc.) podem ter aumento significativo na duração da fase lag. O estado fisiológico quantifica o efeito do histórico celular na duração da fase lag (λ), conforme Equação 35 (BARANYI e ROBERTS, 1994).

$$\lambda = -\log(\alpha) / \mu_{\max} \quad (35)$$

Utilizando novamente *Pseudomonas sp.* como exemplo (7°C , $\text{pH}=6,2$ e $a_w=0,99$) o estado fisiológico com maior frequência é de $1,59 \times 10^{-2}$, oscilando, aproximadamente 68% das ocorrências, entre $9,40 \times 10^{-2}$ e $7,12 \times 10^{-4}$. A Figura 4-27 apresenta o modelo de Branyi e Roberts (1994) com as combinações das variações descritas nos parâmetros μ_{max} e α .

Figura 4-27 - Simulações do crescimento de *Pseudomonas sp.*, utilizando o modelo Baranyi e Roberts, com as combinações das incertezas dos parâmetros μ_{max} e α a 7°C , $\text{pH}=6,2$ e $a_w=0,99$.



Supondo que determinado alimento tem sua vida útil encerrada com contagens de $6 \log(\text{UFC g}^{-1})$ de *Pseudomonas sp.*, os casos extremos encontrados nas simulações apresentadas na Figura 4-27 (contaminação inicial de $3 \log(\text{UFC g}^{-1})$) limitariam a vida útil de produto em 1,8 e 5,3 dias, para os maiores e menores valores de dispersão encontrados para os parâmetros. A vida útil de 2,9 dias é encontrada utilizando os parâmetros com maior frequência.

Assim, é importante interpretar as previsões determinísticas como uma opção dentre diversas possibilidades de ocorrência, em virtude de distribuições de parâmetros e condições de crescimento.

4.6 SIMULAÇÕES DE PROCESSOS E SISTEMAS DE EMBALAGEM

O presente item tem por objetivo avaliar diferentes cenários de processos de pré-solubilização de CO₂ e sistemas de embalagens em queijo Minas frescal, assim como os impactos dos principais parâmetros na concentração de equilíbrio ou pseudo-equilíbrio.

O exercício aqui proposto auxilia no entendimento dos fenômenos e, de certa maneira, na divulgação da ferramenta de transferência de massa para otimizar sistemas com atmosfera modificada. Não obstante, havendo demanda científica do acoplamento de modelos de transferência de massa com modelos de microbiologia preditiva, as simulações representam a primeira etapa do árduo trabalho de modelar e validar o crescimento microbiano em condições variáveis de concentração de CO₂.

Uma vez validados os modelos secundários, nos quais os parâmetros de crescimento microbiano, principalmente duração da fase lag e velocidade de crescimento, são preditos em função de características do meio de crescimento (pH, a_w, temperatura, [NaCl], [CO₂]_{dissolvido}, etc.), a modelagem da transferência de massa fornece informações aos modelos preditivos de crescimento microbiano.

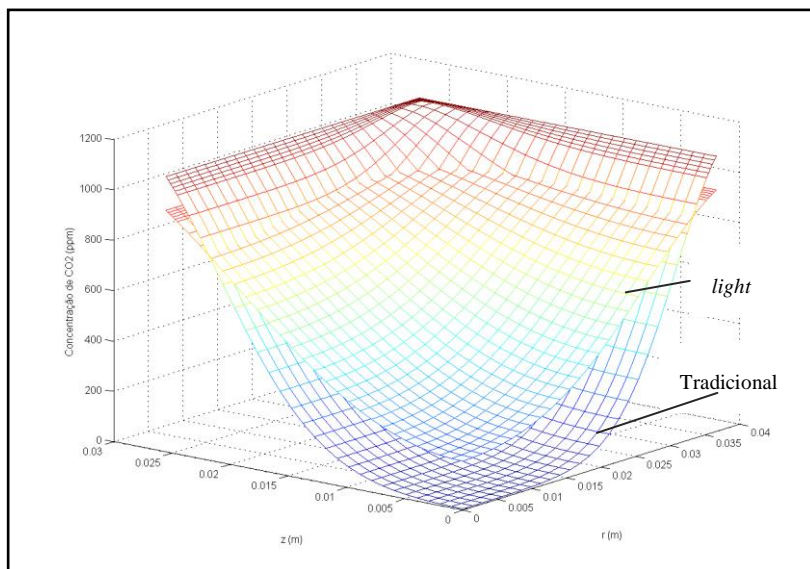
Além do gradiente de concentração de CO₂, podem haver consideráveis gradientes de concentração microbiana no alimento. Nesse cenário encontram-se diferentes regiões na amostra que possuem gradientes de concentração do agente inibidor de crescimento, que conduzem à diferentes velocidades de crescimento e população microbiana. No caso de queijo fresco sem adição de fermento, no qual a microbiota presente é basicamente deteriorante, a distribuição heterogênea da contaminação deve-se, provavelmente, à contaminação cruzada após pasteurização do leite, o que ocorre com frequência durante as etapas de fabricação do produto, dada a magnitude da contagem inicial de microrganismos psicrotróficos (LISITA, 2005).

4.6.1 *Pré-solubilização de CO₂ em câmaras pressurizadas*

A Figura 4-28 apresenta os perfis de concentração de CO₂ após simulação do processo de pré-solubilização a 360 kPa de pressão parcial de CO₂ por 1 hora, seguido de envase em ar (DF=90%). Perfil apresentado para queijo Minas frescal tradicional e *light* 24 horas após envase.

Embora o queijo Minas frescal *light* possua menor solubilidade ao CO_2 que o queijo tradicional (ver Tabela 4), o maior coeficiente de difusão efetivo do CO_2 favorece a solubilização do gás. Nas simulações realizadas, a concentração média é de 757 ppm e 628 ppm para os queijos *light* e tradicional, respectivamente. Apesar da aparente estabilização da pressão parcial de CO_2 na fase gasosa, há consideráveis gradientes no interior do produto 24 horas após envase.

Figura 4-28 - Simulação do processo de pré-solubilização de CO_2 a 360 kPa por 1 hora, seguido de envase em ar (DF=90%). Perfil 24 horas após envase. Peça cilíndrica de 220 g e 7,3 cm de diâmetro.



Como demonstra a Figura 4-28, no interior do queijo Minas frescal tradicional há locais isentos de CO_2 mesmo 24 horas após o envase. Esses locais podem ser mais suscetíveis à ação microbiana que a superfície em equilíbrio com a fase gasosa devido aos gradientes de concentração de CO_2 (GUILLARD *et al.*, 2016).

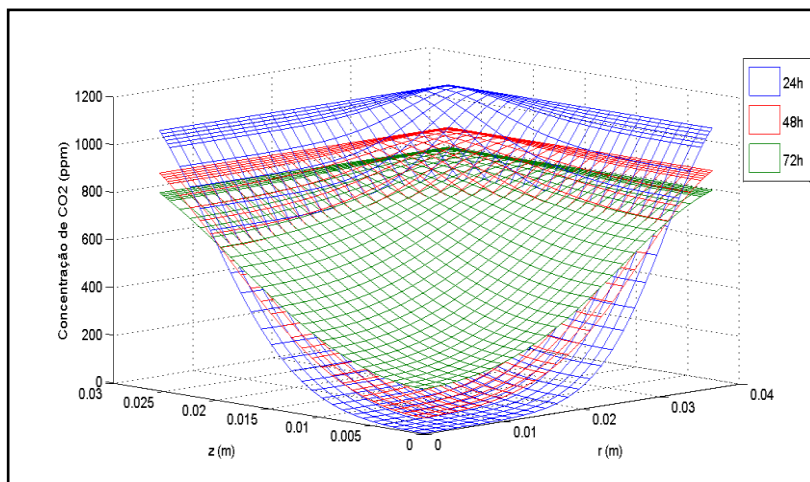
Os aspectos dinâmicos de transferência de massa envolvendo o CO_2 , O_2 e N_2 e microbiologia preditiva foram temas de estudo de Guillard *et al.*, (2016). Os autores revelam a relevância da respiração celular, que para muitos casos não pode ser negligenciada. Os parâmetros de respiração celular necessitam de mais estudos. No

trabalho citado, parte da imprecisão da modelagem é creditada à falta de dados seguros das cinética de respiração, que devem incluir a respiração do microrganismo alvo, as cinéticas respiratórias da microbiota deteriorante e a produção de CO₂ por via anaeróbica.

Os modelos terciários de microbiologia preditiva que consideram atmosferas de CO₂ supõem composição gasosa constante ao longo do período de avaliação, em alguns casos a concentração de CO₂ dissolvido é determinada pela solubilidade na fase aquosa do alimento (FSSP) e pelo grau de enchimento da embalagem, o que não retrata a realidade para muitos tipos de alimentos, principalmente os que possuem altos teores lipídicos. Para a grande maioria dos casos reais ocorre variação da composição gasosa e da concentração do gás dissolvido, modelos matemáticos de transferência de massa acoplados aos modelos de microbiologia preditiva podem ser utilizados para tal finalidade (CHAIX *et al.*, 2015a; 2015b GUILLARD *et al.*, 2016).

