

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

# **Estudo do perfil químico de queijos tipo mozzarella em diferentes condições de refrigeração por RMN**

MESTRANDA: FLÁVIA CARNEIRO GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ HENRIQUE KENG QUEIROZ JÚNIOR

Goiânia, 2015

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Flávia Carneiro Gonçalves		
E-mail:	flavia.c.g.quimica@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Estudo do perfil químico de queijos tipo mozzarella em diferentes condições de refrigeração por RMN		
Palavras-chave:	Refrigeração de alimentos, Queijo mozzarella, RMN, HR-MAS, PCA.		
Título em outra língua:	Study of mozzarella cheese chemical profile in different cooling conditions by NMR		
Palavras-chave em outra língua:	Food cooling, Mozzarella cheese, NMR, HR-MAS, PCA.		
Área de concentração:	Química		
Data defesa: (30/07/2015)			
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Química		
Orientador (a):	Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior		
E-mail:	professorkeng@gmail.com		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

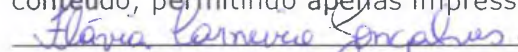
\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


  
 Assinatura do(a) autor (a)

Data: 28 / 10 / 15

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

# **Estudo do perfil químico de queijos tipo mozzarella em diferentes condições de refrigeração por RMN**

FLÁVIA CARNEIRO GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química do Curso de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior.

Goiânia, 2015.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Carneiro Gonçalves, Flávia

Estudo do perfil químico de queijos tipo mozzarella em diferentes condições de refrigeração por RMN [manuscrito] / Flávia Carneiro Gonçalves. - 2015.

XVII, 117 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Refrigeração de alimentos. 2. Queijo mozzarella. 3. RMN. 4. HR MAS. 5. PCA. I. Henrique Keng Queiroz Júnior, Luiz, orient. II. Título.

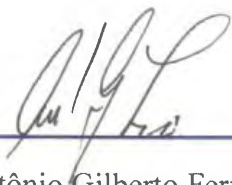
## Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pela discente Flávia Carneiro Gonçalves, em 30/07/2015:



---

Prof. Dr. Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior (UFG)



---

Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (UFSCar)



---

Prof. Dr. Luciano Morais Lião (UFG)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar minha trajetória, permitindo que o universo conspire para o meu crescimento pessoal.

Aos meus pais, Luiz e Luércia, por me ensinarem, principalmente, o amor ao próximo e a valorizar a simplicidade da vida.

Aos meus irmãos, João Paulo e Camilla, pelo apoio e carinho de sempre. E claro, à minha irmã de coração Thais Priscila, por toda força e amizade sincera.

Ao meu companheiro, Jonney Abreu, pelo carinho, cuidado, compreensão e amizade que jamais esquecerei.

Aos demais familiares que, embora não tenha linhas e palavras para expressar meu sincero agradecimento a cada um da maneira que merecem, ressalto meu imenso carinho e gratidão a todos. Agradeço em especial aos meus avós, Lurdivina e João, pela inspiração de que o aprendizado não tem lugar, espaço, condição ou tempo. E também a minha querida tia Ilma, que desde a minha infância foi meu espelho e incentivo nessa jornada de estudos que levarei por toda a vida.

Aos amigos, nos quais tenho a felicidade de aqui listar, pois com vocês aprendi que quem tem amigo, tem tudo! Muito obrigada Edna Sheron, Monah, Layla, Márlon, Nyuara, Thiago Miguel, Uaitã, Karol, Andressa e Tarcisio. Sou profundamente grata por terem me direcionado palavras amigas que auxiliaram no desenvolvimento dessa pesquisa, além de todo apoio nos momentos difíceis. Agradeço em especial ao Tarcisio Vieira, pois com sua diretriz, pude ter conhecimento da dimensão que é realizar uma pesquisa científica em química aplicada, muito obrigada por todo auxílio em todos os quesitos.

Aos colegas de laboratório, por compartilharem suas experiências, e pela companhia em situações diversas que nos fizeram crescer juntos.

Ao coordenador do Laboratório, Prof. Dr. Luciano Lião, por muito me ensinar sobre as relações humanas e profissionais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Keng, pela oportunidade de ingressar nessa jornada que me proporcionou aprendizados muito enriquecedores, tanto no quesito profissional quanto pessoal.

E a todos que, direta ou indiretamente, acompanharam e auxiliaram minha trajetória na realização desta pesquisa.

## RESUMO

Neste estudo vislumbrou-se avaliar a o efeito da condição de refrigeração noturna inadequada, praticada por alguns estabelecimentos comerciais, no perfil químico dos queijos tipo processados sabor mozzarella e tipo mozzarella convencional, fazendo uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A simulação da refrigeração inadequada foi realizada utilizando-se uma caixa de isopor contendo gelo, sem tampa, deixando o sistema atingir o equilíbrio térmico com o ambiente no decorrer da noite. Para os estudos com o queijo tipo mozzarella processado adquiriu-se dois pacotes, pertencentes a um mesmo lote, no comércio local. Submetendo-se os dados espectrais, advindos das análises fazendo uso da sonda HR-MAS, ao tratamento quimiométrico, observa-se uma tendência de discriminação das amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração, sendo que os sinais referentes a lactose e de alguns ácidos graxos tiveram maior influencia na separação observada. Já para o queijo tipo mozzarella convencional, além dos estudos de RMN, realizou-se também estudos de características físico-químicas. Para isso, foram adquiridas no comércio local vinte e duas bandejas contendo queijo fatiado, as quais foram divididas em dois conjuntos com onze bandejas cada. Foram realizadas análises da amostra *in natura*, fazendo uso da sonda HR-MAS, e do extrato bruto, fazendo uso da sonda TBI. A identificação de metabólitos foi feita a partir dos experimentos HSQC, *J*-resolved e RMN de  $^1\text{H}$ , sendo este último utilizado também na quantificação relativa de doze metabólitos. Para o queijo tipo mozzarella mantido sob condições inadequadas de refrigeração observou-se uma redução no teor de galactose e aumento no teor de aminoácidos e ácidos orgânicos. As análises físico-químicas de pH, gordura total e proteína total não mostraram diferenças significativas que pudessem ser correlacionadas com as diferentes condições de refrigeração das amostras. Nesse sentido, conclui-se que a técnica de RMN e ferramentas quimiométricas mostraram-se promissoras na identificação das amostras de queijo submetidas às diferentes condições de refrigeração estudadas, o que não pôde ser feito utilizando-se os parâmetros físico-químicos rotineiramente empregados em análises da qualidade de queijos.

**Palavras-Chave:** *Refrigeração de alimentos, Queijo mozzarella, RMN, HR-MAS, PCA.*

## ABSTRACT

This study objectives to evaluate the effect of an inappropriate night cooling condition, it is practiced by some shops with processed mozzarella cheese and conventional mozzarella chemical profiles, using nuclear magnetic resonance technique (NMR). The simulation of inappropriate cooling was performed using a Styrofoam box with ice, not covered, and leaving the system to reach thermal equilibrium with the ambient temperature during the night. To make studies with processed mozzarella cheese was acquired two packages of the same batch, at local shops. Subjecting the spectral data, coming from the analysis made with HR-MAS, in the chemometric treatment was observed a tendency of discrimination in the samples exposed to different cooling conditions, and signals concerning lactose and some of fatty acids had greater influence in the observed separation. For the mozzarella cheese, in addition to NMR studies, it was also performed physical and chemical characteristics studies. For these studies, it has been acquired twenty-two trays containing sliced cheese, in the local market, which were divided into two sets with eleven trays each. Samples were analyzed *in nature*, using HR-MAS probe, and the crude extract using TBI probe. The identification of metabolites was done from the HSQC experiments, J-resolved and NMR  $^1\text{H}$ , the last one being also used in the relative quantification of twelve metabolites. For the mozzarella cheese maintained under improper cooling conditions, there was a reduction in the galactose content and an increasing of amino acids and organic acids contents. The physicochemical analysis of pH, saturated fat and protein showed no significant differences that could be correlated with the different conditions of sample cooling. Finally, it has been concluded that NMR technique and chemometric tools are promising in identify the cheese samples submitted to different cooling conditions that has been studied, which could not be done using the physical and chemical parameters commonly used in cheese quality analysis.

**Key Words:** *Food Colling, Mozzarella cheese, NMR, HR-MAS, PCA.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Coagulação realizada por acidificação direta. ....	<b>23</b>
<b>Figura 2.</b> Adição do coalho ao leite acidificado. ....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Corte da coalhada utilizando uma lira. ....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Agitação da coalhada. ....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Dessoramento utilizando uma forma com furos de modo a escoar o soro em excesso. ....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Processo de salga a seco (adição de cloreto de sódio na superfície). ....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Queijo tipo mozzarella processado utilizado no estudo inicial. Embalagem comercial e fatias que compõem a embalagem. ....	<b>42</b>
<b>Figura 8.</b> Aferição da temperatura média dentro da geladeira e da caixa de isopor. ....	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b> Queijo tipo mozzarella convencional. Embalagem comercial e fatias que compõem a bandeja. ....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Peças que compõem o rotor: tampa, espaçador, parafuso selante e rotor de zircônio de 50 $\mu$ L. Ferramentas para seu empacotamento: removedor da tampa, funil, ajustador do espaçador, parafuso, chave de fenda e espátula. ....	<b>44</b>
<b>Figura 11.</b> Etapas do processo de extração. Após ultrassom, separação das fases após a primeira centrifugação, e extrato bruto após a centrifugação da fase intermediária. ....	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ do queijo tipo mozzarella processado fazendo uso da sonda HR-MAS e utilizando as sequências de pulso cpmgpr1d, noesypr1d e zg30. ....	<b>55</b>
<b>Figura 13.</b> Espectros do queijo tipo mozzarella utilizando clorofórmio-d, acetonitrila-d <sub>3</sub> , metanol-d <sub>4</sub> e D <sub>2</sub> O. ....	<b>57</b>
<b>Figura 14.</b> Espectros obtidos para a estimativa de $T_1$ . ....	<b>58</b>

<b>Figura 15.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ do queijo tipo mozzarella convencional somente em $\text{D}_2\text{O}$ e com a adição do $\text{TMSP-d}_4$ . .....	<b>61</b>
<b>Figura 16.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ com a supressão da água, e com dupla supressão da água e dos sinais de $\text{CH}_2$ de ácido graxo. Ambos foram obtidos por meio da sequência noesypr1d e encontram-se na mesma escala. ....	<b>62</b>
<b>Figura 17.</b> Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ (HSQC) para as atribuições dos ácidos graxos presente no queijo tipo mozzarella processado. ....	<b>67</b>
<b>Figura 18.</b> Principais constituintes do queijo tipo mozzarella processado. ....	<b>68</b>
<b>Figura 19.</b> Destaques do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do queijo analisado. ....	<b>69</b>
<b>Figura 20.</b> Gráfico de scores, PC1 x PC2, dos dados referentes a todas as regiões espectrais dos espectros deconvoluídos. ....	<b>70</b>
<b>Figura 21.</b> Gráfico dos loadings de toda região espectral. ....	<b>72</b>
<b>Figura 22.</b> Gráfico de scores, PC1 x PC2, referente aos sinais da lactose entre 3,58 a 3,54 ppm, $\alpha$ e $\beta$ carboxílicos de ácido graxo e $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$ de ácidos graxos. ....	<b>73</b>
<b>Figura 23.</b> Gráficos de scores dos espectros deconvoluídos e não deconvoluídos. ....	<b>76</b>
<b>Figura 24.</b> Gráficos da variância explicada dos dados correspondentes aos espectros deconvoluídos e não deconvoluídos. ....	<b>77</b>
<b>Figura 25.</b> Espectros da variação do perfil químico das amostras submetidas à refrigeração inadequada fazendo uso da sonda HR-MAS. ....	<b>82</b>
<b>Figura 26.</b> Espectros da variação do perfil químico das amostras submetidas à refrigeração inadequada fazendo uso da sonda TBI. ....	<b>83</b>
<b>Figura 27.</b> Percentuais dos níveis de galactose durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>85</b>
<b>Figura 28.</b> Percentuais dos níveis de etanol durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11 <sup>a</sup> semana. ....	<b>87</b>

<b>Figura 29.</b> Percentuais dos níveis de acetato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>88</b>
<b>Figura 30.</b> Percentuais dos níveis de formiato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>89</b>
<b>Figura 31.</b> Percentuais dos níveis de butirato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11ª semana. ....	<b>91</b>
<b>Figura 32.</b> Percentuais dos níveis de citrato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>93</b>
<b>Figura 33.</b> Percentuais dos níveis de succinato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>95</b>
<b>Figura 34.</b> Percentuais dos níveis de fenilalanina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>97</b>
<b>Figura 35.</b> Percentuais dos níveis de tirosina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>97</b>
<b>Figura 36.</b> Percentuais dos níveis de lisina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11ª semana. ....	<b>98</b>
<b>Figura 37.</b> Percentuais dos níveis de valina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>98</b>
<b>Figura 38.</b> Percentuais dos níveis de glutamato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. ....	<b>99</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Origem e classificação dos principais tipos de queijos de acordo com o teor de umidade e microrganismos utilizados na maturação. ....	<b>27</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores do potencial hidrogeniônico, gordura total e proteína total presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceu na refrigeração adequada. ....	<b>63</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores do potencial hidrogeniônico, gordura total e proteína total presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram fora da refrigeração adequada durante as noites. ....	<b>64</b>
<b>Tabela 4.</b> Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ , valores de acoplamento e multiplicidade de alguns compostos presentes no queijo tipo mozzarella processado. ....	<b>65</b>
<b>Tabela 5.</b> Deslocamento químico de $^1\text{H}$ com seus valores de acoplamento e multiplicidade, deslocamento químico de $^{13}\text{C}$ , e o intervalo das semanas em que um dos sinais começaram a ser observados nas análises via TBI e via HR-MAS. ....	<b>79</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores das áreas das triplicatas, médias e desvio padrão dos sinais de succinato, relativos à área do $\text{TMSP-d}_4 = 1$ , e os teores de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram na refrigeração adequada durante as noites. ....	<b>105</b>
<b>Tabela 7.</b> Valores das áreas das triplicatas, médias e desvio padrão dos sinais de succinato, relativos à área do $\text{TMSP-d}_4 = 1$ , e os teores de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram fora da refrigeração adequada durante as noites. ....	<b>105</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPA	Centro de Pesquisa em Alimentos
CPMG	<i>Carr - Purcel - Meiboom – Gill</i>
cpmgpr1d	experimento CPMG para a supressão do sinal do solvente (na nomenclatura usada pela Bruker)
DA	<i>Discriminant Analysis</i>
DQD	<i>Digital Quadrature Detection</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERETIC	Electronic REference To access In Vivo Concentrations
EVZ – UFG	Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FIL	Federação Internacional de Laticínios
GC/TOF-MS	<i>Gas Chromatography / Time Of Flight - Mass Spectrometry</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
HMDB	<i>The Human Metabolome Database</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IV	Infra Vermelho

<i>J-Res</i>	<i>J-Resolved</i>
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIR-DR	<i>Near Infrared Diffuse Reflection</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
noesypr1d	experimento NOESY para a supressão do sinal do solvente (na nomenclatura usada pela Bruker)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Principal Component Regression</i>
PCs	<i>Principal Components</i>
PDO	<i>Protected Designation of Origin</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
t1ir1d	Estimativa de T <sub>1</sub> usando inversão recuperação (na nomenclatura usada pela Bruker)
TBI	<i>Triple resonance Broadband Inverse probe</i>
TF	Transformada de Fourier
TMSP-d <sub>4</sub>	Trimetilsililpropionato de sódio
zg30	Sequência de pulso único de 30° (na nomenclatura usada pela Bruker)

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^1\text{H}$	isótopo de Hidrogênio 1
$^{13}\text{C}$	isótopo de Carbono 13
$^{31}\text{P}$	isótopo de Fósforo 31
$^{79}\text{Br}$	isótopo de Bromo 79
$\alpha$	estado de menor energia
$\beta$	estado de maior energia
$\delta$	Deslocamento químico
$\theta$	ângulo
aq	Tempo de aquisição
$B_0$	Campo magnético principal
$d_1$	Tempo de espera (na nomenclatura usada pela Bruker)
$d_{20}$	tempo de eco fixado para a eliminação dos efeitos de acoplamento (na nomenclatura usada pela Bruker)
$d_8$	<i>mixing time</i> (na nomenclatura usada pela Bruker)
F1	dimensão de domínio indireto (na nomenclatura usada pela Bruker)
F2	dimensão de domínio direto (na nomenclatura usada pela Bruker)
$J$	Constante de acoplamento
$l_4$	<i>loop</i> para o filtro do decaimento de $T_2$ (na nomenclatura usada pela Bruker)
lb	<i>line broadening</i> (na nomenclatura usada pela Bruker)

m	multiplete
o1p	frequência central do pulso no canal de $^1\text{H}$ (na nomenclatura usada pela Bruker)
o2p	frequência central do pulso no canal do $^{13}\text{C}$ (na nomenclatura usada pela Bruker)
pH	potencial Hidrogeniônico
p <sub>1</sub>	Duração do pulso de $90^\circ$ (na nomenclatura usada pela Bruker)
T <sub>1</sub>	constante de relaxação longitudinal
T <sub>2</sub>	constante de relaxação transversal
TD	Número de pontos de dados do espectro (na nomenclatura usada pela Bruker)
rg	ganho do receptor (na nomenclatura usada pela Bruker)

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos.</b> .....	<b>iv</b>
<b>Resumo.</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract.</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras.</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de esquemas e tabelas.</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas.</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de símbolos.</b> .....	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. Introdução.</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Histórico.</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Produção e consumo de queijos.</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Processos gerais para a elaboração de queijos.</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4 Definições de queijo e suas classificações.</b> .....	<b>26</b>
<b>1.5 Queijo e metabolômica.</b> .....	<b>29</b>
<b>1.6 RMN na análise de queijos.</b> .....	<b>32</b>
<b>1.7 Pesquisas envolvendo queijo e RMN.</b> .....	<b>35</b>
<b>1.8 Análise de Componentes Principais como método multivariado.</b> .....	<b>37</b>
<b>1.9 RMN na análise do perfil químico de queijos em diferentes condições de refrigeração.</b> .....	<b>38</b>

## CAPÍTULO 2

<b>2. Objetivos.</b> .....	<b>40</b>
2.1 Objetivo geral. ....	40
2.2 Objetivos específicos. ....	40

## CAPÍTULO 3

<b>3. Materiais e Métodos.</b> .....	<b>41</b>
3.1 Acondicionamento das amostras. ....	41
3.2 Amostras. ....	41
3.2.1 Queijo tipo mozzarella processado. ....	41
3.2.2 Queijo tipo mozzarella convencional. ....	43
3.3 Preparo de amostras para análises de RMN. ....	43
3.4 Preparo de amostras para as análises Físico-Químicas. ....	46
3.5 Experimentos de RMN. ....	47
3.5.1 Análises de RMN de $^1\text{H}$ . ....	48
3.5.1.1 Queijo tipo mozzarella processado. ....	48
3.5.1.2 Queijo tipo mozzarella convencional. ....	48
3.5.2 <i>J</i> -Resolved. ....	49
3.5.3 HSQC ( <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> ). ....	50
3.5.3.1 Queijo tipo mozzarella processado. ....	50
3.5.3.2 Queijo tipo mozzarella convencional. ....	50
3.6 Análises de Componentes Principais. ....	51

## **CAPÍTULO 4**

<b>4. Resultados e Discussão.</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1</b> Otimização das condições experimentais. ....	<b>53</b>
<b>4.1.1</b> Escolha da sequência de pulso. ....	<b>53</b>
<b>4.1.2</b> Otimização do tempo de intumescimento, massa da amostra e velocidade de giro para as análises via HR-MAS. ....	<b>56</b>
<b>4.1.3</b> Escolha do solvente. ....	<b>56</b>
<b>4.1.4</b> Determinação de $T_1$ , $\rho_1$ e otimização do número de varreduras. ....	<b>57</b>
<b>4.1.5</b> Escolha do padrão interno para quantificação. ....	<b>60</b>
<b>4.2</b> Análises Físico-Químicas. ....	<b>62</b>
<b>4.3</b> Atribuição dos sinais de RMN do queijo tipo mozzarella processado. ....	<b>64</b>
<b>4.4</b> Análise quimiométrica dos dados de RMN do queijo tipo mozzarella processado. ....	<b>70</b>
<b>4.5</b> Atribuição dos sinais de RMN do queijo tipo mozzarella convencional. ....	<b>78</b>
<b>4.6</b> Quantificação relativa de substâncias presentes no queijo tipo mozzarella convencional. ....	<b>84</b>
<b>4.7</b> Quantificação absoluta de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional .....	<b>104</b>

## **CAPÍTULO 5**

<b>5. Conclusão.</b> .....	<b>107</b>
----------------------------	------------

## **CAPÍTULO 6**

<b>6. Referências Bibliográficas.</b> .....	<b>109</b>
---	------------

## **CAPÍTULO 1**

### **1. INTRODUÇÃO**

#### **1.1 Histórico**

As origens da produção de queijos não são conhecidas com exatidão, no entanto, há evidências de que sua produção tenha se iniciado há cerca de 8000 anos, às margens dos rios Tigre e Eufrates. A presença desse alimento nas tumbas egípcias, particularmente na descoberta da tumba intacta de Tutankamón, datada de 1500 a.C., além de referências no Antigo Testamento e registros gregos, reforçam essa hipótese (PEREDA *et al.*, 2005).

Alguns desses registros relatam a observação de que, ao armazenar o leite em recipientes feitos por pele de animais, estômago ou bexigas de ruminantes, a coagulação ocorria rapidamente devido ao aquecimento e acidificação do leite. O soro era então eliminado, e a coalhada era seca de modo a formar uma pasta firme que podia ser consumida fresca e armazenada por vários dias. Tais relatos sobre as tribos nômades dos países ao leste do mediterrâneo podem ter sido um dos primeiros indícios de produção de queijo (ROBINSON, 1987). Ao se comprovar que o extrato presente no estômago de ruminantes era um dos principais componentes responsáveis pela produção do coalho, a fabricação do queijo passou a ser realizada de forma sistematizada (PEREDA *et al.*, 2005).

Nesse contexto, as antigas civilizações começaram então a difundir o processo de fabricação de queijos, pois além das características sensoriais serem muito apreciáveis, tratava-se de um alimento que poderia ser armazenado por meses. A civilização do Império Romano, por exemplo, possuía uma tecnologia razoável desse alimento, de modo que os processos detalhados da produção de queijo foram encontrados em escritos da época (PEREDA *et al.*, 2005).

Até o fim do século XVIII, a ciência da fabricação de queijos era restrita basicamente aos fazendeiros e monges. Esse conhecimento era passado pela convivência, o que ocasionou erros de interpretação e, conseqüentemente, deu-se origem a diversos tipos de queijos. Os mosteiros começaram então a difundir a prática por documentos escritos, e somente no fim do século XVIII foi

iniciado o estudo científico da fabricação de queijos (KINDSTEDT, 2012). Não diferente de há pouco tempo atrás, a fabricação de queijo era feita de forma artesanal. Somente a partir dos estudos dos fenômenos microbiológicos e bioquímicos, foi possível a produção desse alimento em grande escala (PEREDA *et al.*, 2005).

Diversas formas de fabricação de queijo foram desenvolvidas em diferentes países e em regiões distintas de um mesmo país, dependendo das demandas comerciais e experiência de cada região. Um exemplo desta variação se dá pela forma de produção do coalho, que além de ter sido obtido por meio do extrato do estômago de ruminantes jovens, como bezerros, cabritos ou cordeiros, poderia também ser produzido pelo leite de figueira ou por flores do tipo Cardo (do gênero *Cynara*). Esta, dentre outras variações do processo de fabricação desse alimento, foram precursoras dos tipos de queijo conhecidos atualmente (ROBINSON, 1987).

O queijo mozzarella, por exemplo, de origem italiana, era fabricado exclusivamente utilizando leite de búfala. Atualmente é um dos tipos de queijos mais produzidos em todo o mundo, com diversificadas adaptações nos processos de fabricação, como o tipo de leite utilizado. Esse produto pertence a um grupo de queijos denominado *pasta-filata*, termo derivado de uma frase italiana que significa “massa-esticada”, sendo esta a característica comum desses tipos de queijos (FOX *et al.*, 2004). A origem dessa variedade deu-se ao norte do mediterrâneo, em meados do século XV (TUNICK, 2014), caracterizando-se também por serem consumidos frescos ou após um breve período de maturação.

Registros apontam que queijos como o gorgonzola, de nome oriundo da cidade italiana Gorgonzola precursora da sua fabricação, apontam que a fabricação do mesmo tenha se iniciado em meados de 879 d. C., que segundo a lenda da região, deu-se pela adição acidental de leite fresco ao leite coagulado do dia anterior, promovendo a formação de gases e mofos que seriam responsáveis pela formação do molde verde no centro do queijo. Mais tarde, foi possível identificar que o molde verde é característico da atuação do fungo *Penicillium Roqueforti*, que aliado ao processo de fabricação, atribui características sensoriais bastante peculiares dessa variedade (TUNICK, 2014).

Da mesma forma, o queijo Parmesão é uma das variedades mais antigas conhecidas e de alto prestígio. Sua origem deriva do queijo tipo Parmigiano-Reggiano, um queijo granulado de origem Italiana das províncias de Parma e Reggio Emilia. A forma de fabricação desses dois tipos de queijos são muito semelhantes, de modo que tal queijo produzido fora de tais províncias passou a ser chamado de Parmesão. A diferença básica entre eles é que o cultivo iniciador do queijo Parmigiano-Reggiano é o soro de leite coalhado um dia antes de seu preparo, e no queijo Parmesão, são utilizados cultivos iniciadores comerciais. Essas variedades possuem diversificados compostos aromatizantes que evoluem devido a um longo período de maturação. Após quatorze meses de envelhecimento eles podem ser granulados, porém, o queijo Parmesão é comumente comercializado na sua forma inteira (TUNICK, 2014).

Nesse contexto, nestas e em outras variedades de queijo, é fundamental levar em conta aspectos como a qualidade da matéria prima utilizada, origem e processo histórico de cada tipo seja do mais simples ao mais sofisticado, condições higiênico-sanitárias, dentre outros que agregam valor ao produto. Uma análise mais aprofundada desse tipo de alimento é, então, considerada fundamental no âmbito econômico e comercial, pois está diretamente relacionado à qualidade do mesmo.

## **1.2 Produção e consumo de queijos**

A produção de queijo cresceu exponencialmente em todo o mundo, tornando-se uma das principais fontes comerciais e econômicas até os dias atuais. Leite e Loures (2005) nos mostram que, dentre os produtos lácteos que circulam no mercado internacional, o queijo se encontra em maior número referente à movimentação monetária. Dados mais recentes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) mostram que essa realidade não mudou, visto que os queijos representam 40% do valor total de exportação de produtos lácteos. No Brasil, cerca de 25% do leite produzido é destinado à produção de queijo, sendo considerado o alimento de maior consumo dentre os laticínios dentro e fora do país (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Segundo dados da Embrapa, o queijo mozzarella corresponde a 40% dos queijos mais consumidos no país, e na escala internacional, o Brasil encontra-se em sexto lugar como produtor mundial de queijos, estando os Estados Unidos em primeiro lugar nesse quadro (VIEIRA e LOURENÇO JR, 2006). O fato da sua produção se dar de forma mais simplificada, devido a não necessidade de maturação, além de o rendimento ser maior em relação aos outros queijos, faz com que o queijo mozzarella seja produzido e consumido em maior escala (SILVA *et al.*, 2002 *apud* VIEIRA E LOURENÇO JR, 2006).

A produção de queijo no mundo acabou por ser considerada uma arte, pois se tornou uma ciência necessária para a compreensão das características físico-químicas, sensoriais e bioquímicas relacionadas ao seu controle de qualidade. A evolução desse conhecimento perpassou desde os métodos de produção caseira até a manufatura, dos microrganismos utilizados na fabricação e maturação do queijo, dentre outros (FOX *et al.*, 2004). Nesse sentido, além dos órgãos de fiscalização nacionais, o mercado de importação e exportação criou critérios rigorosos quanto ao controle de qualidade desse alimento, pois, devido ao alto índice de microrganismos nocivos à saúde humana presentes em produtos de origem animal, fez-se necessário um controle que se trata basicamente da inspeção da higiene da fábrica e qualidade físico-química dos produtos (ROBINSON, 1987).

Segundo Câmara *et al.* (2002) *apud* Pinto *et al.* (2011), queijos com alto teor de umidade tendem a ser mais perecíveis, pois essa característica favorece a proliferação de microrganismos, e dependendo do grau de manipulação e das condições sanitárias no manuseio, a contaminação é favorecida, podendo conter no produto final bactérias patogênicas ou produção de metabólitos que causam complicações na saúde do consumidor. De acordo com Pinto *et al.* (2011), os principais microrganismos responsáveis por infecções e/ou intoxicações no ser humano, são os coliformes termotolerantes, *Staphylococcus spp.*, bolores e leveduras, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, microorganismos estes que, normalmente, se proliferam em maior extensão em tais condições.

Na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 216 de 15 de setembro de 2004, sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação, emitido pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são especificadas as condições em que cada tipo de alimento deve ser refrigerado. Dessa forma, levando em conta que práticas como desligar os aparelhos de refrigeração durante a noite, realizada por alguns estabelecimentos comerciais, afeta significativamente a qualidade dos produtos, podendo levar a complicações na saúde do consumidor, considera-se muito importante avaliar de que forma essa prática afeta o prazo de validade de queijos como o do tipo mozzarella.

### **1.3 Processos gerais para a elaboração de queijos**

Para a melhor compreensão do referente estudo, é importante se ter conhecimento do processo básico de produção desse alimento, tendo em vista que cada etapa descrita a seguir influencia diretamente na qualidade do tipo de queijo a ser produzido.

A grande variedade de queijos conhecidos são elaborados, basicamente, utilizando como matéria prima: leite, bactérias para a produção de ácido lático ou adição de ácidos, coagulantes e cloreto de sódio. As etapas básicas para a elaboração de queijos consistem na adição do cultivo iniciador, a formação da coalhada, o corte da coalhada, dessoragem, moldagem, e por fim, a salga (FOX *et al.*, 2004). A forma com que cada uma dessas etapas ocorre é determinante, pois são elas que irão definir o tipo de queijo a ser produzido. Além dessas etapas, os tipos de microrganismos utilizados e condições de maturação são outras variáveis determinantes no processo.

Com base nos estudos de Pereda *et al.* (2005) e Robinson (1987), tais etapas ocorrem, primeiramente, pela adição do cultivo iniciador, que é responsável pela produção de ácido lático por meio da adição de microrganismos conhecidos como bactérias do ácido lático. Quanto maior o tempo de ação desses agentes iniciadores, o queijo possuirá consistência mais mole, de modo que, na elaboração de queijos duros, esse tempo é reduzido.



**Figura 1.** Coagulação realizada por acidificação direta. Imagem disponível em: <<http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>> SECTES (2011)>.

Para essa finalidade, a acidificação pode ocorrer de duas formas: pela adição de microrganismos (cultura lática), como descrito, ou por adição direta de ácidos (Figura 1), como ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, dentre outros, com a finalidade de atingir o ponto isoelétrico das proteínas do leite, mais especificamente, das caseínas (MATTANA, 2011). A acidificação direta é mais utilizada na produção de queijos moles, como o *Cream Cheese* e o *Cottage*, já a cultura lática é utilizada na produção da grande maioria das variedades de queijos, pois contribui não somente na etapa de coagulação, mas também na formação do sabor e textura durante o processo de envelhecimento (TUNICK, 2014).

Na produção de variedades como mozzarella, é necessária a adição de enzimas coagulantes com a finalidade de se obter a consistência e sabor desejado. Nesse processo, primeiramente ocorre a ação enzimática da quimosina sobre a ligação peptídica Phe-105-Met-106, em seguida, ocorre a ação do fragmento hidrofóbico (para-k-caseína) ocorrendo a coagulação (MATTANA, 2011). Em outras palavras, a caseína encontra-se na forma de micela, constituída de várias submicelas que são estabilizadas por moléculas de k-caseínas. A quimosina retira a k-caseína entre essas ligações (Phe-105-Met-106) presentes nas submicelas, e na maior parte da estrutura, a para-k-caseína permanece ligada à submicela, e a menor parte (macropeptídeo) é dissolvida no soro, desestabilizando a micela que, ao interagir de diversas formas com os constituintes do meio, formam estruturas tridimensionais características da coagulação (TUNICK, 2014). Essas enzimas, responsáveis pela coagulação do

leite são conhecidas como coalho, que se trata de enzimas proteolíticas obtidas a partir da mucosa gástrica do estômago de ruminantes jovens, como a pepsina, quimosina e gastricina, sendo a quimosina o principal componente, que também pode ser obtido a partir de bactérias e leveduras geneticamente modificadas (AS ENZIMAS..., 2011).