Simulações dos perfis de concentração 24, 48 e 72 horas após envase, em amostras submetidas ao processo de pré-solubilização de CO₂ a 360 kPa por 1 hora, seguido de dessorção em ar por 5 minutos e envase em ar com grau de enchimento de 90%, para uma peça cilíndrica de queijo de 220 g e 7,3 cm de diâmetro, são apresentados na Figura 4-29. A Figura 4-30 mostra a evolução da concentração média de CO₂ dissolvido no produto e da pressão parcial de CO₂, alterada pela dessorção de CO₂. Ainda são observados gradientes de concentrações consideráveis no interior do produto mesmo após 72 horas decorridas do envase. Entretanto, a composição da fase gasosa e a concentração média de CO₂ dissolvido são pouco afetadas. Como o grau de enchimento da embalagem é elevado (90%), traduzido em pequeno volume da fase gasosa comparado ao volume do alimento, a variação da pressão parcial de CO₂ é mais acentuada que a variação de concentração média no produto. Pequenas variações de massa na fase gasosa possuem grande impacto na pressão parcial de CO₂. Por outro lado, em sistemas com baixo grau de enchimento das embalagens é esperado menor impacto na composição da fase gasosa e maior impacto na concentração de CO₂ dissolvido no produto.

Figura 4-29 - Perfis de concentração de CO₂ em queijo Minas frescal tradicional 24h, 48h e 72h após envase. Simulação do processo 360 kPa por 1 hora, seguido de dessorção em ar por 5 minutos e envase em ar com 90% de enchimento da embalagem. Peça cilíndrica de 220 g e 7,3 cm de diâmetro.

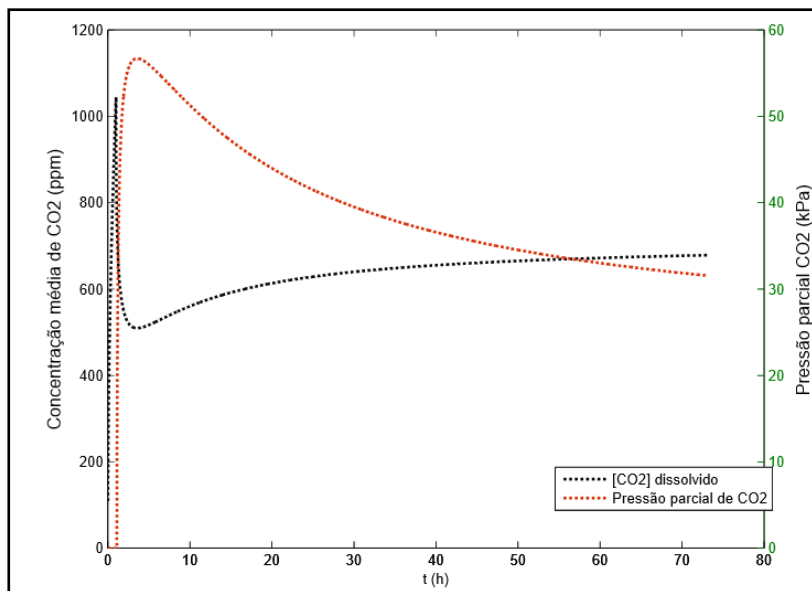


Segundo Simpson *et al.* (2001a), se as reações físico-químicas no alimento são minimizadas, a embalagem possui barreira razoável contra permeação de gases e o crescimento microbiano é pequeno (baixas concentrações), o pseudo-equilíbrio é atingido entre 40 e 60 horas em amostras de filé de peixe de 1,5 cm de espessura a 0 °C ($D_{ef}=5,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), considerados como placa plana (modelagem unidirecional).

Simpson *et al.* (2001b) demonstraram por meio de simulações que, para concentrações microbianas acima de 10^5 UFC g^{-1} , o metabolismo microbiano influencia diretamente a atmosfera no interior da embalagem e condições de anaerobiose podem ocorrer em poucos dias de armazenamento. As cinéticas de alteração da fase gasosa devido à proliferação microbiana, aeróbica e anaeróbica, são, evidentemente, impactantes na composição gasosa. Entretanto, o nível de alteração da proporção gasosa é fortemente dependente da razão entre volume de gás e volume de produto. Prova disso são as evoluções das frações gasosas nos experimentos 1, 2, 3 e 4 (DF<10%) que, se comparados com o experimento 0 (DF=50-60%), demonstram que, mesmo com contagens

microbianas da mesma ordem de magnitude, não houveram impactos contundentes nas proporções gasosas durante o período de armazenamento. Para o experimento 0, atmosferas em anaerobiose foram detectadas a partir do 14º dia de armazenamento refrigerado.

Figura 4-30 Evolução da concentração média de CO₂ dissolvido (pontilhado preto) e pressão parcial do gás na embalagem (pontilhado vermelho). Pré-solubilização a 360 kPa por 1 hora, seguido de envase em ar (DF=90%)



Uma das propostas da pré-solubilização de CO₂ é a redução do volume livre da embalagem, com inúmeras vantagens obtidas industrialmente com a redução de material de embalagem. Assim, deve-se considerar que processos melhorados tenham elevados graus de enchimento, incluindo a possibilidade de filmes termoencolhíveis.

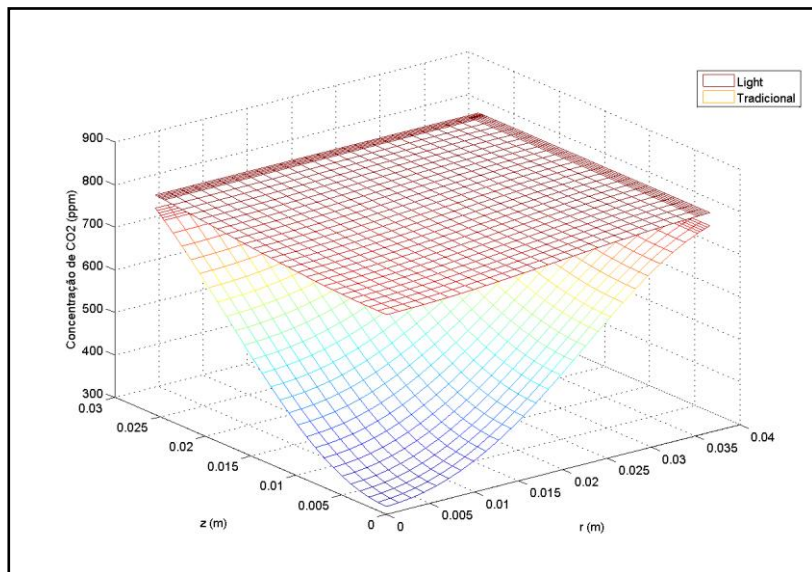
Aliando elevado grau de enchimento da embalagem com produtos contendo elevada concentração bacteriana, seja ela oriunda de contaminação ou propositalmente adicionada, as taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ devem ser consideradas na modelagem, principalmente para simulações de longos períodos de armazenamento,

por exemplo para determinar a vida útil do produto. É importante perceber que, quanto maior o grau de enchimento da embalagem, mais importantes tornam-se os parâmetros cinéticos de produção e consumo gasoso, visto que pequenas quantidades de matéria podem alterar significativamente a atmosfera, de maneira análoga ao impacto do grau de enchimento na concentração de equilíbrio em casos de desorção de CO₂ (ver Figura 2-2). Contudo, a modelagem aqui proposta é apta para prever as condições de equilíbrio ou pseudo-equilíbrio que ocorrem poucos dias após envase, sendo o impacto do metabolismo microbiano nas concentrações gasosas negligenciado.

Assim como demonstraram Guillard *et al.*, (2016), os dados de evolução da composição gasosa do experimento 0 revelam que a respiração microbiana não pode ser negligenciada decorrido determinado tempo após envase. Observou-se tendência de aumento do teor de CO₂ (DF entre 50 % e 60%) entre o 7° e 14° dia após envase, para os tratamentos com 1520 ppm e 924 ppm. Para o tratamento com 451 ppm um ligeiro aumento foi detectado no 7° dia (ver Figura 4-6).

A Figura 4-31 apresenta os perfis de concentração 72 horas após envase para queijo Minas frescal tradicional e *light*. O produto *light*, cujo coeficiente de difusão efetivo é superior ao produto tradicional, apresenta perfil de concentração homogêneo, ao passo que o produto tradicional ainda apresenta gradientes de concentração consideráveis. A redução do coeficiente de difusão efetivo do CO₂ ocorre, aparentemente, com o aumento do teor de lipídeos. A afinidade química entre as moléculas de CO₂ com a matriz lipídica contribui para a baixa mobilidade molecular do gás, intuído pelo coeficiente determinado experimentalmente.

Figura 4-31- Perfis de concentração de CO_2 72 horas após envase. Queijo *light* e tradicional. Processo de 360 kPa por 1h, seguido de dessorção em ar por 5 minutos e envase em ar (DF=90%).



4.6.2 Carbonatação do leite pasteurizado para produção de queijo Minas frescal

O queijo Minas frescal produzido a partir de leite pasteurizado carbonatado possui comportamentos distintos daqueles produzidos por processos convencionais (adição de cultura láctea e/ou ácido láctico ao leite pasteurizado). A carbonatação do leite para produção de queijo possui apelos tecnológicos e de preservação do produto (PAULA, 2010; DIAS, 2009).

As principais diferenças, do ponto de vista da manufatura do produto, estão relacionadas com a velocidade de coagulação e quantidade de coalho utilizado, visto que o leite carbonatado apresenta maior facilidade (aptidão) à coagulação (Paula, 2010).