**Figura 2.** Adição do coalho ao leite acidificado. Imagem disponível em: <<http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>>.

Posteriormente faz-se o chamado “corte da coalhada” que consiste em partir a massa em pedaços iguais, porém o tamanho dos mesmos varia para cada tipo de queijo, determinando também o quão duro ou mole será o produto. Nesta etapa, separa-se o soro da coalhada. Logo após, faz-se o tratamento térmico por um processo chamado cocção (conhecido popularmente por cozimento), que também varia para cada tipo de queijo dependendo do quanto de soro se quer retirar ou do nível de dureza que se deseja alcançar. Os queijos podem ser classificados conforme o tratamento da massa nessa etapa. Os tratamentos conhecidos são os de massa crua, semicozida, cozida, filada, coagulação ácida, fundida e de proteína de soro. No caso do queijo mozzarella, utiliza-se o processo de filagem, que consiste em introduzir a massa de queijo em água aquecida, em torno de 80 °C, e amassar de modo a torná-la homogênea e lisa até que se torne elástica, adotando a textura desejada.



**Figura 3.** Corte da coalhada utilizando uma lira. Imagem disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>.

A agitação dos pedaços é fundamental para evitar a aglomeração e sedimentação das partículas cortadas. O corte, a cocção e agitação da coalhada, são as principais etapas do processo de dessoramento do queijo.



**Figura 4.** Agitação da coalhada. Imagem disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>.



**Figura 5.** Dessoramento utilizando uma forma com furos de modo a escoar o soro em excesso. Imagens disponíveis em: <http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>.

Após a moldagem da massa, para obter a forma desejada do produto e drenagem do soro ainda retido, realiza-se a salga. Em todas as variedades de queijo é realizada a salga, pois esta potencializa o sabor e o crescimento das

bactérias de interesse, inibe a proliferação de bactérias indesejadas, além de conferir ao produto diversificadas características físico-químicas. Nessa etapa o sal é absorvido osmoticamente do exterior para o interior, atuando no controle do sabor ao variar o tipo de sal utilizado e sua concentração. Dependendo dos processos bioquímicos e tempo de maturação do tipo de queijo a ser produzido, o sal age, ainda, como principal agente conservante desse alimento (FURTADO, 1991). Para o queijo mozzarella, o principal tipo de salga realizada, é a salga em salmoura.



**Figura 6.** Processo de salga a seco (adição de cloreto de sódio na superfície). Imagem disponível em: <<http://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>>.

Após estes processos, em algumas variedades de queijos realiza-se a maturação. A forma como é realizada pode gerar substâncias responsáveis pelo seu sabor e aroma, como a temperatura de armazenagem, níveis de umidade relativa e os tempos de maturação que afetam o crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, o sabor e textura do produto (TUNICK, 2014). Nesse âmbito, a forma e tempo de estocagem são fundamentais para o tipo de queijo que se deseja produzir.

#### **1.4 Definições de queijo e suas classificações**

Segundo Pereda *et al.*(2005), o queijo pode ser definido como a coalhada que se forma a partir da coagulação do leite por meio da adição de enzimas coagulantes ou microrganismos específicos, também presentes naturalmente no leite, que promovem a produção do ácido láctico para posteriormente ocorrer a coagulação.

A definição de queijo dada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) se refere a produtos que contém ou não soro em sua constituição. Segundo a FAO (2011), queijo é o produto fresco ou maturado após o processo de coagulação seguida do dessoramento e salga, e queijo de soro é o produto obtido pela coagulação do soro ou concentração do mesmo que pode ser obtido pela adição ou não de leite ou gordura lática. Essa definição abrange tecnologias mais recentes, referentes a queijos elaborados a partir do soro do leite.

**Tabela 1.** Origem e classificação dos principais tipos de queijos de acordo com o teor de umidade e microrganismos utilizados na maturação.

<b>Classificação</b>	<b>Tipos de queijo (origem)</b>	<b>Umidade</b>	<b>Microrganismos</b>
Muito duros	Parmesão e Romano (Itália)	até 25%	Maturados por bactérias
Duros	Emmenthal <sup>(1)</sup> (Suíça); Gruyère <sup>(1)</sup> e Cantal (França); Cheddar (Grã-Bretanha); Manchego, Catellano e Mohón (Espanha); Edam e Gouda (Holanda); Caccicavalo (Itália).	25 a 36%	Maturados por bactérias, com buracos <sup>(1)</sup> e sem buracos.
Semimoles	Gallegos <sup>(2)</sup> , Manchego <sup>(2)</sup> e Cabrales (Espanha); St. Paulin <sup>(2)</sup> , Munster <sup>(3)</sup> e Roquefort (França); Lancashire <sup>(2)</sup> , Stilton (Grã-Bretanha); Limburger <sup>(3)</sup> (Bélgica); Tilsit <sup>(3)</sup> (Alemanha); Bel Pasese <sup>(3)</sup> e Gorgonzola (Itália); Danablu (Dinamarca).	36 a 40%	Maturados por bactérias <sup>(2)</sup> , por bactérias e microrganismos superficiais (bactérias e leveduras) <sup>(3)</sup> , mofos internos (azuis).
Moles	Camembert <sup>(4)</sup> , Brie <sup>(4)</sup> e Petit Suisse (França); Cottage (Grã-Bretanha); Burgos e Villálon (Espanha); Mozzarella (Itália).	Acima de 40%	Maturados por mofos artificiais <sup>(4)</sup> e não maturados

Informações adaptadas da tabela 5.1, p. 90, PEREDA, 2005.

Além da definição, a classificação desse alimento tornou-se crucial no âmbito econômico e comercial. Ao longo da história, foram feitas diversas classificações dos tipos de queijos já fabricados. Essa diferenciação fez-se

necessária para ter-se um melhor controle de qualidade e comercialização dos produtos. Atualmente, a principal e mais utilizada classificação se dá pela textura, diferenciando as inúmeras qualidades de queijos em: muito duros, duros, semimoles e moles. A tabela 1 mostra a classificação proposta por Pereda *et al.* (2005), conforme o conteúdo do queijo em umidade e os microrganismos presentes na maturação e seus efeitos.

A portaria nº 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), referente ao regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, apresenta algumas especificações a respeito da comercialização desse produto. O alimento é classificado conforme seu conteúdo de matéria gorda no extrato seco, umidade e tratamento térmico. Especifica-se que os queijos deverão obedecer aos requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade estabelecidos no padrão individual correspondente, além de ser apresentada uma tabela dos aditivos autorizados para cada classe de queijo.

De modo geral, as especificações que o MAPA apresenta pela portaria nº 146 de 07 de março de 1996 para cada tipo/classe de queijo não variam muito, e os métodos de análises exigidos restringem-se basicamente na análise do teor de umidade, de acordo com a norma da Federação Internacional de Laticínios (FIL) 4A de 1982, e do teor de matéria gorda, norma FIL 5B de 1986, que tratam da determinação do conteúdo de sólidos totais por secagem direta em estufa e determinação do conteúdo de matéria gorda pelo método butirométrico, respectivamente.

A título de exemplificação, segundo a legislação vinculada ao MAPA, o queijo mozzarella, visando a identidade e qualidade do produto por meio do regulamento técnico, portaria nº. 364 de 04 de setembro de 1997 trata-se de um produto que é obtido pela filagem de uma massa acidificada; de média, alta ou muito alta umidade e, gordo, semigordo ou extragordo; de consistência suave ou semisuave; textura fibrosa, elástica e fechada; coloração uniforme, branca ou amarelada; sabor láctico, pouco desenvolvido a ligeiramente picante; odor láctico pouco perceptível; sem crosta e olhadura; em termos de composição, considera-

se a umidade em g/100g de no máximo 60%, e teor de gordura do extrato seco em g/100g de no mínimo 35%. Nesse sentido, tendo em vista a elevada produção e consumo desse alimento no Brasil e no mundo, surgiu uma preocupação acerca de sua qualidade de armazenamento, visto que na resolução apresentada existem poucos critérios de análise estabelecidos.

### **1.5 Queijo e metabolômica**

A pesquisa em metabolômica surgiu da necessidade de métodos bem definidos de análise de processos metabólicos complexos. Essa ciência foi introduzida mais recentemente em relação às demais tecnologias ômicas (genômica, transcriptômica e proteômica), pois já existem bancos de dados extensos para os genes, RNAm e proteínas de sistemas biológicos, enquanto que o número de metabólitos é infinitamente maior (FERNIE *et al.*, 2004).. Para se ter uma ideia, os metabólitos presentes em bactérias, leveduras, e seres humanos são da ordem de 500, 700, e 3000, respectivamente, e em plantas, até 25000, justificando a necessidade de maiores estudos na área de metabolômica (FERNIE *et al.*, 2004). O avanço nesses estudos se deu principalmente pelas técnicas da espectroscopia de RMN, Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (GRANDIZOLI, 2014).

Em termos de qualidade e identidade de alimentos, muitas pesquisas têm sido realizadas há algum tempo, principalmente por meio da metabolômica ou *foodomics*. Metabolômica trata-se de um termo designado ao estudo dos metabólitos de determinado sistema biológico, visando a análise do metaboloma em seus diversos níveis de complexidade de modo a obter um perfil completo dos metabólitos do sistema (FIEHN, 2002). Dessa forma, uma análise rápida que leva em conta a origem ou relevância biológica de um organismo pode ser chamada de *fingerprint* metabólico ou impressão digital química (FIEHN, 2001). Já *foodomics*, é um termo introduzido recentemente por alguns pesquisadores que visam realizar o estudo dos metabólitos presentes em alimentos, apesar de ser definida como uma área que estuda o domínio da alimentação e nutrição por meio de tecnologias como Nutrigenômica e Nutrigenética (CIFUENTES, 2009). Com o propósito de utilizar banco de dados para a criação de modelos computacionais

que visam a compreensão quantitativa e preditiva de metabólitos, têm sido realizado um volume considerável de pesquisas na área (FAN e LANE, 2008).

O trabalho de Cifuentes (2012) apresenta uma revisão das técnicas utilizadas na análise de alimentos nos últimos anos, incluindo suas aplicações em pesquisas na área de ciência dos alimentos. O autor apresenta uma tabela com o número de trabalhos publicados no período de 2001 a 2011, pesquisados a partir do banco de dados da *Food Science and Technology*, onde foi possível concluir que, ao se comparar esses dados com uma pesquisa semelhante realizada pelo mesmo grupo no período de 1990 a 2000 (IBAÑES e CIFUENTES, 2001), o uso de técnicas espectroscópicas aumentou cerca de duas vezes mais, e atualmente, são as mais extensivamente usadas na análise de alimentos, pois se caracterizam por serem rápidas, por fornecerem uma medida direta dos componentes dos alimentos, uso em menor extensão de solventes tóxicos, serem menos invasivas, além de, em algumas dessas técnicas, ser possível detectar simultaneamente vários compostos (CIFUENTES, 2012). Nesse sentido, a seguir são apresentadas algumas pesquisas que estudam a identidade e qualidade de queijos a partir do uso de técnicas espectroscópicas ou técnicas hífenadas envolvendo a espectroscopia, a partir da análise de seus perfis metabólicos.

Ochi *et al.* (2012) *apud* Mozzi *et al.* (2013), por exemplo, por meio do estudo dos metabólitos presentes no queijo utilizando técnicas de cromatografia gasosa / espectrometria de tempo de voo em massa (GC/TOF-MS, *Gas Chromatography / Time Of Flight - Mass Spectrometry*) e análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*), analisou os diferentes componentes presentes nos queijos cheddar, gouda e parmigiano reggiano. Os perfis obtidos para o parmigiano reggiano apresentaram grandes diferenças em relação às outras duas variedades e, embora os processos de fabricação e de maturação dos queijos cheddar e gouda sejam diferentes, os perfis de metabólitos finais apresentaram picos semelhantes. Utilizando também o modelo de análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*), puderam prever as características sensoriais específicas de cada tipo de queijo. Neste trabalho os autores queriam verificar a autenticidade dos produtos alimentares por meio da “impressão digital molecular”, como o queijo parmigiano reggiano que possui denominação de origem protegida (PDO, *Protected*

*Designation of Origin*), proteção dada por meio de uma lei específica que reserva exclusividade à produção desse queijo nas regiões italianas de Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna e Mantova. Deste modo, a partir dessa técnica, poderiam discriminar o produto de variedades diferentes e fraudulentas.

A espectroscopia no InfraVermelho (IV) também é utilizada na autenticação e rápida detecção de adulteração de alimentos. No trabalho de Pillonen *et al.* (2003), por exemplo, foram testadas três técnicas de IV com Transformada de Fourier (TF) com a finalidade de discriminar a origem do queijo tipo emmental fabricado nas províncias da Suíça, Alemanha, França, Áustria e Finlândia. As vinte amostras de queijos foram analisadas pelas técnicas de reflexão difusa no infravermelho próximo (NIR-DR, *Near Infrared Diffuse Reflection*), reflexão total atenuada no infravermelho médio e infravermelho médio de transmissão, combinadas a técnicas de análises multivariadas como PCA e Análise Discriminante Linear (LDA, *Linear Discriminant Analysis*). Nesse estudo foram observadas claras tendências de distinção entre os queijos a partir das análises multivariadas, permitindo uma classificação das seis regiões para os queijos analisados pela técnica de NIR-DR (PILLONEN *et al.*, 2003).

Estudos da impressão digital metabólica de queijos têm sido apontados como uma importante ferramenta para a análise desse alimento. O trabalho de Boucher *et al.* (2013) foi o primeiro a utilizar cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para investigar alterações provocadas pelo metabolismo bacteriano na matriz de queijos ao longo do tempo. Os autores notaram que os perfis químicos mudaram significativamente em um período de estudo de 0, 8 e 48 horas, onde foram identificados quarenta e cinco metabólitos característicos do queijo a partir das análises das frações solúveis e aquosas. Com esses resultados puderam concluir que, por meio da impressão digital metabólica de queijos, é possível detectar diferenças sutis em aspectos como a sua maturação, sendo a metabolômica uma importante forma de estudar esse alimento (BOUCHER *et al.*, 2013).

A espectroscopia de RMN tem se destacado nesse contexto. Segundo o levantamento de CIFUENTES (2012), essa técnica encontra-se entre as mais

utilizadas nas pesquisas em alimentos, ficando atrás apenas das técnicas de espectrometria de massas e fluorescência em termos de número de publicações na área. Dessa forma, assim como a GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), a RMN tem como vantagem produzir informações analíticas complementares na análise de um metaboloma em relação às demais técnicas. A seguir, no item 1.7, são apresentados alguns trabalhos utilizando RMN na análise de queijos que tem contribuído para a compreensão desse alimento.

## 1.6 RMN na análise de queijos

Antes de apresentar algumas das pesquisas que serviram de suporte para o desenvolvimento do presente trabalho, é importante frisar algumas especificidades do uso da RMN na análise de queijos, bem como as características gerais dessa técnica.

A espectroscopia de RMN é uma técnica que tem sido cada vez mais utilizada não somente na metabolômica como em inúmeras outras finalidades, pois possibilita o estudo de estruturas, dinâmicas moleculares e cinética química de diversificados sistemas (RULE e HITCHENS, 2006). As análises via RMN, em linhas gerais, ocorrem da seguinte forma: na presença de um campo magnético ( $B_0$ ), os spins nucleares encontram-se em diferentes estados energéticos, que ao sofrerem a influência de um pulso de radiofrequência (RF), buscam o estado de equilíbrio por meio de transições energéticas. Os sinais de cada núcleo são detectados pelo fenômeno de relaxação ou decaimento livre de indução (FID, *Free Induction Decay*) dos spins, caracterizado pela volta do estado de maior energia ( $\beta$ ) para o estado de menor energia ( $\alpha$ ) e a consequente emissão de energia, proveniente da absorção inicial da radiação advinda do pulso de RF. A energia necessária para tais transições corresponde a uma frequência denominada frequência de Larmor, característica de cada núcleo. A ressonância ocorre quando a frequência do campo oscilante da RF coincidir com a frequência de precessão do núcleo (frequência de Larmor), satisfazendo a energia envolvida no processo (CLARIDGE, 2009). A detecção é realizada logo após o pulso de RF ser desligado, onde as energias emitidas pelos spins durante a relaxação são

então amplificadas, convertidos em frequência e digitalizados pelo receptor de modo a armazenar o sinal complexo no computador (LEVITT, 2008).

A técnica de RMN possui ainda algumas especificidades em relação à matriz que se deseja analisar. O estado de agregação da amostra, escolha do solvente e parâmetros experimentais são dados fundamentais, além da escolha da sonda adequada. No caso do queijo, devido a sua consistência e composição conhecida, é caracterizado como sólido heterogêneo, e a sonda que permite sua análise com o mínimo de manipulação é a do tipo HR-MAS (*High Resolution - Magic Angle Spinning*). Essa sonda tem como principal característica rotacionar a amostra, empacotada em um rotor de zircônio próprio para o equipamento, em um ângulo de  $54,7^\circ$ , pois amostras com tais características apresentam baixa mobilidade molecular e, conseqüentemente, sinais alargados de baixa resolução espectral quando analisadas em sondas convencionais de análise de líquidos (CLARIDGE, 2009). A vantagem dessa técnica consiste principalmente na análise da amostra *in natura*, pois assim, diminui possíveis perdas em processos de manipulação como extrações, além de possibilitar a análise da interface de materiais complexos, fornecendo informações como o sinergismo entre as diferentes fases presentes em uma amostra (FAROOQ *et al.*, 2013). Para o caso de sondas em que o ângulo mágico não é fixo, é fundamental que periodicamente seja realizada a calibração do ângulo mágico, onde normalmente utiliza-se KBr pulverizado de modo a analisar as bandas laterais múltiplas do sinal de RMN do  $^{79}\text{Br}$ , que possui relação direta com o eixo de giro em relação ao ângulo mágico.

O sinal de RMN pode ser descrito como o somatório de Hamiltonianos que descrevem os efeitos das interações magnéticas com os spins nucleares, são eles: acoplamento dipolar, dado pelo acoplamento direto de um núcleo com outro através do espaço; deslocamento químico anisotrópico, causado pelo efeito da blindagem dos núcleos pelos elétrons que os circundam; acoplamento spin-spin, dada pelas interações eletrônicas referentes às ligações químicas entre os núcleos; interações quadrupolares, presentes em núcleos com número quântico de spin nuclear maior que  $\frac{1}{2}$ , resultando em uma distribuição de carga não esférica do mesmo; e por fim, interações de Zeeman, para núcleos com número atômico ímpar e maior que zero, ou seja, que sofram quebra de degenerescência

(separação dos níveis de energia) igual a frequência de Larmor na presença de um campo magnético (AGUIAR, GEMAL e GIL, 1999).

Segundo Farooq *et al.* (2013), no caso da análise de materiais heterogêneos, como no uso da HR-MAS, os principais efeitos a serem considerados são de acoplamento dipolar e deslocamento químico anisotrópico, pois são efeitos dependentes da função polinomial de Legendre de 2ª ordem  $P_2(\cos \theta) = (1/2)(3\cos^2 \theta - 1)$ , de modo que, quando  $\theta = 54,74^\circ$  (ângulo mágico) os valores correspondentes a tais efeitos tendem a zero, sendo estes praticamente removidos. Segundo os autores, o ângulo  $\theta$  é o ângulo entre os vetores dos efeitos não homogêneos (por exemplo, acoplamento dipolar) e  $B_0$ . No entanto, devido as naturais diferenças de susceptibilidade magnética em tais amostras, esses vetores terão ostensivamente várias orientações, e um único valor de  $\theta$  não poderia satisfazer a condição de  $P_2(\cos \theta) = 0$ . Porém, quando é fornecida à amostra uma taxa de giro rápida o suficiente para minimizar estes efeitos não homogêneos, promove-se ainda a remoção das interações que causam alargamento dos sinais. Desta forma, o giro da amostra no ângulo mágico da HR-MAS, associado ao intumescimento da mesma, melhora significativamente a resolução dos sinais.

Outra abordagem que também pode ser utilizada para a análise desse alimento, é através do uso de sondas convencionais de detecção inversa, sendo necessário realizar procedimentos de extrações para a análise das frações solúveis do queijo. Um exemplo desse tipo de sonda é a TBI (*Triple resonance Broadband Inverse probe*), essa sonda possui uma bobina interna mais próxima da amostra para observar os sinais provenientes das ressonâncias de  $^1\text{H}$  de modo a maximizar a sensibilidade na aquisição dos sinais de  $^1\text{H}$ , e uma bobina exterior (núcleo X) com sistema de sintonia para uma ampla faixa de frequências (banda larga) que pode ser utilizada para detectar qualquer núcleo X observável nessa faixa ou para desacoplamento, sendo, no entanto, menos sensível por estar mais distante da amostra. Por se tratar, no presente caso, da análise do extrato aquoso dos queijos, os efeitos da não homogeneidade de campo considerados importantes nas análises via HR-MAS praticamente são anulados nas análises via TBI, permitindo que os espectros apresentem maior resolução e, assim, contribuir para uma atribuição mais precisa de sinais de RMN que eventualmente estejam

sobrepostos por sinais de compostos insolúveis em D<sub>2</sub>O presentes nos espectros obtidos via HR-MAS.

### 1.7 Pesquisas envolvendo queijo e RMN

Mazzei e Picolo (2012) realizaram um estudo do queijo Mozzarella di Bufala Campana, que é também um produto PDO feito a partir de leite de búfala pertencente à região Campania na Itália, utilizando a espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H via HR-MAS, para verificar a autenticidade, rastreabilidade e qualidade do produto. Realizaram-se também análises multivariadas que permitiram a identificação de traços metabólicos, diferenciando a Mozzarella di Bufala Campana dos demais queijos da região. β-galactose, β-lactose, ácido acético e glicerol foram os metabólitos responsáveis pela distinção das amostras nessa região. Outro aspecto estudado foi o envelhecimento. Ao analisar os espectros de <sup>1</sup>H via HR-MAS de amostras frescas e com dois dias de envelhecimento, notaram que o teor de álcool isobutílico, ácido acético e ácido láctico (subprodutos da degradação da mozzarella) aumentaram devido a atuação de enzimas liberadas no processo de fermentação promovida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HAZELWOOD *et al.*, 2008 *apud* MAZZEI E PICOLO, 2012), podendo estes componentes serem utilizados na determinação da idade do produto.

Shintu e Caldarelli (2005) caracterizaram o queijo parmigiano reggiano e emmental de acordo com a sua idade de amadurecimento utilizando a técnica de RMN via HR-MAS combinados às análises multivariadas PCA e análise discriminante (DA, *Discriminant Analysis*). A pesquisa desenvolveu-se pelo estudo de amostras com diferentes meses de estocagem (4, 8, 12, 18 e 24 meses), de modo que pôde ser observada uma boa separação desses grupos nas figuras de mérito da análise quimiométrica. Para o queijo emmental, estudaram também sua rastreabilidade utilizando essas técnicas. Um estudo prévio realizado por Shintu, Ziarelli e Caldarelli (2004) sobre o uso da técnica de RMN via HR-MAS no estudo da composição do queijo parmigiano reggiano, mostrou que esta pode ser uma ferramenta eficaz na rastreabilidade e avaliação da qualidade desse alimento por meio da análise da concentração relativa de seus constituintes.

O queijo Italiano Mozzarella de Bufala foi também estudado utilizando espectroscopia de RMN de baixa e alta resolução. A RMN de baixa resolução (relaxometria) foi utilizada para identificar o estado da distribuição de água na estrutura fibrosa do queijo, enquanto que a RMN de alta resolução foi aplicada para identificar o perfil metabólico de baixo peso molecular extraídos do queijo, resultando assim na certificação da qualidade e identidade da Mozzarella de Bufala Campana (GIANFERRI *et al.*, 2007). Pesquisas em queijo por relaxometria também tem sido feitas com a finalidade de realizar uma quantificação simultânea de teor de gordura e água (CASTELL-PALOU *et al.*, 2013), no estudo do monitoramento das mudanças que ocorrem em queijos feta durante a salga em conjunto com o uso da ressonância magnética por imagem (ALTAN *et al.*, 2011), na investigação de fraudes no desenvolvimento de matrizes de queijos com auxílio de microscopia óptica (NORONHA *et al.*, 2008) e até mesmo com o uso de modelagem matemática de transferência de massa no estudo dos perfis de umidade no processo de secagem do queijo, determinados por relaxometria (CASTELL-PALOU *et al.*, 2011).

Em termos de pesquisas que envolvem envelhecimento, caracterização geográfica, degradação ou mesmo o estudo da composição de queijos, encontra-se na literatura diversas formas do uso da RMN para tais finalidades, como o uso de RMN unidimensional e bidimensional de  $^{31}\text{P}$  e  $^1\text{H}$  para traçar os perfis de fosfolipídeos (KAFFARNIK *et al.*, 2013), o estudo da distribuição e mobilidade de fosfatos e íons sódio em queijos por RMN de  $^{31}\text{P}$  no estado sólido (GOBET *et al.*, 2010), a caracterização dos componentes moleculares da fração lipídica do queijo percorino sardo por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (SCANO *et al.*, 2011), o estudo metabólico por RMN do processo de maturação do queijo fiore sardo produzido com culturas autóctones (PIRAS *et al.*, 2013), a influência das condições de embalagem de queijos moles em sua degradação (LAMANNA *et al.*, 2008), o estudo da rápida determinação de histamina em queijos (SCHIEVANO, GUARDINI e MAMMI, 2009), a determinação do perfil de aminoácidos em queijos grana padano (CURTIS *et al.*, 2000) e caracterização geográfica do queijo parmigiano reggiano por RMN de  $^1\text{H}$  (CONSONNI e CAGLIANI, 2008).

Nesse sentido, verifica-se que muitas pesquisas tem sido realizadas utilizando RMN para a compreensão desse alimento em seus diversos aspectos,

com o intuito de contribuir tanto em quesitos econômicos, comerciais sociais, dentre outros. Entretanto, no Brasil ainda não foram realizadas pesquisas utilizando RMN para o estudo de queijos que, como já mencionado, possui características específicas de cada região que estão diretamente relacionadas às formas de condições de produção desse alimento.

### **1.8 Análise de Componentes Principais como método multivariado**

Como mencionado, em alguns casos específicos do uso da RMN na análise de queijos, é necessário o uso de técnicas multivariadas como ferramenta complementar tanto na análise exploratória dos dados, quanto para seu uso como ferramenta preditiva implicando em resultados mais consistentes.

Assim, em linhas gerais, análises multivariadas consistem em métodos estatísticos elaborados para obter informações a partir de um conjunto de dados no qual investiga-se as relações de dependência entre as variáveis respostas associadas a outros fatores (MINGOTI, 2005). Segundo Lattin, Carroll e Green (2011), a análise de dados multivariados trata-se do estudo de associações entre conjuntos de medidas, ou seja, os métodos multivariados são um conjunto de procedimentos que analisam a correlação entre determinados conjuntos de medidas. São vários os métodos multivariados já desenvolvidos, onde cada um deve ser devidamente escolhido para tratar diferentes tipos de dados, destes, os mais conhecidos são: os métodos de Componentes Principais, Análise Fatorial Exploratória e Confirmatória, Escalonamento Multidimensional, Análise de Conglomerados, Correlação Canônica, dentre outros (LATTIN, CARROLL e GREEN, 2011). Tendo em vista que espectros de RMN de  $^1\text{H}$  podem fornecer dados de natureza multivariada, o uso do método de Análise de Componentes Principais é considerado uma técnica vantajosa na exploração inicial dos dados, como evidenciado no trabalho de Shintu e Caldarelli (2005).

Algoritmos exploratórios como PCA têm como objetivo reduzir um grande conjunto de dados com tamanho otimizado e interpretável, ou seja, a PCA reduz a dimensionalidade dos dados multivariados. A grande vantagem dessa técnica no estudo de conjuntos de dados complexos é de padronizar os dados por meio de

pré-processamentos, e assim, maximizar a variância expressando os dados em unidades comparáveis, além de identificar padrões ao fazer associações entre as variáveis por meio de componentes principais (VICINI, 2005). Dessa forma, a primeira componente principal é a combinação linear de todos os pontos que exibem variância máxima, escolhendo-se assim a combinação linear com variância máxima e explicando o máximo possível de informações. A segunda componente principal é então, a segunda combinação linear que explica a maior parte possível da variação remanescente dos dados, o mesmo raciocínio segue para as demais componentes principais, lembrando que, combinação linear é a projeção de todos os pontos no espaço tridimensional em um único eixo (LATTIN, CARROLL e GREEN, 2011).

Outro algoritmo muito utilizado são os que envolvem as análises de regressão quimiométrica, que objetiva desenvolver um modelo que correlacione as informações do conjunto de dados conhecidos com uma propriedade desejada. Algoritmos com essa característica incluem PLS e Componente Principal de Regressão (PCR, *Principal Component Regression*) (NUNES, 2008).

O uso de processamentos que promova uma melhoria no conjunto de dados, ou seja, auxiliando na redução da sua dimensionalidade, é comum em se tratando de análises multivariadas. No caso de dados de RMN, por exemplo, pode ser utilizada a deconvolução de referência. Esse processamento baseia-se no uso de um algoritmo que constrói funções de correção baseado em um singletto sintético perfeito e um sinal de referência conhecido (necessariamente um singletto) extraído do espectro de interesse e, dessa forma, as funções aplicadas minimizam as imperfeições da forma dos sinais (EBRAHIMI *et al.*, 2014).

### **1.9 RMN na análise do perfil químico de queijos em diferentes condições de refrigeração**

Tem sido veiculada pela mídia notícias relacionada à prática por parte de alguns comerciantes, de desligamento de prateleiras de refrigeração durante a noite. Esta prática tem despertado a atenção de autoridades e de órgãos de defesa do consumidor. Cita-se como exemplo o projeto de lei nº 1965/2014, da

Assembleia Legislativa de Pernambuco que determina a aplicação de interdição funcional e penalidade aos estabelecimentos comerciais que desligam seus equipamentos de refrigeração.

No Estado de Goiás, a polícia civil, por parte da delegacia de Defesa do Consumidor, também tem atuado neste sentido, inclusive determinando a interdição de estabelecimentos comerciais e distribuidoras de alimentos (RABELO, 2012). Além disso, na prática cotidiana, é muito comum encontrar, pela manhã, prateleiras que deveriam manter alimentos sob refrigeração, em equilíbrio térmico com a temperatura ambiente.

Na contramão dessa prática, a ANVISA, por meio da RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004, que trata de práticas sobre serviços de alimentação, especifica as condições de refrigeração de alimentos, e destaca que esta prática de refrigeração inadequada pode afetar a qualidade do alimento e também colocar em risco a saúde do consumidor.

Diante disso e da escassez de metodologias para averiguar o impacto dessa prática sobre a qualidade de alimentos que deveriam ser mantidos na refrigeração, almejou-se empregar o perfil químico obtido por Ressonância Magnética Nuclear como uma metodologia alternativa em estudos desta natureza.

Sendo a região centro-oeste uma das maiores produtoras de queijo do país, e uma vez que o queijo é utilizado como material de partida para a produção de uma grande variedade de pratos e receitas optou-se por utilizar este alimento no estudo do efeito da refrigeração inadequada através do perfil químico obtido por RMN.

Nessa perspectiva, por meio da análise dos espectros de RMN, espera-se determinar os compostos resultantes da degradação do queijo mozzarella em diferentes condições de refrigeração e, a partir do uso de tais processamentos e ferramentas quimiométricas em uma análise exploratória, inferir sobre os aspectos responsáveis pela qualidade dos mesmos ao longo do seu período de estocagem.