Sucintamente, as vantagens da utilização da carbonatação do leite para a produção de queijo estão relacionadas com a utilização de menores quantidades de coagulante, coagulação mais rápida e

concentrações residuais de CO₂ no produto final suficientes para resultados microbiostáticos. No trabalho de Dias (2009), os queijos produzidos a partir de leite carbonatado apresentaram aproximadamente 900 ppm de CO₂ dissolvido no momento do envase. Nesse trabalho as amostras foram embaladas a vácuo. Tanto a permeabilidade quanto o grau de enchimento da embalagem não foram especificados. A concentração final de CO₂ foi de aproximadamente 400 ppm em 19 dias.

Maior elasticidade do produto final foi relatado por Paula *et al.* (2011), além de alterações na composição físico-química, com redução do pH e umidade (maior dessoramento devido a estrutura mais porosa) e alterações em propriedades mecânicas e reológicas. Paula *et al.*, (2010) avalia a necessidade de adaptações nos processos para correção das alterações em relação ao processo convencional, embora essas diferenças não sejam, necessariamente, alterações negativas. Entre as alterações, Paula (2010) sugere redução do tempo de mexedura para minimizar o dessoramento em amostras produzidas a partir de leite carbonatado.

Existem inúmeras etapas críticas no processo de fabricação de queijo que devem ser controladas quando espera-se que o produto, ao ser embalado, contenha concentrações significativas e padronizadas de CO₂ dissolvido, fazendo parte das barreiras utilizadas na preservação do alimento. Dentre essas etapas/parâmetros podemos citar os tempos, as temperaturas e os níveis de agitação empregados nas fases de agitação, coagulação, corte do coágulo, mexedura e salga. Falta de controle nessas etapas podem influenciar diretamente a concentração de CO₂ dissolvido e fragilizar um possível processo validado.

Cabe ressaltar que, até o presente momento, não há autorização do M.A.P.A. para produção de queijo com o processo discutido nesse item.

Com os modelos matemáticos disponíveis na literatura e o desenvolvido no presente trabalho é possível determinar os parâmetros de embalagens para alcançar concentrações desejadas de CO₂ dissolvido no queijo. A Tabela 32 apresenta os resultados de simulação de queijo Minas frescal embalado a 7°C, inicialmente com 900 ppm de CO₂ dissolvido e embalado em diferentes atmosferas iniciais e graus de enchimento da embalagem (modelo de equilíbrio CABRAL, 2011). Nesse caso foi considerado que o queijo apresenta distribuição de concentração de CO₂ homogênea.

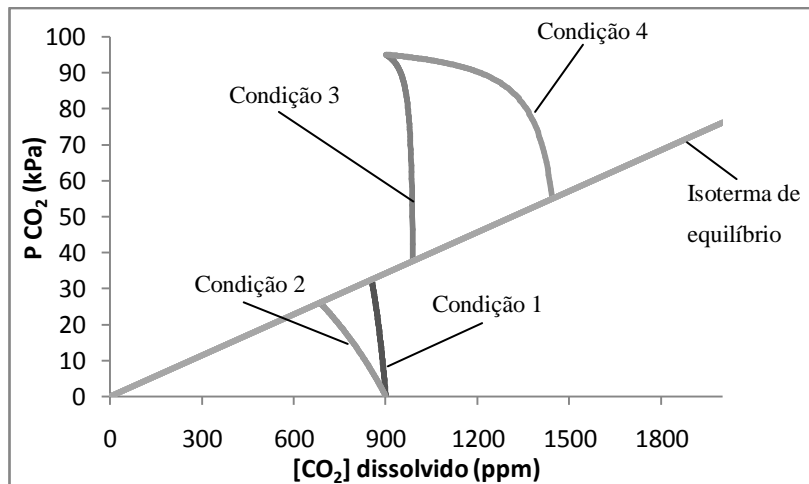
Tabela 32 - Simulações com parâmetros iniciais e de equilíbrio para queijo Minas frescal embalado em filmes de alta barreira a 7°C.

Parâmetro	Condição 1 dessorção	Condição 2 dessorção	Condição 3 absorção	Condição 4 absorção
Ci (ppm)	900	900	900	900
$P_{CO_2}^{t=0}$ (kPa)	0	0	95	95
DF (%)	95	75	95	75
$[CO_2]^\infty$ (ppm)	854	685	990	1449
$P_{CO_2}^\infty$ (kPa)	32	26	38	55
ΔP (kPa)	32	26	-57	-40
ΔV_g (%)	-48%	-35%	92%	89%

As maiores variações percentuais de volume da embalagem ocorrem para os maiores graus de enchimento (DF) e nos casos em que há absorção de CO₂. As concentrações de CO₂ dissolvido no equilíbrio variaram nas simulações entre 685 e 1449 ppm. Variações mínimas de pressão parcial e volume da fase gasosa da embalagem podem ser alcançadas utilizando atmosfera modificada com proporções de CO₂ próximas ao equilíbrio. No caso do produto ser embalado com 900 ppm de CO₂ dissolvido em atmosfera com 35% de CO₂, a concentração de equilíbrio seria de 905 ppm com variação de 1% no volume da fase gasosa e 0,6 kPa na pressão parcial de CO₂. Os modelos são importantes para projeto e decisão dos parâmetros de embalagem utilizados.

A Figura 4-32 apresenta as variações da pressão parcial de CO₂ na fase gasosa com a concentração de CO₂ dissolvido para os processos apresentados na Tabela 32. Industrialmente há possibilidades de obtenção de diferentes concentrações finais a partir do mesmo produto, representando um aspecto de flexibilidade dos processos, que podem ser otimizados, alterados e adaptados em função da concentração de CO₂ desejada.

Figura 4-32 - Condições do momento do envase até equilíbrio para processos descritos na Tabela 32. Condições 1 e 2: dessorção de CO₂ (pré-solubilização de CO₂ e envase em ar); condições 3 e 4: absorção de CO₂ (pré-solubilização de CO₂ e envase em ATM).



4.6.3 Modelagem matemática do crescimento microbiano acoplado com transferência de massa

Dentre os possíveis perigos em saúde pública para queijos frescos, destaca-se a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*, devido à sua capacidade de reprodução em temperaturas de refrigeração, tolerância a ácidos e elevadas concentrações de NaCl, por estar comprovadamente envolvida em surtos de doenças transmitidas pelo consumo de queijos e por apresentar frequência relativamente elevada de detecção nesse tipo de alimento (APOLINÁRIO *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2014; WARRINER e NAMVAR, 2009; McLAUCHIN *et al.*, 2004). Na Europa, a listeriose é a maior causa de hospitalização devido ao consumo de alimentos contaminados (MAGALHÃES *et al.*, 2015)

O gênero *Listeria* é composto por *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria monocytogenes*. Todas as espécies são fenotipicamente

similares, embora apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* sejam patogênicas (WARRINER e NAMVAR, 2009). A sensibilidade de *Listeria sp.* ao CO₂ é considerada pequena, sendo esperado crescimento desse microrganismo mesmo em elevados teores de CO₂ (GUILLARD *et al.*, 2016; DEVLIEGHIERE *et al.*, 2001).

O crescimento de *L. monocytogenes* foi simulado em queijo fresco, utilizando dados de velocidades máximas de crescimento em função da concentração de CO₂ disponíveis no *Combase* (www.combase.cc) e no *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP) (fssp.food.dtu.dk/). Em ambos bancos de dados a variação da velocidade máxima de crescimento do microrganismo possui comportamento linear com a fração de CO₂ na fase gasosa, sendo essa função incluída no algoritmo. A correlação com a concentração de CO₂ dissolvido foi realizada com as constantes de Henry determinadas experimentalmente.

Os valores são limitados a 100% de CO₂ na fase gasosa da embalagem a pressão ambiente, implicando na redução da margem de concentração de CO₂ dissolvido abrangido pelo modelo secundário de predição do μ_{\max} , visto que extrapolações da espectro abrangido experimentalmente podem conduzir a erros. As concentrações máximas admitidas nas simulações são de 2630 e 1980 ppm para queijo Minas tradicional e *light*, respectivamente, equivalente à concentração de equilíbrio em 100 kPa.

O modelo de crescimento microbiano de Baranyi e Roberts (1994) foi acoplado ao modelo de transferência de massa de CO₂. Para cada passo no tempo simulado foi obtido um perfil de concentração de CO₂ no alimento. A partir desse perfil foi gerado um perfil de velocidades máximas de crescimento que implicam em diferentes padrões de crescimento microbiano a longo do tempo distribuídos na malha computacional representativa da amostra cilíndrica de queijo.

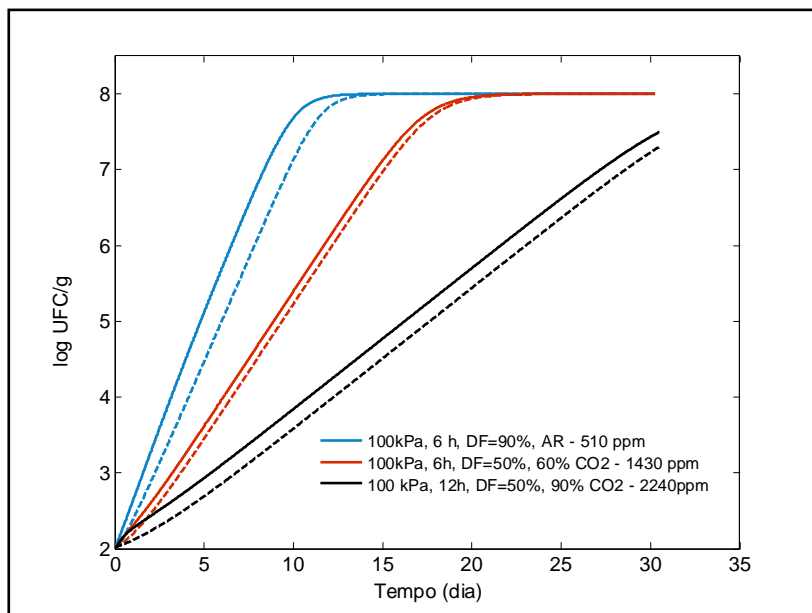
As simulações levaram em conta que a distribuição da concentração microbiana inicial no produto no alimento é homogênea. Além disso, o estado fisiológico do microrganismo foi fixado como dado de entrada no modelo. Normalmente, se tratando de microrganismos patogênicos, a abordagem conservadora é utilizada, na qual é desprezada ou minimizada a fase Lag de crescimento, subentendendo que o estado fisiológico do microrganismo possui valor próximo ou igual a um. Foi utilizado nas simulações o valor de $\alpha=0,9$. Dados disponíveis no *Combase* demonstram que a variação do estado fisiológico de *L. monocytogenes* (pH 6,2, 7°C e a_w de 0,99) em 68% das

amostragens é entre $1,87 \times 10^{-1}$ e $1,25 \times 10^{-4}$, com maior frequência de $2,07 \times 10^{-2}$.

A Figura 4-33 apresenta simulações de diferentes curvas de crescimento de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal tradicional armazenado a 7°C, para arranjos de processos e parâmetros de envase que levam à diferentes concentrações de CO₂. Embora o microrganismo em questão seja considerado pouco sensível ao CO₂, diferenças consideráveis nas curvas de crescimento foram encontradas nas simulações. Os tempos para alcançar 10^6 UFC g⁻¹ no centro das amostras simuladas foram de 6,5, 11,7 e 21,6 dias para os processos com 510, 1430 e 2240 ppm de CO₂ dissolvido, respectivamente, mostrando que concentrações elevadas do microrganismo podem ocorrer em poucos dias de armazenamento refrigerado. No Brasil, é preconizado ausência desse microrganismo em 25 g de amostra em queijos de muito alta umidade (BRASIL, 2001). Concentrações de 10^2 UFC g⁻¹ em alimentos prontos para consumo são consideradas inaceitáveis e potencialmente perigosas em saúde pública (SARAIVA *et al.*, 2016). Esse limite não pode ser excedido no final da vida útil do alimento (*Commission European Communities*, 2008).

Queijos com maiores dimensões podem ter gradientes de concentração de CO₂ elevados em processos de solubilização do produto acabado e em atmosfera modificada tradicional, fragilizando o método. A condição de incorporar CO₂ durante etapas do processo possibilita maior homogeneidade de distribuição do gás na amostra e maior segurança do produto. A produção de queijos frescos com leite pasteurizado carbonatado destaca-se dentre os demais processos de pré-solubilização e aplicação tradicional de CO₂ em AM pois, além de promover benefícios tecnológicos e econômicos (PAULA 2010), conduz à solubilização de CO₂ antes da recontaminação, uma vez que, em tese, o leite pasteurizado possui baixa carga patogênica e deteriorante psicrotófica, sendo as etapas de adição de ingredientes, coagulação, mexedura, corte da massa, enformagem, salga e envase as possíveis etapas onde ocorre grande exposição e condições de proliferação dos microrganismos.

Figura 4-33 - Diferentes perfis de crescimento de *L. monocytogenes* a 7 °C em queijo Minas frescal tradicional (220g e 7,3 cm de diâmetro) influenciados por diferentes processos de pré-solubilização e condições de envase. Linha contínua: centro geométrico da amostra; linha tracejada: superfície.

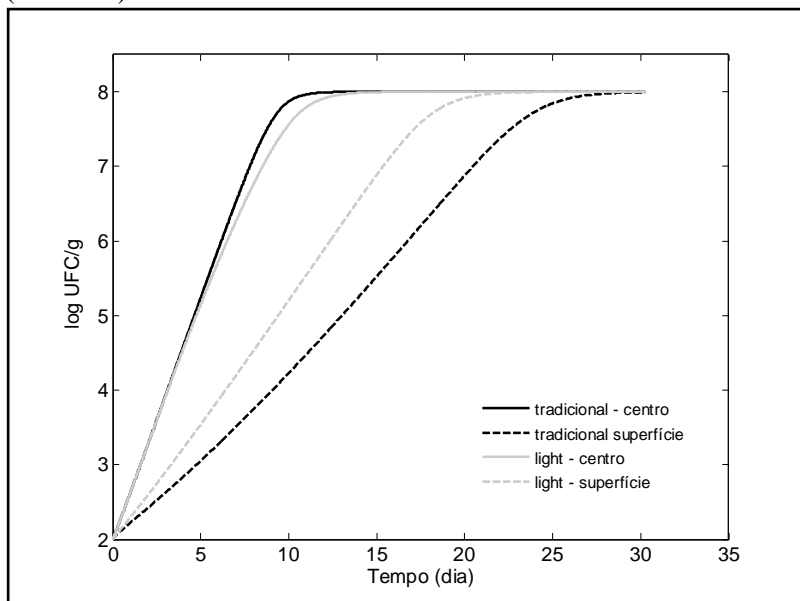


Guillard *et al.*, (2016) avaliaram o impacto de diferentes atmosferas modificadas na população de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas sp.* distribuídas na superfície e na parte inferior de amostras de queijo processado (10 mm de espessura). Não foi observado diferenças significativas entre as contagens microbianas nas parte superiores e inferiores das amostras. A pequena dimensão da amostra está, provavelmente, relacionada com o resultado observado. Estudos com geometrias maiores nas quais sejam encontrados gradientes de concentração de CO₂ significativos ao longo do tempo são fundamentais para avaliar a real influência da distribuição de concentração no crescimento microbiano. Além disso, não é esperado gradientes de concentração de CO₂ entre as superfícies em contato com o filme e a exposta diretamente à atmosfera. A condição de isolamento da área em contato com a embalagem não deve ser utilizada devido à capacidade do

gás penetrar em pequenos espaços e à imperfeições da superfície do produto.

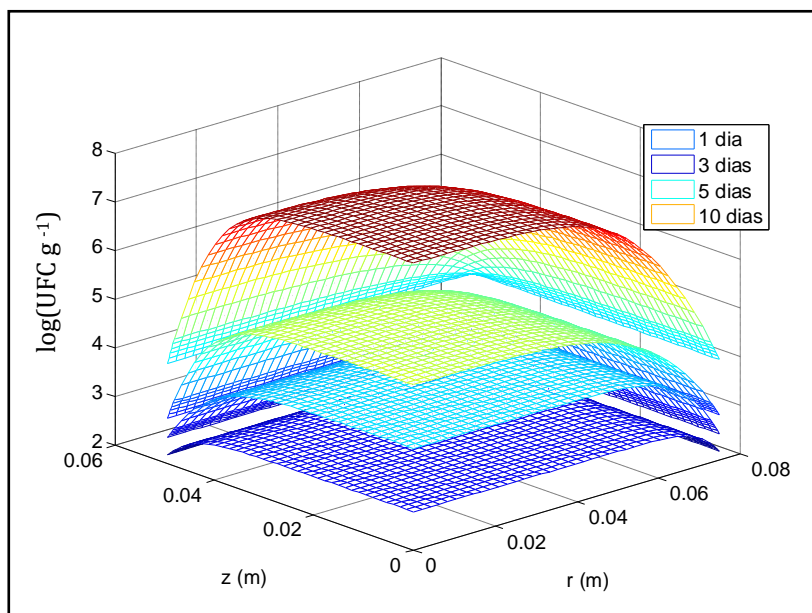
As simulações de crescimento de *L. monocytogenes* a 7 °C na superfície e no centro geométrico de uma peça cilíndrica de queijo Minas frescal tradicional e *light* de 1800g com diâmetro de 15 cm e altura de 9,9 cm são apresentadas na Figura 4-34. Contagens de 10^3 UFC g^{-1} são observadas em 4,8 e 1,6 dias no centro e superfície do queijo Minas tradicional, respectivamente. Para o produto *light*, contagens de 10^3 UFC g^{-1} são observadas em 1,6 e 3,3 dias no centro e na superfície, respectivamente. No 10º dia a diferença de população microbiana entre o centro e a superfície é de 3,7 $\log(\text{UFC } g^{-1})$ para o produto tradicional, enquanto que o produto *light* apresenta diferença de 2,4 $\log(\text{UFC } g^{-1})$, indicando que gradientes de contaminação não podem ser desprezadas em amostras maiores, sendo as diferenças mais pronunciadas em produtos com baixa difusividade do CO_2 , como é o caso do queijo Minas frescal tradicional.

Figura 4-34 - Simulação de crescimento de *L. monocytogenes* na superfície e no centro geométrico de queijo Minas frescal tradicional e *light* (diâmetro de 15 cm, altura de 9,9 cm e massa de 1800 g). Processo de pré-solubilização de 100 kPa por 6 horas, envase 90% CO_2 (DF=50%).