## **CAPÍTULO 2**

### **2. OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da refrigeração inadequada no perfil químico de queijos comerciais tipo mozzarella através da técnica de RMN.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar subprodutos da degradação do queijo mozzarella em função da refrigeração inadequada;
- Identificar possíveis marcadores que possam ser correlacionados com as condições adequadas e inadequadas de refrigeração;
- Comparar os perfis químicos de queijos em diferentes condições de refrigeração com o perfil químico dos queijos após o prazo de validade;
- Correlacionar as propriedades físico-químicas do queijo submetidas a diferentes condições de refrigeração com seus respectivos perfis químicos obtido por RMN;
- Empregar ferramentas quimiométricas no tratamento e avaliação dos perfis químicos obtidos por RMN.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

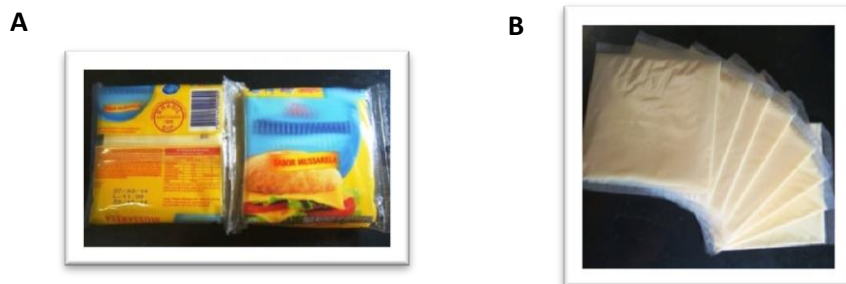
#### **3.1 Acondicionamento das amostras**

Para este estudo as amostras de queijos foram divididas em dois conjuntos. Um deles permaneceu sob condições de refrigeração durante o dia e durante a noite pelo período de sete semanas para o queijo tipo mozzarella processado, e onze semanas para o queijo tipo mozzarella convencional. O outro conjunto de amostras permaneceu sob condições de refrigeração apenas durante o dia, pelo mesmo período para cada tipo de queijo. Este conjunto de amostras era transferido para uma caixa de isopor sem tampa contendo gelo rígido reutilizável, de modo que o sistema formado pelas amostras de queijo e a caixa de isopor atingissem gradualmente o equilíbrio térmico com a temperatura ambiente durante a noite. Este procedimento tinha como objetivo simular as condições de refrigeração que se tornariam inadequadas em função da prática, por parte de alguns estabelecimentos comerciais, de desligamento das prateleiras de refrigeração durante a noite.

#### **3.2 Amostras**

##### **3.2.1 Queijo tipo mozzarella processado**

Os estudos preliminares foram realizados com o queijo tipo mozzarella processado, o qual é comercializado em pacotes com oito fatias embaladas separadamente (Figura 7). As amostras, obtidas no comércio local, pertenciam ao mesmo lote e se encontravam mantidas sob as mesmas condições de estocagem. A cada semana, apenas uma fatia de cada conjunto de amostras, que teriam sido submetidas a diferentes condições de refrigeração, era retirada da embalagem e preparada para subseqüentes análises.



**Figura 7.** Queijo tipo mozzarella processado utilizado no estudo inicial do envelhecimento. Embalagem comercial (A) e fatias que compõem a embalagem (B).

Dos dois pacotes de queijo utilizados no estudo, que constituem as amostras do queijo tipo mozzarella processado, um permaneceu na geladeira durante as sete semanas de estudo, sendo sua temperatura mantida em torno de 8°C conforme as recomendações estabelecidas pelo fabricante. O outro conjunto foi removido da geladeira durante as noites nesse mesmo período de estudo, e permitiu-se que o equilíbrio térmico com a temperatura ambiente fosse alcançado dentro da caixa de isopor. A cada semana, foi utilizada uma fatia de cada um dos conjuntos de amostras, as quais foram imediatamente preparadas para as análises de RMN de  $^1\text{H}$ .



**Figura 8.** Aferição da temperatura média dentro da geladeira (à direita) e da caixa de isopor (à esquerda).

### 3.2.2 Queijo tipo mozzarella convencional

Na segunda etapa do estudo utilizou-se o queijo tipo mozzarella convencional, que é comercializado em bandejas na forma de fatias (Figura 9), sendo todas as amostras obtidas do mesmo lote e sob as mesmas condições de estocagem. O estudo desse queijo foi realizado durante onze semanas, extrapolando em três semanas o prazo de validade estabelecido pelo fabricante. As amostras foram submetidas a duas diferentes condições de refrigeração. Em uma dessas condições, onze bandejas permaneceram na geladeira, e na outra condição, outras onze bandejas foram removidas da geladeira durante as noites nesse mesmo período, permitindo-se que o equilíbrio térmico com a temperatura ambiente fosse alcançado dentro da caixa de isopor. A cada semana, foi utilizada uma bandeja de cada condição de refrigeração, as quais foram imediatamente preparadas para as análises físico-químicas e de RMN de  $^1\text{H}$ .



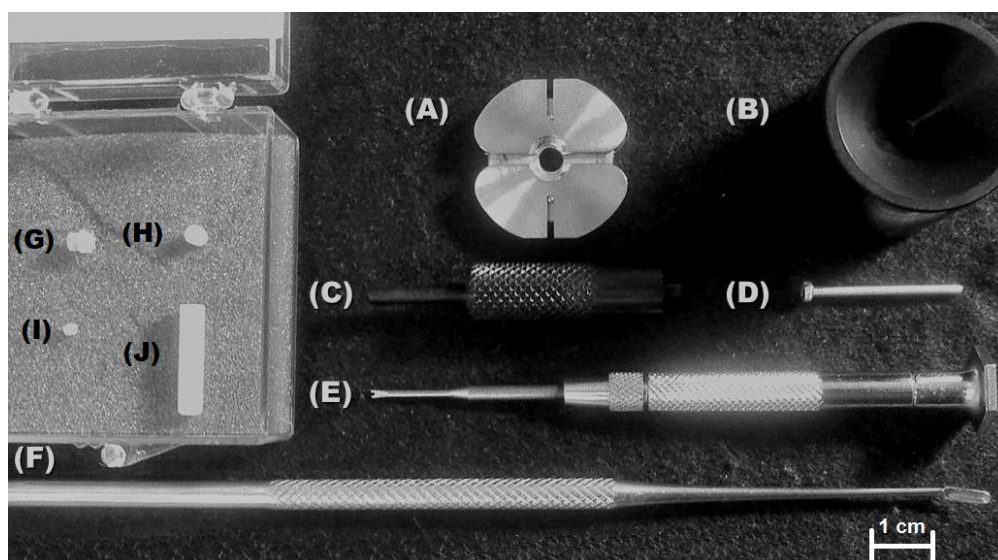
**Figura 9.** Queijo tipo mozzarella convencional. Embalagem comercial (A), fatias que compõem a bandeja (B).

### 3.3 Preparo de amostras para análises de RMN

As fatias de queijos utilizadas no estudo foram cortadas em pequenos pedaços e pulverizadas em almofariz com uso de nitrogênio líquido, e constituem a amostra tanto para as análises com o material heterogêneo, fazendo uso da sonda HR-MAS (queijo tipo mozzarella processado e queijo tipo mozzarella convencional), como também, do extrato bruto, fazendo uso da sonda TBI (apenas queijo tipo mozzarella convencional).

Para as análises fazendo uso da sonda HR-MAS, utilizou-se um rotor de zircônio com capacidade de 50  $\mu\text{L}$  (Figura 10), o qual foi empacotado com 15 mg de amostra e 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; 99,9% de deutério). No estudo do queijo tipo mozzarella processado, a solução de solvente deuterado era constituída, além da referência interna trimetilsililpropanato de sódio (TMSP-2,2,3,3- $\text{d}_4$ ) 4,2% (m/v) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.; 98% de deutério), também por tampão fosfato. Este tampão foi preparado a partir de 61 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 82 mg de  $\text{NaHPO}_4$  (J. T. Baker<sup>®</sup>, 99% de pureza), em 1 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ , conforme proposto por Shintu, Ziarelli e Caldarelli (2004), de modo a obter um pH de 6,7. A aferição do pH foi feita utilizando-se o pHmetro do tipo Quimis<sup>®</sup>, modelo Q400AS. Já para as análises do queijo tipo mozzarella convencional, fazendo uso da mesma sonda, adicionou-se as mesmas quantidades de amostra e solvente. No entanto, não se fez uso do tampão, de modo que o solvente deuterado era constituído apenas por TMSP- $\text{d}_4$  0,05% (m/v). Essa escolha foi baseada no fato de que a variação do pH poderia ser um importante marcador na distinção das amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração.

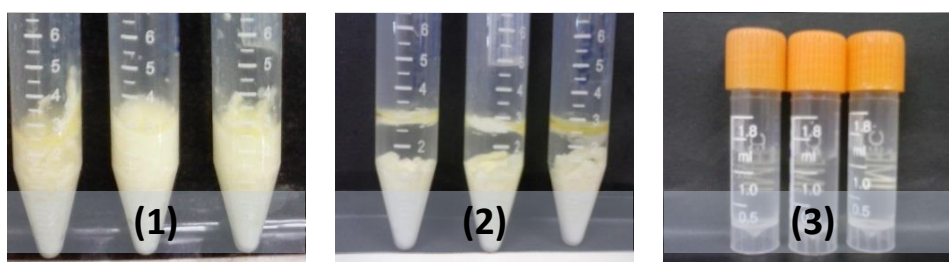
A figura a seguir apresenta as peças que compõem o rotor e as ferramentas necessárias para o referente empacotamento.



**Figura 10.** Peças que compõem o rotor: (G) tampa, (H) espaçador, (I) parafuso selante e (J) rotor de zircônio de 50  $\mu\text{L}$ . Ferramentas para seu empacotamento: (A) removedor da tampa, (B) funil, (C) ajustador do espaçador, (D) parafuso, (E) chave de fenda e (F) espátula. Imagem disponível em Alcântara, *et al.* (2014), p. 76.

Para as análises do extrato bruto adaptou-se a metodologia proposta por Lamanna *et al.* (2008). Um grama de amostra foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, ao qual também adicionou-se 2 mL de D<sub>2</sub>O. Em seguida, o sistema foi submetido à extração sob sonicação por vinte minutos. Após este intervalo de tempo, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 5000 rpm, mantendo-se a temperatura de 24 °C. Retirou-se, em seguida, 1,8 mL da fase intermediária (Figura 11), a qual foi novamente submetida a centrifugação nas mesmas condições. Por fim, obteve-se 1,5 mL da fase intermediária, a qual constituiu o extrato bruto para as análises de RMN, realizadas logo após o procedimento de extração. Nesse procedimento, foi utilizada uma centrífuga Sigma<sup>®</sup> Laborzentrifugen, modelo 2K15, e um aparelho de ultrassom do tipo Ultrasonic Cleaner<sup>®</sup>, modelo 08890-16.

Para a obtenção dos espectros, utilizou-se um tubo de ressonância de 5 mm onde foi adicionado 200 µL de solução 0,1% (m/v) de TMSP-d<sub>4</sub> em D<sub>2</sub>O e 400 µL do extrato bruto.



**Figura 11.** Etapas do processo de extração. (1) após ser submetida a ultrassom, (2) separação das fases após a primeira centrifugação, (3) extrato bruto após a centrifugação da fase intermediária.

A amostragem do queijo tipo mozzarella convencional foi então dividida de duas formas diferentes, uma pequena quantidade foi destinada às análises de RMN, tanto via HR-MAS quanto para se realizar os extratos, e o restante do queijo da foi destinado às análises físico-químicas, nas quais seria necessário um maior volume de amostra.

### 3.4 Preparo de amostras para as análises Físico-Químicas

Estas análises foram realizadas apenas com o queijo tipo mozzarella convencional. Partes das mesmas amostras utilizadas nas análises de RMN foram destinadas às análises físico-químicas.

Com o intuito de obter maior rigor e qualidade nas análises físico-químicas, buscou-se estabelecer parceria com um laboratório que possui certificação para análise de alimentos. Esta parceria foi estabelecida com o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) situado na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ - UFG). Foram feitas análises de gordura total, proteína total e pH (potencial hidrogeniônico), semanalmente e no mesmo dia das análises de RMN de  $^1\text{H}$ , de cada amostra mantida em diferentes condições de refrigeração.

Para a análise de produtos lácteos, o CPA emprega métodos analíticos físico-químicos em acordo com a normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 do MAPA.

A marcha analítica da análise de pH seguiu-se medindo em torno de 5g da massa da amostra (em duplicata) em um béquer de 50 mL, onde posteriormente foi adicionado 20 mL de água destilada. Após a homogeneização da mistura, realizada de modo a obter uma pasta homogênea, foi utilizado um pHmetro de bancada (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo orion 3star), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7, para medir o pH da amostra. A leitura/anotação do valor obtido foi realizada em triplicata, contendo no laudo apenas o valor médio.

A análise de gordura total foi realizada por meio do método butirométrico de Gerber para queijos, também em duplicata. Inicialmente, pesou-se 3 g da amostra diretamente no copo do butirômetro que, em seguida, foi acoplado na sua parte inferior ficando devidamente vedado. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de água destilada, 10 mL da solução de ácido sulfúrico com densidade de  $1,605 \text{ g.cm}^{-3}$  e 1 mL de álcool isoamílico com  $0,81 \text{ g.cm}^{-3}$  de densidade. A mistura foi então levada a banho-maria no próprio butirômetro a uma temperatura em torno de  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  e, posteriormente, foi agitada cuidadosamente para uma melhor

dissolução da amostra. Após total dissolução, adicionou-se água até atingir a última marcação do butirômetro para, em seguida, centrifugá-lo a 1200 rpm, o que permite medir o teor de gordura total no próprio butirômetro por meio da observação da separação das gorduras dos demais componentes do queijo. Esse valor é então convertido em teor de g/100g baseando-se na percentagem de gordura em relação a massa total da amostra.

As proteínas contidas no queijo também foram quantificadas reagindo outros 5 g de amostra (também em duplicatas) com ácido sulfúrico de alta pureza por meio do aquecimento gradativo da mistura (digestão). Assim, o sulfato de amônio formado foi posteriormente destilado e, a partir da liberação de amônia fixada em solução ácida, realizou-se uma titulação. A destilação foi realizada de forma automatizada por meio de um aparelho digestor e destilador micro-Kjeldahl (Gerhardt<sup>®</sup>, modelo Vapodest 30S) e, para a titulação, utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico 0,05 M. Após a titulação, em duplicata, o cálculo da quantidade de proteínas totais foi realizado baseando-se no volume de ácido gasto.

### **3.5 Experimentos de RMN**

As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T, situado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. As sondas utilizadas foram a de <sup>1</sup>H/ <sup>13</sup>C/ <sup>31</sup>P HR-MAS de 4 mm com gradiente de campo na direção z, e uma sonda TBI de 5 mm com gradiente de campo na direção z.

Nas análises via HR-MAS, periodicamente, eram realizadas calibração do ângulo mágico utilizando KBr. Em todas as análises a sintonia foi devidamente ajustada e manteve-se o mesmo tempo médio na realização dos procedimentos, desde o preparo das amostras até a aquisição dos espectros.

### 3.5.1 Análises de RMN de $^1\text{H}$

#### 3.5.1.1 Queijo tipo mozzarella processado

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos com a sonda na temperatura de 25 °C. Foram utilizados 65536 pontos de dados (TD) e 512 varreduras utilizando a sequência de pulsos noesypr1d para a supressão do sinal da água. Para essa sequência de pulsos, foram fixados parâmetros como o *mixing time* ( $d_8$ ) de 0,2 segundos. Utilizou-se 1,43 s de tempo de espera ( $d_1$ ), tempo de aquisição (aq) de 3,27 s, pulso de excitação para a duração do pulso de  $90^\circ$  ( $p_1$ ) de 10,35  $\mu\text{s}$  (7,58 Watts) e janela espectral de 20 ppm com a frequência central do pulso no canal de  $^1\text{H}$  (o1p) em torno de 4,7 ppm. O ganho do receptor (rg) foi ajustado automaticamente obtendo um valor de 25,4, mantendo esse mesmo valor para todos os espectros adquiridos.

Os dados foram processados aplicando uma TF, ajuste automático de fase e correção automática de linha de base. Os ajustes finos de correção de fase e linha de base foram em seguida reajustados manualmente.

#### 3.5.1.2 Queijo tipo mozzarella convencional

Para as análises de RMN de  $^1\text{H}$ , tanto nas análises fazendo uso da sonda HR-MAS quanto da sonda TBI, a temperatura das sondas foi mantida a 25 °C. Utilizou-se um TD de 65536 fazendo uso da sequência de pulsos noesypr1d, com janela espectral de 25,00 ppm e o1p em torno de 4,70 ppm.

Para as análises via HR-MAS foi incluída nessa sequência de pulsos, além da supressão do sinal da água, a supressão do sinal característico de  $\text{CH}_2$  de ácido graxo com deslocamento químico em 1,29 ppm. A supressão do referente sinal foi realizada modificando a sequência de pulsos noesypr1d de modo a introduzir um pulso de pré-saturação, de onda contínua (*cw*, *continuous wave*), no segundo canal (f2, nomenclatura Bruker), que seria aplicado simultaneamente ao pulso de pré-saturação do solvente aplicado no primeiro canal (f1, nomenclatura Bruker). Para tal, as frequências nas quais seria realizada a supressão eram

previamente marcadas no espectro como o1p para supressão do solvente, e o2p para supressão do sinal do ácido graxo.