Um efeito interessante é observado na Figura 4-34. Devido à maior solubilidade e menor difusividade ao CO_2 , o queijo tradicional apresenta menores velocidades de crescimento microbiano na superfície e maiores no centro, aumentando as diferenças de concentração microbiana entre centro e superfície quando comparado ao queijo *light*. A Figura 4-35 apresenta a distribuição de concentração microbiana em diferentes intervalos de tempo para o produto queijo Minas tradicional de 1800 g.

Figura 4-35 - Perfis de concentração de *L. monocytogenes* de queijo Minas tradicional (diâmetro de 15 cm, altura de 9,9 cm e massa de 1800 g) durante armazenamento a 7 °C. Processo de 100 kPa por 6 horas e envase com 90% de CO_2 (DF=50%).



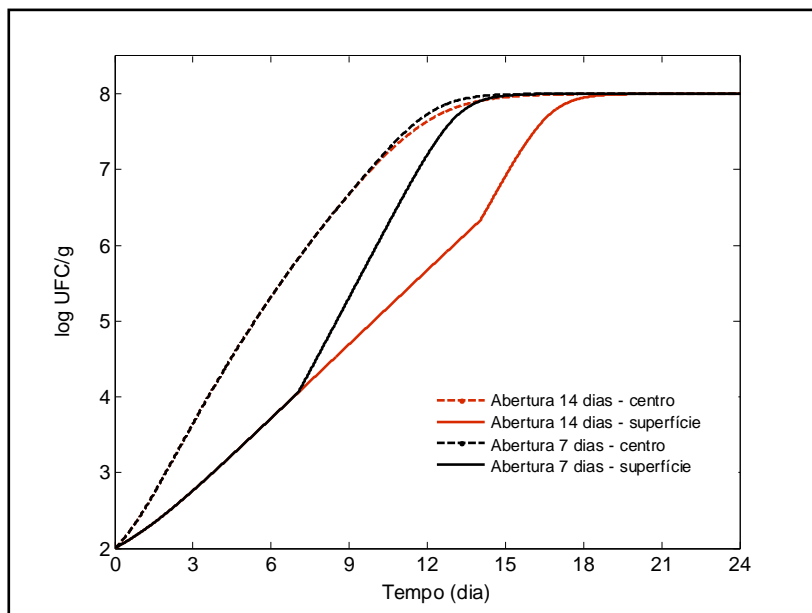
A adição de CO_2 em queijos frescos pode ser utilizada para aumentar a segurança de consumo dos produtos. Entretanto, não deve ser encarada como uma barreira isolada de controle de segurança, visto que o microrganismo é apto de crescimento, e sim como barreira adicional em caso de falhas das principais barreiras utilizadas para controle do patógeno, como tratamento térmico, controles de temperatura e contaminação ambiental, sistemas de higiene, etc. Barancelli *et al.*, (2011) descreveram sobre a dificuldade de controle do

patógeno em laticínios. Segundo os autores, apenas higiene na ordenha e pasteurização do leite não são suficientes, sendo recontaminações ambientais um dos principais fatores da presença do microrganismo no ambiente industrial e nos produtos.

Um ponto que deve ser avaliado com devida cautela é a deterioração e multiplicação de patogênicos nos produtos submetidos à pré-solubilização de CO₂ e/ou atmosfera modificada após abertura da embalagem, simulando a conservação doméstica do produto. Embora a dessorção do CO₂ após abertura da embalagem não ocorra imediatamente e haja um efeito residual durante determinado tempo, espera-se que o efeito microbiostático seja fortemente reduzido. A Figura 4-36 apresenta simulações do crescimento de *L. monocytogenes* avaliando a abertura da embalagem em 7 e 14 dias de estocagem. A validação de vida útil de produtos submetidos à processos de pré-solubilização de CO₂ e/ou AM deve avaliar a estabilidade microbiológica após abertura da embalagem. Como demonstra a Figura 4-36, a exposição do produto à atmosfera isenta de CO₂ influencia as velocidades máximas de crescimento, principalmente nas regiões próximas à superfície.

Concentrações baixas de CO₂ devem ser tratadas com cautela. Os microrganismos psicrotróficos gram-negativos mais sensíveis ao CO₂ irão reduzir seu metabolismo mais acentuadamente que o patogênico aqui considerado, aumentando a vida útil do produto. Esse aumento de vida útil pode representar diminuição da segurança de consumo, considerando que indícios de deterioração serão menores e não levarão à rejeição do produto pelo consumidor. Além disso, bactérias deteriorantes podem ter relações antagônicas com outros microrganismos, nas quais produtos do metabolismo geram vantagens competitivas em relação à outros microrganismos (GRAM *et al.*, 2002).

Figura 4-36 - Simulação do crescimento de *L. monocytogenes* a 7 °C em queijo Minas fresco tradicional (220 g, 7,3 cm de diâmetro) após abertura da embalagem no 7° (linha preta) e 14° (linha vermelha) dia de armazenamento. Atmosfera modificada tradicional com pressão parcial de equilíbrio de 60 kPa.

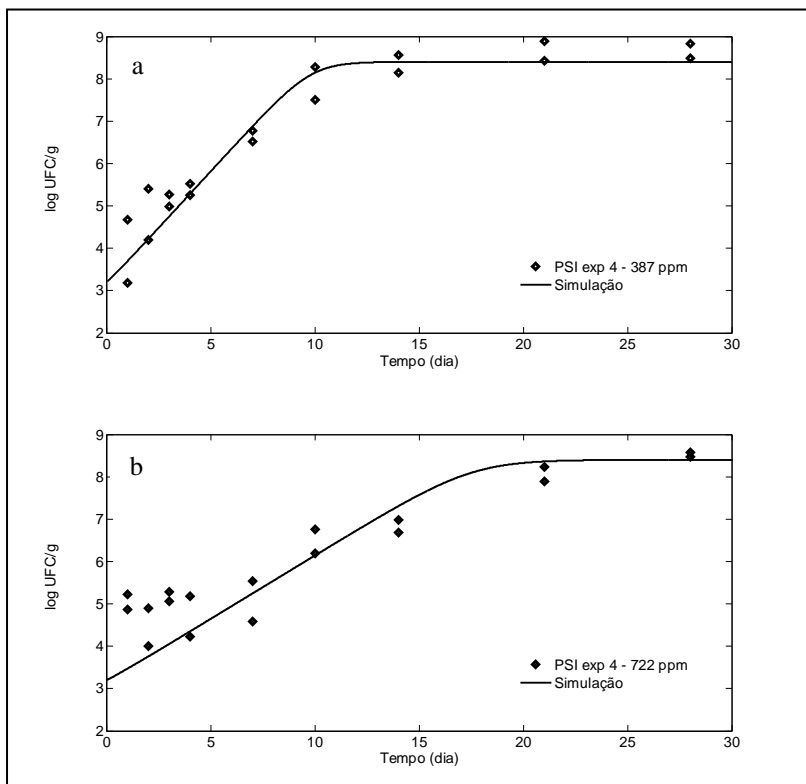


A Figura 4-37 apresenta as simulações dos processos 90 kPa por 30 minutos (envase 20% de CO₂, DF=6%) e 100 kPa por 1 hora (envase 40% de CO₂, DF=10%), plotados simultaneamente com os dados experimentais. A simulação do crescimento microbiano e comparação dos resultados com os dados experimentais utilizados na obtenção dos parâmetros primários de crescimento não fornece informações adicionais. Entretanto, a Figura 4-37 apresenta o acoplamento da modelagem de transferência de massa ao modelo de crescimento microbiano, sendo, por essa razão, abordadas. Houve boa concordância com os dados experimentais, demonstrando que a modelagem de transferência de massa acoplada com a modelagem de crescimento microbiano foi capaz de prever o crescimento microbiano em condições variáveis de concentração de CO₂ dissolvido. A

concentração microbiana inicial e final utilizadas foram as médias encontradas para os tratamentos no experimento 4.

O tratamento com 1097 ppm não foi simulado pois a pressão de processo de 160 kPa pode comprometer a qualidade da simulação em virtude da extrapolação do modelo secundário de predição do parâmetro μ_{\max} .

Figura 4-37 - Crescimento de psicrotróficos em queijo Minas frescal *light*. Linha contínua: simulação do crescimento após simulação do processo de pré-solubilização de CO_2 e envase em atmosfera modificada. Losangos: Dados experimentais. a) 90 kPa por 30 minutos e envase em 20% de CO_2 (387ppm); b) 110 kPa por 60 minutos e envase em 40% de CO_2 (722 ppm).



5 CONCLUSÕES

O refino da malha computacional nas regiões de interface em coordenadas cilíndricas foi adequado para determinação do coeficiente de difusão efetivo do CO₂, nos produtos avaliados, utilizando o método manométrico. As melhorias propostas reduzem o tempo de cálculo computacional e melhoram a qualidade dos ajustes. Os coeficientes de difusão efetivo do CO₂ em queijos frescos foram influenciados pelo teor de gordura, sendo o valor do coeficiente inversamente proporcional ao teor de gordura para as temperaturas estudadas;

Não foi observado diminuição da solubilidade do CO₂ em gordura com o incremento de temperatura de 4 °C para 7 °C. Esse efeito é relacionado com fusão de ácidos graxos de baixo ponto de fusão encontrados na gordura láctea, cuja solubilidade é maior no estado líquido comparado com estado sólido. Nos queijos Minas frescal tradicional e *light* aumento de temperatura foi acompanhado pela redução da solubilidade. Maiores solubilidades ao CO₂ foram encontrados no produto com maior teor de gordura.

O método da força de empuxo foi eficiente para avaliação das cinéticas de desorção de CO₂ em alimentos que não respiram, podendo ser utilizado para o cálculo da solubilidade e da difusividade do CO₂.

A pré-solubilização de CO₂ em queijos frescos antes do envase pode ser utilizada para aumento da vida útil do produto. Tanto o envase em ar quanto em atmosfera modificada podem ser utilizados após processo de pré-solubilização. Havendo necessidade de atmosferas com baixo teor de oxigênio, é possível o envase a vácuo após pré-solubilização de CO₂. As velocidades máximas de crescimentos dos grupos microbiológicos estudados foram influenciadas pela presença de CO₂, tendo seus valores reduzidos.

Os modelos matemáticos desenvolvidos são ferramentas importantes para avaliar sistemas com atmosfera modificada tradicional e processos com pré-solubilização de CO₂. As simulações de crescimento do patógeno *L. monocytogenes* em queijo, com gradientes de concentração de CO₂, são exemplos da evolução dos modelos que tendem a englobar diversos fenômenos na tentativa de prever o crescimento microbiano.

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) foi adequado para ajustar as curvas de crescimento de bactérias psicrotróficas e ácido lácticas em queijo Minas frescal.

São necessários mais estudos para validar os modelos como aptos de serem utilizados com finalidade em avaliação da segurança de alimentos e predição da vida útil de produtos.

O presente estudo contribui para a disseminação da utilização de CO₂ em laticínios. O levantamento bibliográfico sobre o uso do CO₂ em laticínios não aponta argumentos científicos para proibição do uso de leite pasteurizado carbonatado na produção queijos, sendo a regulamentação dessa prática pelo M.A.P.A. de interesse industrial.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são sugeridas oportunidades de pesquisas que podem contribuir para o maior entendimento de processos e mecanismos de ampliação de vida útil e aumento da segurança microbiológica de alimentos que não respiram processados e/ou armazenados na presença de CO₂. Os processos avaliados no presente estudo podem ser adaptados para produtos cárneos e pescado com relativa simplicidade, entretanto, a ecologia, bioquímica e características sensoriais específicas de cada produto definirão os melhores processos e condições de envase.

- Identificação e quantificação da microbiota deteriorante de queijo fresco submetido ao processo de pré-solubilização de CO₂;
- Aprofundamento do processo de produção de queijo frescal com leite pasteurizado carbonatado com maior foco nas possibilidades de concentrações no momento de envase;
- Avaliação da deterioração e segurança de consumo de produtos após abertura da embalagem, simulando armazenamento doméstico;
- Desenvolvimento do processo de solubilização de CO₂ durante salga em solução salina carbonatada, com possível acoplamento do processo de impregnação a vácuo;
- Determinação do limiar de percepção sensorial de CO₂ dissolvido para diferentes produtos;
- Inclusão das taxas respiratórias e produção de CO₂ por via anaeróbica nos modelos que englobam transferência de massa e microbiologia preditiva;
- Avaliação da influência de gradientes de concentração significativos de CO₂ no crescimento de patógenos de interesse em saúde pública;
- Avaliação da influência conjunta de CO₂ e O₂ dissolvidos no crescimento microbiano.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-BARY, E. M. **Handbook of Plastic Films**, Rapra Technology Ltd, Shawbury, Shrewsbury, UK, 2003.

acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, 2014.

ALAM, T.; GOYAL, G.K. Influence of modified atmosphere packaging and storage at deep freeze conditions on the sensory characteristics of Mozzarella cheese. **Milchwissenschaft**, v. 62, n. 3, p. 311–314, 2000.

ALVES, R.M.V.; DE LUCA, S.; GRIGOLI, C.I.; VAN DENDER, A.G.F.; ASSIS, D.F.F. Stability of sliced Mozzarella cheese in modified-atmosphere packaging. **Journal of food protection**, v. 59, n. 8, p. 838–844, 1996.

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw Milk with carbon dioxide. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 200, p. 293-296, 1995.

ANSARI, T.; HESARI, J.; AHMADI, A.; GIASIFAR, S. Effects of CO₂ Addition to Raw Milk on Microbial, Physiochemical and Sensory Properties of Probiotic Set Yoghurt. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p. 253-263, 2013.

APOLINÁRIO, T. C.C; SANTOS, G. S.; LAVORATO J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas gerais. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

ARSLAN, S.; EYI, A.; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. **Journal of Dairy science**, v. 94, p. 5851–5856, 2011.

AUGUSTIN, J. C.; BERGIS, D.; BOURDIN, G. M.; CORNU, M.; COUVERT, O.; DENIS, C.; HUCHET, V.; LEMONNIER, S.; PINON, A.; VIALLETE, M.; ZULIANI, V.; STAHL, V. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. **Food Microbiology**, v. 28, p. 746-754, 2011.

BARANCELLI, G. V.; CRUZ, J. V. S.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. **LISTERIA MONOCYTOGENES: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE**

PÚBLICA. *Arquivos do Instituto Biológico.*, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BARANYI, J., ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199-218, 1995.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. E15-E19, 2006.

BARUZZI, F.; LAGONIGRO, R.; QUINTIERI, L.; MOREA, M.; CAPUTO, L. Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. **Food Microbiology**, v. 30, p. 37-44, 2012.

BERESFORD, T. What problems are caused by psychrotrophs? **Cheese problems solved**. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge. CB21 6AH, England, p. 13, 2007.

BERK, Z. **Food Process Engineering and Technology (second edition)**. Chapter 27 – Food Packaging. p 621-636, 2013.

BHASKARACHARYA, R. K.; SHAH, N. P. Texture and microstructure of skim milk Mozzarella cheeses made using fat replacers. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 9-14, 2001.

BILLE, J., BLANC, D.S., SCHMID, H., BOUBAKER, K., BAUMGARTNER, A., SIEGRIST, H.H., TRITTEN, M.L., LIENHARD, R., BERNER, D., ANDERAU, R. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Eurosurveillance** 11, 633, 2006.

BILLE, J.; BLANC, D. S.; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H., H.; TRITTEN, M. L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J. M.; MALINVERNI, R.; GENNÉ, D.; ERARD, P. H.; WAESPI, U. Outbreak Of Human Listeriosis Associated With Tomme Cheese In Northwest Switzerland, **Eurosurveillance**, v. 11, (6), 2006.

BLICKSTAD, E.; ENFORS, S. O.; MOLIN, G. Effect of hyperbaric CO₂ pressure on the microbial flora of pork stored at 4 °C – 14 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 493–504, 1981.

BOOR, K.J.; MURPHY, S.C. Microbiology of market milks. In: Robinson RK, editor. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience. p 91–122. p 13–36. 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos**. ANEXO I - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. D.O.U. de 11/03/1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. DOU, Brasília 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006, DOU 14/12/2006 - **Métodos Analíticos Oficiais Físicos Químicos , para controle de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília, DF, 2006.

BURITI, F. C. A., OKAZAKI, T. Y., ALEGRO J. H. A., SAAD S. M. I.. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 57, n. 2, 2007.

CABRAL, G. J. **Determinação experimental da solubilidade e do coeficiente de difusão efetivo do CO₂ em queijo tipo Minas frescal e simulação de embalagem sob atmosfera modificada**. Florianópolis, SC, 2011. Dissertação de mestrado. Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

CANTONI, C.; STELLA, S.; COZZI, M. 2003. Blue colouring of Mozzarella cheese. **Ind. Aliment**. v. 42, p. 840-843, 2003

CAPUTO, L.; QUINTIERI, L.; BIANCHI, D. M.; DECASTELLI, L.; MONACI, L.; VISCONTI, A.; BARUZZI, F. Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by *Pseudomonas fluorescens*. **Food Microbiology**, v. 46, p. 15-24, 2015.

CARCIOFI, B. A. M.; FAISTEL, J.; ARAGÃO G. M. F.; LAURINDO J. B. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 89–94, 2002.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. Dissertação De Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

CHAIX, E.; GUILLAUME, C.; GUILLARD, V. Oxygen and Carbon Dioxide Solubility and Diffusivity in Solid Food Matrices: A Review of Past and Current Knowledge. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 261-286, 2014.

CHAIX, E.; COUVERT, O.; GUILLAUME, C.; GONTARD, N.; GUILLARD, V. Predictive Microbiology Coupled with Gas (O₂/CO₂) Transfer in Food/Packaging Systems: How to Develop an Efficient Decision Support Tool for Food Packaging Dimensioning. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 1-21, 2015a.

CHAIX, E.; GUILLAUME, C.; GONTARD, N.; GUILLARD V. Diffusivity and solubility of CO₂ in dense solid food products. **Journal Of Food Engineering**, 166, p. 1-9, 2015b.

CHAIX. E.; BROYART, B.; GUILLAUME, C.; GONTARD, N.; GUILLARD, V. Mechanistic model coupling gas exchange dynamics and *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaging of non respiring food. **Food Microbiology**, v. 51, p. 192-205, 2015b.