Foram fixados parâmetros como  $d_8$  de 0,20 s, 512 varreduras,  $d_1$  de 3,00 s, aq de 2,62 s,  $p_1$  de 10,26  $\mu$ s (7,58 Watts) e rg de 45,20.

Ao fazer uso da sonda TBI, foi realizada a supressão somente do sinal da água. Fixou-se parâmetros como  $d_8$  de 0,31 s, 256 varreduras,  $d_1$  de 2,00 s, aq de 2,62 s,  $p_1$  de 12,60  $\mu$ s (10 Watts) e rg de 203.

O processamento foi realizado aplicando uma TF, ajuste automático de fase e correção automática de linha de base. Os ajustes finos de correção de fase e linha de base foram em seguida reajustados manualmente. Para os dados em que foi realizada a quantificação relativa, a integração dos sinais foi realizada manualmente de modo a utilizar as mesmas regiões integradas para todos os espectros.

### **3.5.2 J-resolved**

Na dimensão das frequências do canal de  $^1\text{H}$  (F2), utilizou-se um TD de 32768, aq de 1,31 s,  $d_1$  de 2,00 s,  $p_1$  de 12,60  $\mu$ s e janela espectral de 25,00 ppm com o1p em 4,70 ppm. Já na dimensão dos multipletos de acoplamento  $J$  (F1), utilizou-se um TD de 40, aq de 0,26 s e janela espectral de 0,16 ppm. Realizou-se, em média, 56 varreduras na aquisição dos espectros. Esses parâmetros foram os mesmos tanto para as análises fazendo uso da sonda HR-MAS, quanto para as análises em TBI.

Após a transformada de Fourier, realizou-se a correção de linha de base na dimensão F2 e, posteriormente, aplicou-se o algoritmo *tilt* de  $45^\circ$  para permitir que todos os sistemas de spins com acoplamento  $J$  da dimensão F1 ficassem ortogonais aos deslocamentos químicos na dimensão F2, eliminando os sinais fora das respectivas ressonâncias. Posteriormente, a linha de base foi novamente corrigida, e então, a simetriação do espectro em relação a  $J = 0$  Hz foi realizada (*symJ*).

### **3.5.3 HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)**

#### **3.5.3.1 Queijo tipo mozzarella processado**

Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros HSQC foram, para a dimensão de domínio direto (F2), janela espectral de 20,00 ppm com  $\rho_1$  em 4,70 ppm,  $p_1$  de 10,30  $\mu$ s (7,5 Watts), TD de 4096,  $d_1$  de 1,00 s e aq de 0,20 s. Já na dimensão de domínio indireto (F1), foi utilizada um janela espectral de 300,00 ppm com pulso na frequência central do pulso no canal de  $^{13}\text{C}$  ( $\rho_2$ ) em 100,00 ppm, duração do pulso de  $90^\circ$  ( $p_2$ ) de 17,80  $\mu$ s (88,67 Watts), TD de 256 e aq de 0,003 s. Nessa sequência de pulsos foi incluída somente a supressão do sinal da água e realizadas 140 varreduras.

O processamento dos dados foi realizado aplicando uma TF de modo a correlacionar os 4096 pontos de dados da dimensão F2 com os 256 pontos de dados da dimensão F1, obtendo o espectro bidimensional HSQC das correlações das frequências de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Posteriormente realizou-se a correção das fases manualmente.

#### **3.5.3.2 Queijo tipo mozzarella convencional**

Para as análises em que se fez o uso da sonda HR-MAS os parâmetros utilizados foram os mesmos dos espectros tipo HSQC obtidos para o queijo tipo mozzarella processado, exceto pela janela espectral da dimensão F2 que foi de 25 ppm,  $p_1$  de 10,26  $\mu$ s (7,58 Watts) e 76 varreduras.

Nas análises via TBI, na dimensão F2, o  $p_1$  utilizado foi de 9,85  $\mu$ s (14,72 Watts),  $d_1$  de 0,1 s, aq de 0,2 s e TD de 4096. Já na dimensão F1, o aq utilizado foi de 0,003 s,  $p_1$  de 17,82  $\mu$ s (88,67 Watts), TD de 256, janela espectral de 300 ppm com ( $\rho_2$ ) em 100 ppm. Na obtenção desses espectros, utilizando o mesmo método de dupla supressão realizado para os espectros unidimensionais apresentado na seção 3.5.1.2 (página 48), foram suprimidos também os sinais da água e de  $\text{CH}_2$  de ácido graxo com deslocamento químico em 1,29 ppm, utilizando 52 varreduras.

Os dados foram processados ao aplicar uma TF que correlacione as duas dimensões, e posterior correção de fase realizada manualmente.

### 3.6 Análise de Componentes Principais

As Análises de Componentes Principais (*PCA*) foram realizadas somente para os dados do queijo tipo mozzarella processado. Para tal foi utilizada a deconvolução de referência, sendo considerado um fator crucial para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados, baseando-se nos estudos de Ebrahimi *et al.* (2014). Dessa forma, a título de avaliar tal melhoria, foram realizados cálculos de *PCA* para os referentes dados com e sem o uso da deconvolução de referência.

Para os dados em que não se fez o uso da deconvolução de referência, os espectros foram processados por meio do software Bruker BioSpin GmbH, versão 3.1, utilizando *line broadening (lb)* de 0,3 Hz além da correção manual de fase, linha de base e calibração da referência interna (TMSP-d<sub>4</sub>) em 0,00 ppm. Os espectros foram então exportados no formato txt e posteriormente importados para o software Matlab R2015a<sup>®</sup>, versão 8.5.0 *trial* (MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) disponível gratuitamente por trinta dias, onde foram calibrados e alinhados. Nesse software as regiões referentes às extremidades dos espectros (14,0 a 11,0 ppm e 0,4 a -5,0 ppm) e de sinais referentes a supressão do solvente (5,20 a 4,49 ppm), foram removidas. A matriz de dimensão 16x25947 foi exportada no formato txt e, em seguida, importada pelo software *The Unscrambler X<sup>®</sup>*, versão 10.3 *trial* disponível gratuitamente por trinta dias, onde os dados foram normalizados em relação à área dos espectros e centrados na média para posterior cálculo utilizando cinco PCs.

Para os dados em que se fez o uso da deconvolução de referência, utilizou-se o software DOSYtoolbox versão 1.5 disponível gratuitamente pelo site dosytoolbox.chemistry.manchester.ac.uk (DOSY, 2012). Os FID's dos referentes espectros foram importados para o software onde automaticamente era aplicada a TF. Os processamentos, bem como a deconvolução de referência, foram realizados somente em um espectro por vez, no qual se realizava a calibração do

sinal de referência utilizado na deconvolução (TMSP-d<sub>4</sub>) em 0,00 ppm, correção de fase e linha de base. No cálculo do algoritmo foram utilizados os valores 1,4 e -2,2 Hz, correspondentes às formas de linhas lorentziana e gaussiana, respectivamente, e após o cálculo, obteve-se uma largura de linha para o sinal de referência de 0,04 Hz. Tal procedimento possibilitou a reprodutibilidade da largura à meia altura de todos os espectros. Os espectros deconvoluídos foram então exportados no formato txt e posteriormente importados para o software Matlab, no qual foi também realizada a calibração, alinhamento e corte das mesmas regiões de supressão do solvente e extremidades dos espectros realizadas para o conjunto de dados brutos. Para os dados deconvoluídos, a matriz obtida foi de dimensão 16x16210. A referente matriz foi exportada no formato txt e posteriormente importada para o software *The Unscrambler X*<sup>®</sup>, onde o cálculo da PCA foi realizada nos mesmos moldes dos dados em que não foi feito o uso da deconvolução de referência.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Otimização das condições experimentais

##### 4.1.1 Escolha da sequência de pulso

A otimização das condições experimentais foi realizada com o mesmo tipo de queijo utilizado nos estudos preliminares (queijo tipo mozzarella processado).

Inicialmente, visando análises via HR-MAS, foram realizados experimentos de modo a escolher a sequência de pulsos a ser utilizada. Optou-se por realizar estas análises utilizando D<sub>2</sub>O, pois além de ter sido realizado testes com outros solventes (seção 4.1.3), verificando que este seria o mais adequado, em outros trabalhos presentes na literatura que envolve análises de queijos via RMN, o D<sub>2</sub>O é o solvente mais utilizado. Em função de ter sido observado um intenso sinal de água ao se utilizar uma sequência de pulso simples, com apenas um pulso de 30° (zg30, nomenclatura Bruker), foram testadas sequências de pulsos que permitem a supressão do sinal da água (Figura 12).

Considerando a constituição química da matriz, a qual é caracterizada principalmente pela presença de ácidos graxos e proteínas, e tendo em vista a pretensão de se adquirir espectros com boa resolução e bom formato de linha de base, foram testadas sequências de pulso que atendessem a essa expectativa.

Uma das sequências testadas foi a unidimensional *Carr - Purcel - Meiboom – Gill* (CPMG), ou cpmgpr1d na nomenclatura usada pela Bruker, que constitui as etapas: delay de reciclagem – pulso de 90° - (d<sub>20</sub> – pulso de 180° - d<sub>20</sub>)<sub>l4</sub> - aquisição. Esta sequência tem como característica minimizar o efeito da intensidade e largura de sinais oriundos de moléculas com T<sub>2</sub> curto (rápida relaxação), auxiliando na identificação e atribuição dos sinais (CLARIDGE, 2009). Para esta sequência de pulso um dos parâmetros otimizados é chamado l<sub>4</sub> (*loop* para o filtro do decaimento da magnetização transversal), cujos valores testados foram 64, 128, 192, 224, 256. O outro parâmetro otimizado é chamado d<sub>20</sub> (tempo de eco fixado para a eliminação dos efeitos de acoplamento) cujos valores

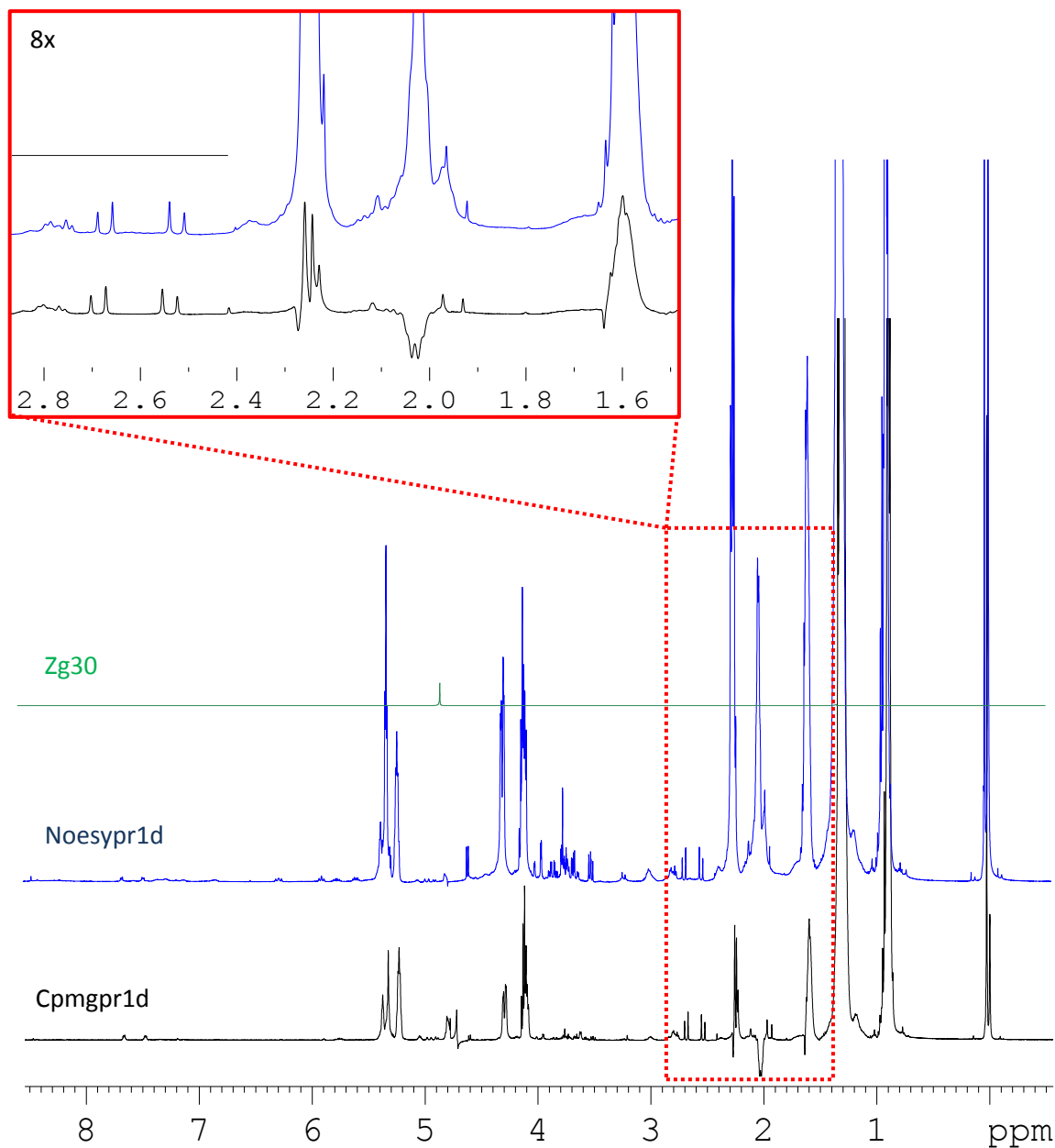
testados foram 1 ms, 1,5 ms, 2 ms, 2,5 ms, 3 ms. Para essa otimização foram realizados 25 experimentos, do modo que cada um dos valores de  $I_4$  foram combinados com cada um dos valores de  $d_{20}$ . A melhor combinação para esses dois parâmetros, a saber,  $I_4$  igual a 64 e  $d_{20}$  igual a 1,5 ms, foi definida pela inspeção visual dos espectros. A figura 12 mostra o espectro adquirido fazendo uso dos valores citados acima.

A outra sequência testada foi a unidimensional *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY), ou *noesypr1d* na nomenclatura usada pela Bruker, que constitui as etapas: delay de reciclagem - pulso de  $90^\circ$  - pulso de  $90^\circ$  - tempo de mistura ( $d_8$ ) - pulso de  $90^\circ$  - aquisição. Esta sequência é caracterizada na literatura por apresentar alta qualidade na supressão do sinal da água e consistência nos resultados sendo, portanto, mais indicada para a quantificação de metabólitos (McKAY, 2011). Para essa sequência de pulso otimizou-se o parâmetro  $d_8$  (*mixing time*), utilizando os valores 0,1 s, 0,15 s, 0,2 s, 0,25 s e 0,3 s. A escolha do melhor valor de  $d_8$  (0,2 s) foi feita, novamente, com base na inspeção visual dos espectros. A figura 12 mostra o espectro adquirido utilizando esse valor.

Os espectros apresentados na figura 12 encontram-se na mesma escala. Ao compará-los, verificou-se que na sequência *zg30* nenhum sinal da amostra é observável nessa escala, aparecendo somente o sinal da água, em torno de 4,7 ppm, que se sobressai em comparação aos sinais da amostra devido ao ganho do receptor ser ajustado em relação a intensidade do sinal do solvente. A sequência de pulso *cpmgpr1d* apresentou problemas de fase em alguns sinais compreendidos entre 1,24 a 1,60 ppm (destaque na figura 12).

Ao se comparar as duas sequências de supressão testadas pôde-se observar que a *noesypr1d* apresentou vantagens por apresentar maior número de sinais, maior resolução e melhor relação sinal/ruído, possivelmente, devido ao fato de a supressão do sinal da água ser mais efetiva para essa sequência de pulso. A escolha ideal do  $d_8$  trata-se do ajuste do tempo de espera de uma segunda pré-saturação do sinal de interesse após uma série de pulsos, para garantir que a magnetização proveniente da relaxação durante os pulsos iniciais seja novamente suprimida. Em especial, no caso da água, esse ajuste é

necessário para aprimorar a supressão, evitando efeitos como o *radiation damping*, e realizando um experimento que garanta a máxima relaxação dos spins de interesse e a mínima relaxação dos spins do solvente (McKAY, 2011).