CHANG, M. K.; ZHANG, H. Carbonated milk: proteins. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 880–882, 1992.

CHEN, J. H.; HOTCHKISS, J. Effect of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Psychrotrophic Organisms in Cottage Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2941-2945, 1991.

CIE. **Commission Internationale De Leclairage. Technical Report - Colorimetry**. 3^a edição, 72 p. 2004.

CLARK, D. S.; LENTZ, C. P. The effect of carbon dioxide on the growth of slime producing bacteria on fresh beef. **Can. Inst. Food Technol. J.** v. 2 (2), p. 72-75, 1969.

COELHO, M.C.; SILVA, C.C.G.; RIBEIRO, S.C.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E.; ROSA, H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission Staff Working Document**. Guidance Document SANCO/1628/2008.

CRIPA, A.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; AMICO, S. C. Desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas. **Polímeros**, v.17 (3) São Carlos Jul/Set 2007.

DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal Of Food Protection**, v. 48(6), p. 532–537, 1985.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77 (2), p. 460e470, 2011

DEBS-LOUKA, E.; LOUKA, N.; ABRAHAM, G.; CHABOT, V.; ALLAF, K. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 626–631, 1999.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 33, p. 531-537 2000.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; IMPE, J. V. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 105-113, 1998a.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; IMPE, J. V. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 231-238, 1998b.

DEVLIEGHERE, F.; GEERAERD, A. H.; VERSYCK, K. J.; VANDEWAETERE, B.; VAN IMPE, J.; DEBEVERE, J. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **Food Microbiology**, v. 18 p. 53-66, 2001.

DIAMANTINO V. R.; BERALDO F. A.; SUNAKOZAWA T. N.; PENNA A. L. B. Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. **Food Science and Technology**, v. 56, p. 356-362, 2014.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 109-136, 1989.

DUFRESNE, I.; SMITH, J. P.; LIU, J. N.; TARTE, I. Effect of headspace oxygen and films of different oxygen transmission rate on toxin production by *Clotridium botulinum* type E in rainbow trout fillets stored under modified atmospheres. **Journal of Food Safety**, v. 20, p. 157-175, 2000.

EIE, T.; RYSSTAD, H.; CASTBERG, H. B. Carbon dioxide treatment of milk for condensation and drying. **North European Dairy Journal**, v. 53, p. 95-104, 1987.

Fabiano, B., Perego, P., Pastorino, R., Del Borghi, M. The extension of the shelf life of “pesto” sauce by a combination of modified atmosphere packaging and refrigeration. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 293-30, 2000.

FDA - **Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Carbon dioxide**. Acesso julho 2014. Disponível em: www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261241.htm

FERNANDES, R. **Microbiology Handbook Dairy Products**. Leatherhead Food International Ltd, Cambridge, UK, 2009.

FONSECA, R. V. **avaliação de filmes coextrusados de PET/PEBD e PET/EVOH/PEBD Usados Em Embalagens Para Alimentos**. 2014. 70p. Dissertação (mestrado em engenharia de materiais). Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: AN Aspen Publication, 587p. 2000.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology**. Volume 2 - Major Cheese Groups. Third edition. Elsevier Academic Press, 2004.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; COLOGNA, N.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Microbial analysis of raw cow's milk used for cheese-making: influence of storage treatments on microbial composition and other technological traits. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 171-180, 2011.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 2005. chap. 8, p. 271-286.

FRANK, J.F.; MARTH, E.H. Fermentations. In: WONG, N.P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. **Fundamentals of dairy chemistry**. Gaithersburg: An Aspen Publication, 1999. chap. 14, p. 655 – 738.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo, SP, Brasil, 200p. 2005.

GAMMARIELLO, D.; CONTE, A.; ATTANASIO, M.; DEL NOBILE, M. A. Effect of modified atmospheres on microbiological and sensorial properties of Apulian fresh cheeses. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 7, p. 370–378, 2009.

GENIGEORGIS, C. A. Microbial and safety implication of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 237–343, 1985.

GEVAUDAN, S., LAGAUDE, A., FUENTE, T., CUQ, L. Effect of treatment by gaseous carbon dioxide in the colloidal phase of skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1713 – 1721. 1996.

GILL, C. O. The Solubility of carbon Dioxide in Meat. **Meat Science**, v. 22, p. 65-71, 1988.

GONZALEZ-FANDOS, E., SANZ, S. AND OLARTE, C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, v. 17, p. 407-414, 2000.

GOSWAMI, T. K.; MANGARAJ, S. Advances in polymeric materials for modified atmosphere packaging (MAP). **Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging**, p. 163-242, 2011.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; GIVSKOV, M.; Food spoilage — interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79 – 97, 2002.

GREIG, J.D., RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of food Microbiology**, v. 130, p. 77–87, 2009.

GUILLAUME C., JIMENEZ, L., CUQ, J-L. MARCHESSEAU, S. An original pH-reversible treatment of milk to improve rennet gelation. **International Dairy Journal** v. 14, p. 305–31. 2004.

GUILLARD, V.; COUVERT, O.; STAHL, V.; HANIN, A DENIS, C.; HUCHET, V.; CHAIX, E.; LORIOT, C.; VINCELOT, T.; THUAULT, D. Validation of a predictive model coupling gas transfer and microbial growth in fresh food packed under modified atmosphere. **Food microbiology**, v.58, p. 43-55, 2016.

HAAS, G.J.; PRESCOTT, H. E.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE, L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 253–265, 1989.

HENDRICKS, M. T.; HOTCHKISS, J. H. Effect of CO₂ on *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria monocytogenes* growth in aerobic atmospheres. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1548–1552, 1997

HINRICHS, H. R.; GEOTZ, J.; NOLL, M.; WOLFSCHOON, A.; EIBEL, H.; WEISSER, H. Characterisation of the water-holding capacity of fresh cheese samples by means of low resolution nuclear magnetic resonance. **Food Research International**, v. 37, p. 667–676, 2004.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined Effects of Carbon Dioxide Addition and Barrier Films on Microbial and Sensory Changes in Pasteurized Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 690–695, 1999.

HOTCHKISS, J. H.; WERNWE, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 158-168, 2006.

JÄHNE, B.; HEINZ, G.; DIETRICH, W. Measurement of the diffusion coefficients of sparingly soluble gases in water. **Journal of Geophysical Research Oceans**, v. 92, p. 10767–10776, 1987.

JÄHNE, B.; HEINZ, G.; DIETRICH, W. Measurement of the diffusion coefficients of sparingly soluble gases in water. *Journal of Geophysical Research Oceans* 92 (C10), 10767–10776, 1987.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**. V. 68, p. 603-610. 2004.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Solubility of carbon dioxide in fat and muscle tissue. **Journal of Muscle Foods**. v. 17, p. 9-19, 2006.

JAKOBSEN, M.; JENSEN, P. N.; RISBO, J. Assessment of carbon dioxide solubility coefficients for semihard cheeses: the effect of temperature and fat content. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 287–294, 2009.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. *Journal of food engineering*. 92 (2009) 285–290.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. ArtMed, Porto Alegre, 6^a ed., p.51-72, 2005.

JURIC, M.; BERTELSEN, G.; MORTENSEN, G.; PETERSEN, M. A. *Light*-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 239–249, 2003.

KHOSHGOZARAN, S.; AZIZI, M. H.; FALLAH, N. B. Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 92, p. 1–24, 2012.

KOCH, J., DWORAK, R.; PRAGER, R., BECKER, B.; BROCKMANN, S.; WICKE, A.; WICHMANN-SCHAUER, H.; HOF, H.; WERBER, D.; STARK, K. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007. **Foodborne Pathogens and Disease**. 7, p. 1581–1584, 2010.

KOSIKOWSKI, F. V.; BROWN, D. P. Influence of carbon dioxide and nitrogen on microbial populations and shelf life of cottage cheese and sour cream. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p. 12–18, 1973.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – A review. **Food Microbiology**, v. 8, p. 267–297, 1991.

LEWIS, E. L. V.; DUCKETTA, R. A.; WARDA, I. M.; FAIRCLOUGH, J. P. A.; RYAN, A. J. The barrier properties of polyethylene terephthalate to mixtures of oxygen, carbon dioxide and nitrogen. **Polymer**, v. 44, p. 1631-1640, 2003.

LIMA, M. **APLICAÇÃO DO CO₂ PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE MEXILHÃO Perna perna (L) e Mytilus edulis: PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA**. Florianópolis, SC, 2014. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

LIN, H. M.; YANG, Z. Y.; CHEN, L. F. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, v. 52, p. 29-34, 1993.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção de queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios**. Piracicaba, SP, 2005. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

LONGHI, D. A. **Avaliação Da Capacidade Preditiva De Diferentes Modelos Matemáticos Para O Crescimento Microbiano Em Condições Não-Isotérmicas**. Florianópolis, SC, 2012. Dissertação de mestrado. Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. Use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. **Dairy Processing**. *Cornell University, USA*. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH England. v. 1, p. 391-410, 2003.

LUCERA, A.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; ZAMBRINI, A. B.; FACCIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. **Food packaging and shelf life**, v. I, p. 25-29, 2014.

LUCEY, J. A., GORRY, C., O'KENNEDY, B., KALAB, M., TANKIN, R. e FOX, P. F. Effect of Acidification and Neutralization of Milk on Some Physicochemical Properties of Casein Micelles. **International Dairy Journal**. v. 6, p. 257-272. 1996.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. M.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO₂ Addition to Milk on Selected Analytical

Testing Methods. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p.1959–1968, 2001.

MAGALHÃES, R.; ALMEIDA, G.; FERREIRA, V.; SANTOS, I.; SILVA, J.; MENDES, M. M.; PITA, J.; MARIANO, G.; MÂNCIO, I.; SOUSA, M. M.; FARBER, J.; PAGOTTO, F.; TEIXEIRA, T. Cheese-Related Listeriosis Outbreak, Portugal, March 2009 To February 2012. , **Eurosurveillance**, v. 20, (17), 2015.

MANIAR, A. B.; MARCY, J. E.; BISHOP, J. R.; DUNCAN, S. E. Modified atmosphere packaging to maintain direct set Cottage cheese. **Journal of Food Science**. v. 59, p. 1305-1308, 1994.

MANNHEIM, C. H.; SOFFER, T. Shelf-life extension of Cottage cheese by modified atmosphere packaging. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technol*, v. 29(8), p. 767–771, 1996.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.

MARTIN, N. H.; MURPHY, R. D.; RALYEA, R. D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3176–3183, 2011.

McCARNEY, T.; MULLAN, W. M. A.; ROWE, M. T. Effect of carbonation of milk on Cheddar cheese yield and quality. **Milchwissenschaft**. v. 50, p. 670– 674. 1995.

McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling Microbial Responses In Food**. CRC Press. USA. 343p. 2003.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of Food Microbiology*, v. 92, p. 15–33, 2004.

McSWEENEY, P. L. H. **Cheese problems solved**. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge CB21 6AH, England. 402p. 2007.

MENDES, R.; PESTANA, C.; GONÇALVES, A. The effects of soluble gas stabilisation on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2000–2009, 2008.

MENDES, R.; SILVA, H. A.; ANACLETO, P.; CARDOSO, C. Effect of CO₂ dissolution on the shelf life of ready-to-eat Octopus vulgaris. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 551–561, 2011.

MEREDITH, H.; VALDRAMIDIS, V.; ROTABAKK, B. T.; SIVERTSVIK, M.; MCDOWELL, D.; Bolton, D. J. Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on Campylobacter and the shelf-life of chilled poultry fillets. **Food Microbiology**, p. 44, v. 196-203, 2014.

MITZ, M.A. CO₂ Biodynamics: a new concept of cellular control. **Journal of Theoretical Biology**, v. 80, p. 537–551, 1979.

MOIR, C. J.; EYLES, M. J.; DAVEY, J. A. Inhibition of *Pseudomonads* in cottage cheese by packaging in atmospheres containing carbon dioxide. **Food Microbiology**, v. 10, p. 345 -351, 1993.

MORALES, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; NUÑEZ, M. Volatile compounds produced in cheese by *Pseudomonas* strains of dairy origin belonging to six different species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6835-6843, 2005.

MOURA, C.J. **Efeito do resfriamento do leite sobre o rendimento e lipólise do queijo tipo parmesão**. Lavras, 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

NEHLAWI, A.; SALDO, J.; VEGA, L. F.; GURI, S. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks. *Meat Science*, v. 94, n. 1, p. 1-8, 2013.

NICOLOFF, H.; ELAGOZ, A.; ARSENE-PLOETZE, F.; KAMMERER, B.; MARTINUSSEN, J.; BRINGEL, F. Repression of the pyr operon in *Lactobacillus plantarum* prevents its ability to grow at low carbon dioxide levels. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2093–2104. 2005.

OLARTE, C.; GONZÁLEZ-FANDOS, M.; IMÉNEZ, M.; SANZ, S.; PORTU, J. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-82, 2002.

PAULA J. C. J.; VIDIGAL M. C. T. R.; CARVALHO A. F.; COSTA R. G. B.; MINIM L. A. Efeito Do Uso De Dióxido De Carbono (CO₂) Nas Propriedades Reológicas Do Queijo Minas Frescal. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, nº 382, v.66, p. 34-41, 2011.

PAULA J. C. J.; CARVALHO A. F.; MACHADO J. M.; SOBRAL D.; TEODORO V. A. M.; COSTA JUNIOR L. C. Efeito Do Uso De Dióxido De Carbono (CO₂) Na Microestrutura Dos Queijos Minas Frescal E Minas Padrão. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, nº 383, v. 66, p. 13-19, 2011.

PAULA, J. C. J. **Efeito do uso de dióxido de carbono (co₂) na Fabricação de queijos minas frescal e minas padrão**. Viçosa, MG. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

PERGIOVANNI, L., FAVA, P. MORO, M. Shelf life extension of Taleggio cheese by modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Science**, v. 5, p. 115-119, 1993.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; GABORIT, P.; LAURET, A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. **Small Ruminant Research**, v. 60, n. 1-2, p. 167-177, 2005.

ROBERTS, R. F.; TORREY, G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 52-60, 1988.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; JEKSRUD, W.; SIVERTSVIK, M. Effect of modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization on the shelf life of skinless chicken breast fillets. **Journal of Food Science**, v. 71(2), p. 124-131, 2006.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

ROTABAKK, B.T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

ROTABAKK, B.T.; WYLLER, J.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in

modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B.T.; LEKANG, O. I; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 43-50, 2007.

RUAS-MADIEDO, P.; ALONSO, L.; DELGADO, T.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G.; Manufacture of Spanish hard cheeses from CO₂ treated milk. **Food Research International**, v. 35, p. 681-690, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; ALONSO, L.; REYESGAVILÁN, C. G.; Afuega l Pitu cheese quality: carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. **International Dairy Journal**. n. 8, p. 951-958. 1998a

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; GONZALEZ DE LLANO, D.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 502-508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A.F.; BADA-GANCEDO, J.C.; REYES-GAVILÁN, C.G. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1552-1555, 1998.

SANDINE, W.E. AND ELLIKER, P.R. Microbiologically induced flavors and fermented Foods. Flavor in fermented dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 557-562, 1970.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz ESALQ/USP. Piracicaba - SÃO PAULO. 80 p, 2007.

SARAIVA, C.; FONTES, M.C.; PATARATA, L.; MARTINS, C.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON., U. Modelling the kinetics of *Listeria monocytogenes* in refrigerated fresh beef under different

packaging atmospheres. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 664-761, 2016.

SIERRA, I.; PRODANOV, M.; CALVO, M.; OLANO, A.; VIDAL-VALVERDE, C. Vitamins stability and growth of psychrotropic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1305–1310, 1996.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO₂ in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of food Engineering**, v. 92, p. 233-239, 2009.

SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; ACEVEDO, C. Development of a Mathematical Model for MAP Systems Applied to Non-respiring Foods. **Journal of Food Science**, v. 66 (4), p. 561-567, 2001a.

SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; ACEVEDO, C. Mass Transfer In Pacific Hake (*Merluccius Australis*) Packed In Refrigerated Modified Atmosphere. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24, p. 405-421, 2001b.

SIRACUSA, V. Food Packaging Permeability Behaviour: A Report. **International Journal of Polymer Science**. v, 2012, p. 1 - 12, 2012.

SIVERTSVIK, M.; BIKERLAND, S. Effects of soluble gas stabilization, modified atmosphere, gas to product volume ratio and storage on the microbiological and sensory characteristics of ready-to-eat shrimp. **Food Science and Technology International**, v. 12(5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004a.

SIVERTSVIK, M.; JENSEN, J. S. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 3: Cooked meat products. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 499-505, 2005.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 451-458, 2004b.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 451-458, 2004b.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled stored on the microbial and sensory quality of atlantic salmon (*Salmosalar*) fillets. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1467-1472, 2003.

SOARES, L. S. **Pré-Solubilização De CO₂ Em Ostras (*Crassostrea Gigas*): Avaliação Do Processo De Absorção E Dessorção Do Gás No Produto**. Florianópolis, SC, 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, n. 2, p. 35- 40, 1997.

TENENHAUS-AZIZA, F., ELLOUZE, M., *Software* for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 *Software Fair*, *Food Microbiology* (2014), doi: 10.1016/j.fm.2014.06.026.

TUNICK, M. H. MALIN, E. L. 1997. Differential Scanning Calorimetry of Water Buffalo and Cow Milk Fat in Mozzarella Cheese. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 2575 – 1578, 1997.

VIANNA, P. C. e GIGANTE M. L. Qualidade Microbiológica e Físico-Química do Leite Cru Refrigerado Adicionado de Dióxido de Carbono. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, nº 375, v. 65, p. 51:59, 2010.

WARRINER, K., NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? *Trends Food Science Technology*. v. 20, p. 245–254, 2009.

WEI, C.I.; BALABAN, M.O.; FERNANDO, S.Y.; PEPLOW, A.J. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with Listeria or Salmonella. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 189–193, 1991.

WOLFE, S. H. Use of CO₂ and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish, and produce. *Food Technology*, v. 29, p. 55–58, 1980.

YEPES, M. J. M.; LOPEZ, O. A.; ORTEGA, J. C.; INIESTA, F. M. Inhibition of *listeria monocytogenes* and other bacteria in spanish soft

cheese made with *Lactococcus lactis* subsp. *Diacetylactis*. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 161-170, 1999.

ZWIETERING, M.; ROMBOUTS, F.; VANT RIET, K. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 139-145, 1992.