**Figura 12.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do queijo tipo mozzarella processado fazendo uso da sonda HR-MAS e utilizando as seqüências de pulso *cpmgpr1d* (em preto), *noesypr1d* (em azul) e *zg30* (em verde). O destaque evidencia as regiões do espectro que apresentaram problemas de fase quando se utilizou a seqüência *cpmgpr1d*.

#### **4.1.2 Otimização do tempo de intumescimento, massa da amostra e velocidade de giro para as análises via HR-MAS**

Seguindo com as otimizações, foram averiguados aspectos como intumescimento da amostra, massa e velocidade de giro. Quanto ao intumescimento, que se trata do tempo necessário para promover maior contato entre amostra e solvente visando maior mobilidade molecular, independente das velocidades de giro e massas testadas, verificou-se que não houve variação no perfil químico entre os espectros das amostras com encharcamento de 35 minutos, 1 hora e 2 horas. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nos espectros referentes às massas de 15 e 30 mg, e giro de 5 e 7 kHz.

A escolha da velocidade de giro foi baseada no manual de aplicações de HR-MAS da Bruker, versão 1.0, que sugere um giro de no máximo 5000 Hz para um espectrômetro de 500 MHz. O recomendado é que a velocidade de rotação corresponda ao equivalente de 8 a 10 ppm, pois giros acima dessa faixa podem gerar bandas laterais de giro junto a sinais de prótons da amostra que podem resultar em dificuldades ou mesmo em atribuições errôneas, além do fato de que altas taxas de giro pode acarretar no aquecimento da amostra, resultando na degradação da mesma, ou em problemas na reprodutibilidade dos espectros, sendo este último um aspecto fundamental para análises quantitativas ou quimiométricas (MAAS, 1997).

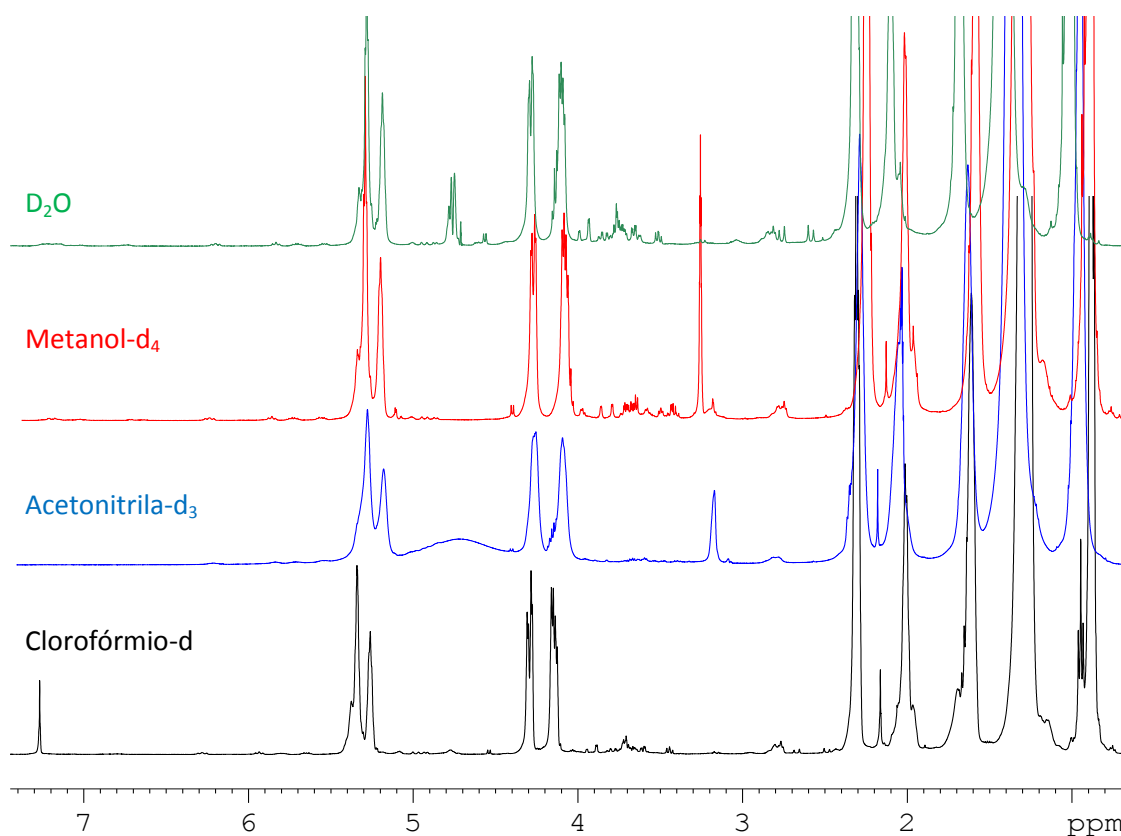
#### **4.1.3 Escolha do solvente**

Embora em pesquisas presentes na literatura envolvendo análise de queijos via RMN seja feito o uso de D<sub>2</sub>O como solvente, visando análises via HR-MAS, foram realizados testes também em clorofórmio-d, acetonitrila-d<sub>3</sub> e metanol-d<sub>4</sub>.

Conforme apresentado na figura 13, ao se comparar os espectros obtidos em diferentes solventes, estando todos na mesma escala, observou-se que o espectro usando acetonitrila-d<sub>3</sub> apresentou sinais muito largos e de baixa resolução. Já o espectro obtido ao utilizar clorofórmio-d como solvente, notou-se

uma melhoria significativa na forma dos sinais, entretanto, o sinal do respectivo solvente em torno de 7,24 ppm apareceu em uma região onde observa-se sinais da amostra quando se utilizou D<sub>2</sub>O como solvente.

Comparando os espectros utilizando metanol-d<sub>4</sub> e D<sub>2</sub>O, os quais apresentaram melhores resultados, verificou-se uma maior presença de sinais da amostra utilizando D<sub>2</sub>O como solvente como, por exemplo, os dubletos do citrato em torno de 2,6 ppm. Desta forma, optou-se pelo uso do D<sub>2</sub>O para prosseguir com o estudo, pois além de ter apresentado maior número de sinais, trata-se de um solvente com maior viabilidade econômica que o metanol-d<sub>4</sub>.



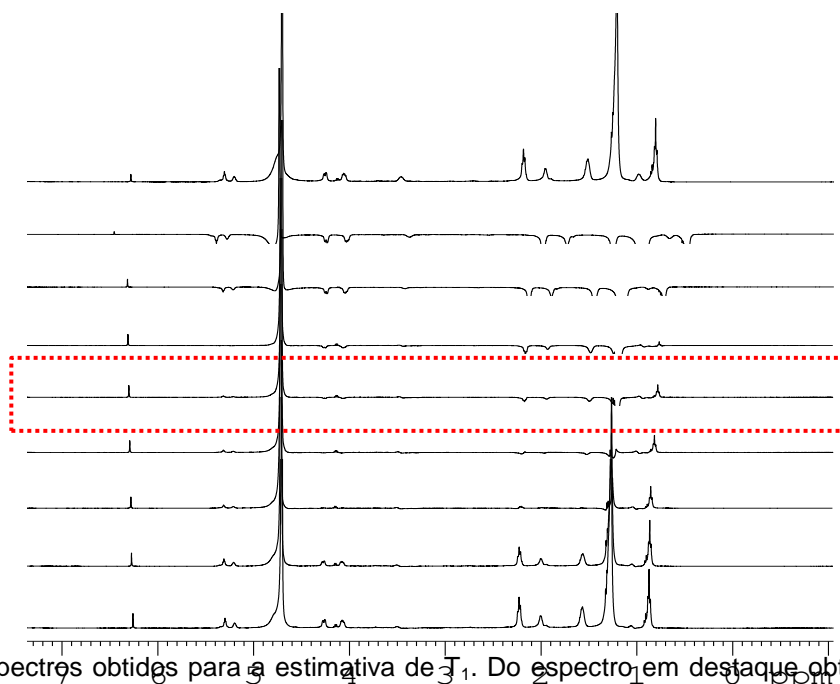
**Figura 13.** Espectros do queijo tipo mozzarella utilizando clorofórmio-d, acetonitrila-d<sub>3</sub>, metanol-d<sub>4</sub> e D<sub>2</sub>O.

#### 4.1.4 Determinação de T<sub>1</sub>, p<sub>1</sub> e otimização do número de varreduras

Após a escolha da sequência noesypr1d e posterior escolha do solvente, seguiu-se com a otimização das varreduras buscando-se obter a melhor relação

sinal/ruído (100:1) no menor tempo de aquisição. Para tal, foram adquiridos experimentos com 128, 256, 512 e 1024 varreduras, verificando que o experimento com 512 varreduras atendia a relação sinal/ruído pretendida para a maioria dos sinais nas análises via HR-MAS, e 256 varreduras para as análises via TBI.

O tempo de relaxação longitudinal, que se trata do tempo de espera ( $d_1$ ) mais tempo de aquisição ( $aq$ ), foi adquirido de modo a respeitar sete vezes a constante  $T_1$ , de modo a obter o máximo da recuperação da magnetização após um pulso de excitação de  $90^\circ$ . Assim, os valores de  $d_1$  foram obtidos a partir da estimativa de  $T_1$  (Figura 14), que se baseia em experimentos de inversão recuperação conforme apresentado no manual do usuário Bruker, versão 3.0 (BRUKER, 2010), utilizando a sequência de pulso  $t1ir1d$  (nomenclatura Bruker), e os tempos de aquisição foram definidos conforme a escolha da janela espectral.



**Figura 14.** Espectros obtidos para a estimativa de  $T_1$ . Do espectro em destaque obteve-se o  $t_{nulo}$  (período adequado para a recuperação da magnetização) utilizado no cálculo para a estimativa de  $T_1$ .

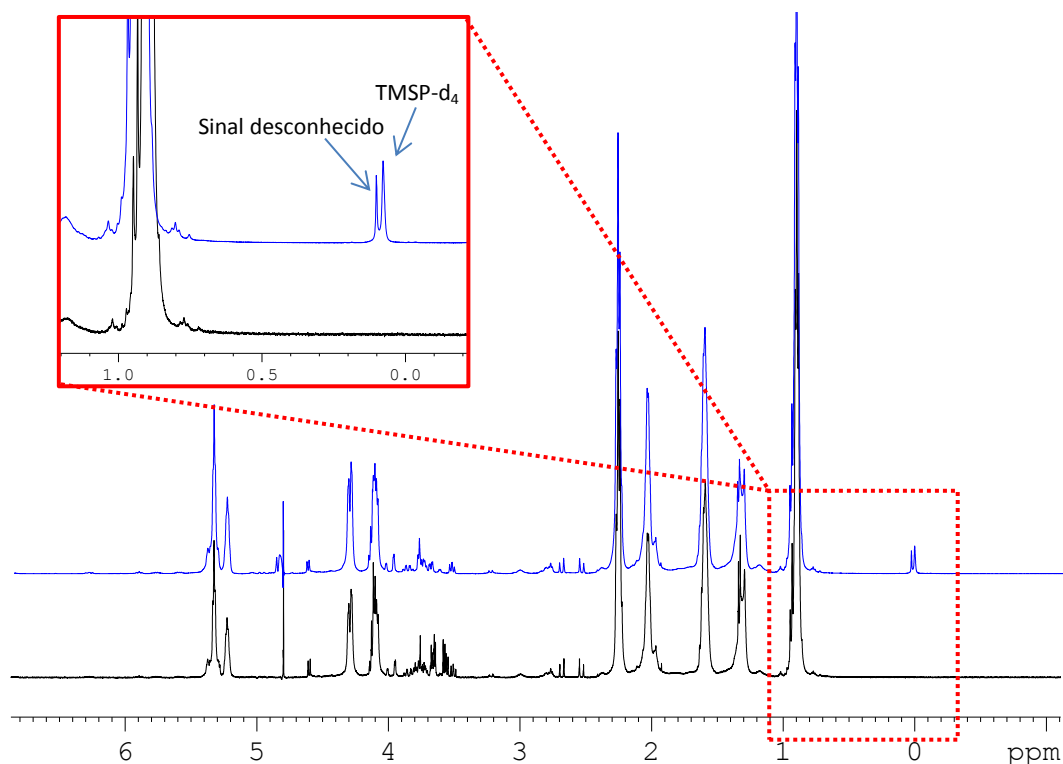
Do mesmo modo, foram ajustados os valores de potência de excitação para cada conjunto de amostras. Por meio do comando “*pop1*” (nomenclatura Bruker), foi realizada uma varredura de valores de  $p_1$  de modo a obter a maior intensidade dos sinais da amostra, escolhendo assim os valores do pulso de excitação.

#### 4.1.5 Escolha do padrão interno para quantificação

Visando as análises quantitativas, primeiramente foram realizados testes com os padrões internos solúveis em D<sub>2</sub>O disponíveis no laboratório, são eles: ácido maleico, biftalato de potássio e TMSP-d<sub>4</sub>, conforme sugerido por Pauli *et al.* (2012).

Após adquiridos os espectros com os referentes padrões, verificou-se que o uso do biftalato de potássio foi considerado inviável devido a dificuldade de se realizar o ajuste da homogeneidade do campo (*shimming*), fazendo uso da sonda HR-MAS, pois trata-se de um padrão que apresenta uma multiplicidade complexa, além de seus sinais aparecerem em um deslocamento químico que continha sinais da amostra (~7,75 ppm). O uso do ácido maleico foi descartado quando notou-se que seu caráter ácido estava influenciando muito no deslocamento químico dos sinais da amostra pois, na segunda etapa do estudo, pretendia-se avaliar o efeito do pH nas amostras durante o envelhecimento.

Por fim, optou-se pelo uso do TMSP-d<sub>4</sub>. Entretanto, foi observada uma possível interação deste com algum componente do queijo tipo mozzarella convencional ao fazer uso da sonda HR-MAS. Essa possível interação foi diagnosticada ao se adquirir um espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra somente em D<sub>2</sub>O e compará-lo com o espectro obtido utilizando D<sub>2</sub>O com 0,05% (m/v) de TMSP-d<sub>4</sub> (Figura 15).

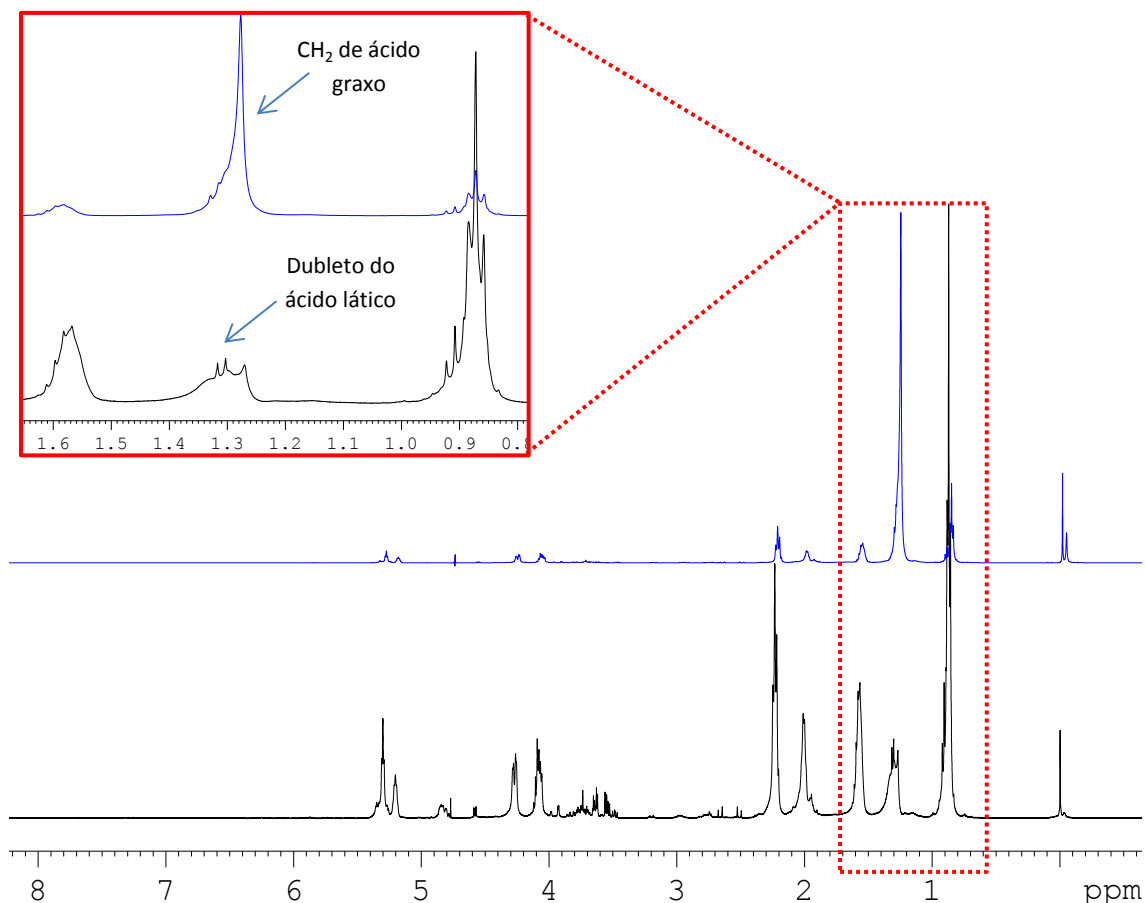


**Figura 15.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do queijo tipo mozzarella convencional somente em  $\text{D}_2\text{O}$  (em preto) e com a adição do  $\text{TMSP-d}_4$  (em azul). A região em destaque mostra o sinal próximo ao sinal do  $\text{TMSP-d}_4$  sugerindo uma possível interação do mesmo com a amostra.

Nesse sentido, vislumbrou-se utilizar o método ERETIC (*Electronic REference To access In Vivo Concentrations*) para a quantificação nos espectros obtidos fazendo uso dessa sonda. No entanto, pretendia-se realizar a quantificação somente dos mesmos sinais que seriam quantificados dos espectros dos extratos bruto, visto que nestes não foi observada essa possível interação.

Embora com esse resultado tenha sido descartada a possibilidade de quantificar os sinais dos ácidos graxos, pretendia-se avaliar se a análise do perfil químico de queijos tipo mozzarella em diferentes condições de refrigeração poderia ser realizada fazendo uso desses dois tipos de sonda. Entretanto, após adquiridos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  via HR-MAS, observou-se que muitos dos sinais que se almejava quantificar não possuíam resolução suficiente para se fazer uso do método ERETIC.

Ainda referente às análises via HR-MAS, para o queijo tipo mozzarella convencional realizou-se a supressão do sinal de CH<sub>2</sub> de ácidos graxos em 1,29 ppm (Figura 16), conforme apresentado na seção 3.5.1.2 (página 48), pois este sinal muito intenso comprometia uma melhor relação sinal/ruído do espectro além de sobrepor o dubleto do ácido láctico.



**Figura 16.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H apenas com a supressão da água (em azul), e com dupla supressão dos sinais da água e de CH<sub>2</sub> de ácido graxo (em preto). Ambos foram obtidos por meio da sequência noesypr1d e encontram-se na mesma escala.

## 4.2 Análises Físico-Químicas

A análise do pH foi considerada importante levando em conta que a acidificação do queijo afeta diretamente a qualidade e tempo de prateleira do produto (CORTEZ et al., 2008). Já as análises de proteína total e gordura total são muito importantes na determinação do perfil de textura, sabor e velocidade de maturação de queijos, visto que os diversos níveis da relação proteína/gordura

caracterizam queijos com diferentes parâmetros de fabricação (tempo de floculação e coagulação), bem como a composição final do queijo.

Nesse sentido, os teores de proteína e gordura total também são importantes para o fabricante no controle do rendimento do queijo, pois, uma vez que a proporção de proteína e gordura estejam padronizadas, as indústrias ganham vantagens em termos de otimização dos equipamentos e garantia na homogeneidade do produto (ANTUNES et al., 2010).

Assim, optou-se por realizar as análises físico-químicas com o intuito de correlacionar as variações de proteína total, gordura total e pH com as condições de refrigeração das amostras. Estas análises são as principais requeridas pelo MAPA para certificação de qualidade, de modo que se pretendia também correlacionar os resultados das análises físico-químicas com os perfis químicos obtidos das análises de RMN de  $^1\text{H}$ . Nas tabelas 2 e 3 a seguir são apresentados os resultados adquiridos das análises físico-químicas.

**Tabela 2.** Valores do potencial hidrogeniônico (pH), gordura total e proteína total (em g/100g) presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceu na refrigeração adequada.

Semanas	Gordura Total (g/100g)	Proteína Total (g/100g)	pH
0	24,87 ± 0,02	24,84 ± 0,71	5,36 ± 0,21
1 <sup>a</sup>	25,98 ± 0,40	24,79 ± 0,12	5,52 ± 0,12
2 <sup>a</sup>	24,77 ± 1,10	23,87 ± 0,13	5,61 ± 0,01
3 <sup>a</sup>	25,88 ± 0,06	23,37 ± 0,53	5,37 ± 0,04
4 <sup>a</sup>	25,88 ± 0,16	24,50 ± 0,62	5,71 ± 0,15
5 <sup>a</sup>	28,01 ± 0,31	24,42 ± 0,47	5,23 ± 0,07
6 <sup>a</sup>	25,72 ± 0,14	24,00 ± 0,00	5,09 ± 0,07
7 <sup>a</sup>	24,29 ± 0,07	24,27 ± 0,08	6,44 ± 0,06
8 <sup>a</sup>	25,27 ± 0,05	25,23 ± 0,14	5,12 ± 0,14
9 <sup>a</sup>	24,46 ± 0,14	23,98 ± 0,01	5,02 ± 0,03
10 <sup>a</sup>	25,88 ± 0,13	23,79 ± 0,04	5,24 ± 0,28
11 <sup>a</sup>	25,71 ± 0,11	23,34 ± 0,02	5,17 ± 0,12

Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 2).

**Tabela 3.** Valores do potencial hidrogeniônico (pH), gordura total e proteína total (em g/100g) presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram fora da refrigeração adequada durante as noites.

Semanas	Gordura Total (g/100g)	Proteína Total (g/100g)	pH
0	25,43 ± 0,04	24,17 ± 0,22	5,34 ± 0,18
1 <sup>a</sup>	25,96 ± 0,08	24,29 ± 0,60	5,44 ± 0,01
2 <sup>a</sup>	24,83 ± 0,01	23,23 ± 0,18	5,36 ± 0,35
3 <sup>a</sup>	24,91 ± 0,06	23,63 ± 0,04	5,12 ± 0,08
4 <sup>a</sup>	25,53 ± 0,05	25,02 ± 0,34	5,33 ± 0,38
5 <sup>a</sup>	27,62 ± 0,13	23,99 ± 0,96	5,29 ± 0,01
6 <sup>a</sup>	24,64 ± 0,05	24,06 ± 0,08	5,07 ± 0,05
7 <sup>a</sup>	24,40 ± 0,17	25,71 ± 0,28	5,14 ± 0,14
8 <sup>a</sup>	23,98 ± 0,08	24,68 ± 0,05	5,32 ± 0,18
9 <sup>a</sup>	24,14 ± 0,06	23,88 ± 0,01	5,11 ± 0,07
10 <sup>a</sup>	25,07 ± 0,02	23,62 ± 0,25	5,22 ± 0,26
11 <sup>a</sup>	25,63 ± 0,14	23,30 ± 0,42	5,23 ± 0,27

Nota: Valores expressos como média +/- desvio padrão (n = 2).

Realizando-se testes t pareados, observou-se que não há diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as amostras refrigeradas adequada ou inadequadamente, quanto aos parâmetros físico-químicos avaliados.

Em resumo, os resultados obtidos não mostram tendências nas variações dos valores obtidos de pH, gordura total e proteína total ao longo das semanas, comparando as amostras em diferentes condições de refrigeração. O fato de não ter sido possível verificar nenhuma tendência clara, indica que essas análises físico-químicas não permitem diferenciar as amostras submetidas à refrigeração adequada e inadequada estudadas.

#### 4.3 Atribuição dos sinais de RMN do queijo tipo mozzarella processado

A princípio realizaram-se as atribuições dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H. Como não se observou mudanças na composição dos sinais dos espectros adquiridos, as referentes atribuições se aplicam aos espectros de todas as amostras do queijo tipo mozzarella processado.

Para esse queijo fez-se uso somente da sonda HR-MAS, de modo que a presença dos sinais de ácidos graxos, intensos e alargados, provocou a

sobreposição parcial ou até mesmo completa de sinais. Dessa forma, conforme apresentado no espectro (figura 18), devido à intensidade dos sinais de ácidos graxos, saturados e insaturados, realizou-se uma ampliação de 24x para a visualização dos sinais no destaque A e de 10x para a visualização dos demais sinais apresentados nos destaques B, C, D e E.

A tabela 4 apresenta as atribuições realizadas utilizando apenas os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com o auxílio de banco de dados como o *The Human Metabolome Database* - HMDB (WISHART *et al.*, 2007), Chenomx NMR Suite, versão 8.1, disponível gratuitamente em sua versão para avaliação (CHENOMX, 2015), e dados da literatura (BLAISE *et al.*, 2007; MANINNA, SOBOLEV e VIEL, 2012; MOZZI *et al.*, 2013; MAZZEI e PICOLO, 2012; SHINTU e CALDARELLI, 2005; GIANFERRI *et al.*, 2007), de como a confirmar os deslocamentos químicos característicos, multiplicidades e constantes de acoplamento.

**Tabela 4.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  ( $\delta$   $^1\text{H}$ ), valores de acoplamento ( $J$ ) e multiplicidade ( $m$ ) de alguns compostos presentes no queijo tipo mozzarella processado<sup>a</sup>.

Composto	$\delta$ $^1\text{H}$ ( $m^b$ , $J\text{Hz}$ )	Grupo (posição)
Formiato	8,46 (s)	CH
Lactose	5,25 (d, 3,8)	$\text{CH}_{\alpha\text{-anomérico}}$ (1)
	4,68 (d, 7,9)	$\text{CH}_{\beta\text{-anomérico}}$ (1)
$\beta$ -galactose	4,46 (d, 7,6)	$\text{CH}_{\beta\text{-anomérico}}$ (7)
	4,60 (d, 7,8)	CH (1)
Lactato	4,13 (q, 6,9)	CH (2)
Citrato	2,71 ( $d_{\text{AB}}$ , 16,4)	$\text{CH}_2$ (2,4)
	2,52 ( $d_{\text{AB}}$ , 16,4)	$\text{CH}_2$ (4,2)
Sucinato	2,41 (s)	$\text{CH}_2$ (2,3)
Acetato	1,92 (s)	$\text{CH}_3$
Sorbato	1,82 (d, 6,6)	$\text{CH}_3$
Etanol	1,18 (t, 6,7)	$\text{CH}_3$

Continuação da tabela 4

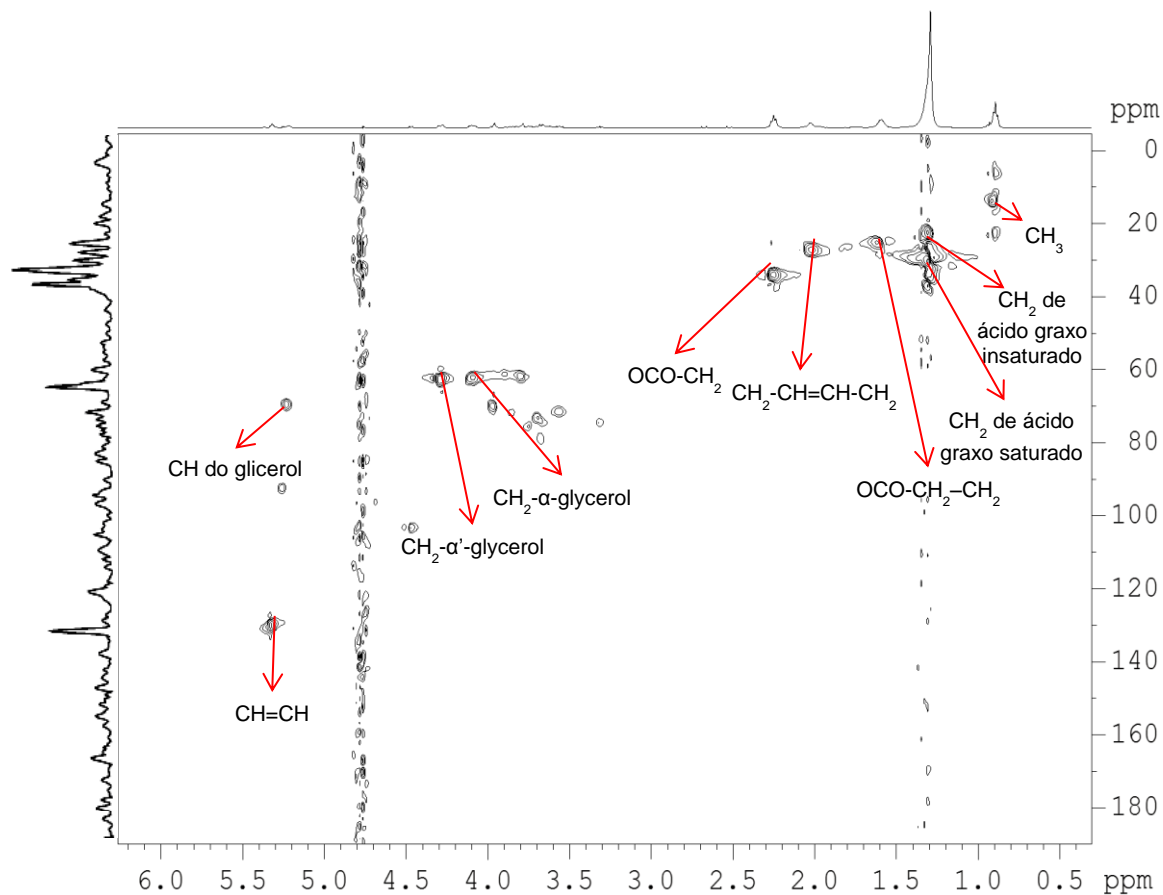
Ácidos Graxos	0,91; 1,29; 1,59; 2,25 (não definidas)	CH <sub>3</sub> ; CH <sub>2</sub> ; OCO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ; OCO-CH <sub>2</sub>
Ácidos Graxos Insaturados	1,30; 2,02; 5,32 (não definidas)	CH <sub>2</sub> ;CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> ; CH=CH
Triglicerídeos	4,09; 4,29; 5,22 (não definida)	CH <sub>2</sub> -α-glycerol; CH <sub>2</sub> -α'- glicerol; CH-glicerol

<sup>a</sup>deslocamentos químicos são relatados usando como referência o singlete do TMS-*d*<sub>4</sub> em 0,00 ppm.

<sup>b</sup>multiplicidades: s, singlete; d, dublete; *d*<sub>AB</sub>, dubletos com acoplamento de segunda ordem de um sistema AB; t, tripleto; q, quadrupeto; m, multipeto.

No caso dos ácidos graxos e triglicerídeos, que não apresentaram multiplicidade definida, seus grupos característicos foram confirmados pelo mapa de correlação HSQC (figura 17). Dos ácidos graxos insaturados encontrou-se as correlações referentes aos grupos CH=CH em 5,32 ppm e 130 ppm, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub> em 2,02 ppm e 27 ppm e seus grupos CH<sub>2</sub> com correlações em 1,30 ppm e 21 ppm. Já para os ácidos graxos saturados, as correlações dos grupos OCO-CH<sub>2</sub> aparecem em 2,25 ppm e 34 ppm, dos grupos OCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> em 1,59 ppm e 25 ppm, e para seus grupos CH<sub>2</sub> em 1,29 ppm e 30 ppm e, por fim, as correlações dos grupos metílicos apresentaram-se em 0,91 ppm e 13,2 ppm. Para os triglicerídeos, as correlações foram em 5,22 ppm e 69,5 ppm para os grupos CH do glicerol, 4,09 ppm e 62 ppm para o CH<sub>2</sub>-α-glycerol, e 4,29 ppm e 62 ppm para os grupos CH<sub>2</sub>-α'-glicerol, condizente com os resultados obtidos por Shintu, Ziarelli e Caldarelli (2004) no estudo do queijo parmigiano reggiano fazendo uso da sonda HR-MAS.

Como para esse tipo de queijo foram realizados experimentos fazendo uso somente da sonda HR-MAS, devido aos intensos sinais dos triglicerídeos e ácidos graxos, não foi possível verificar no mapa de correlação HSQC as correlações dos demais compostos presentes na tabela 4.



**Figura 17.** Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) para as atribuições dos ácidos graxos presente no queijo tipo mozzarella processado.

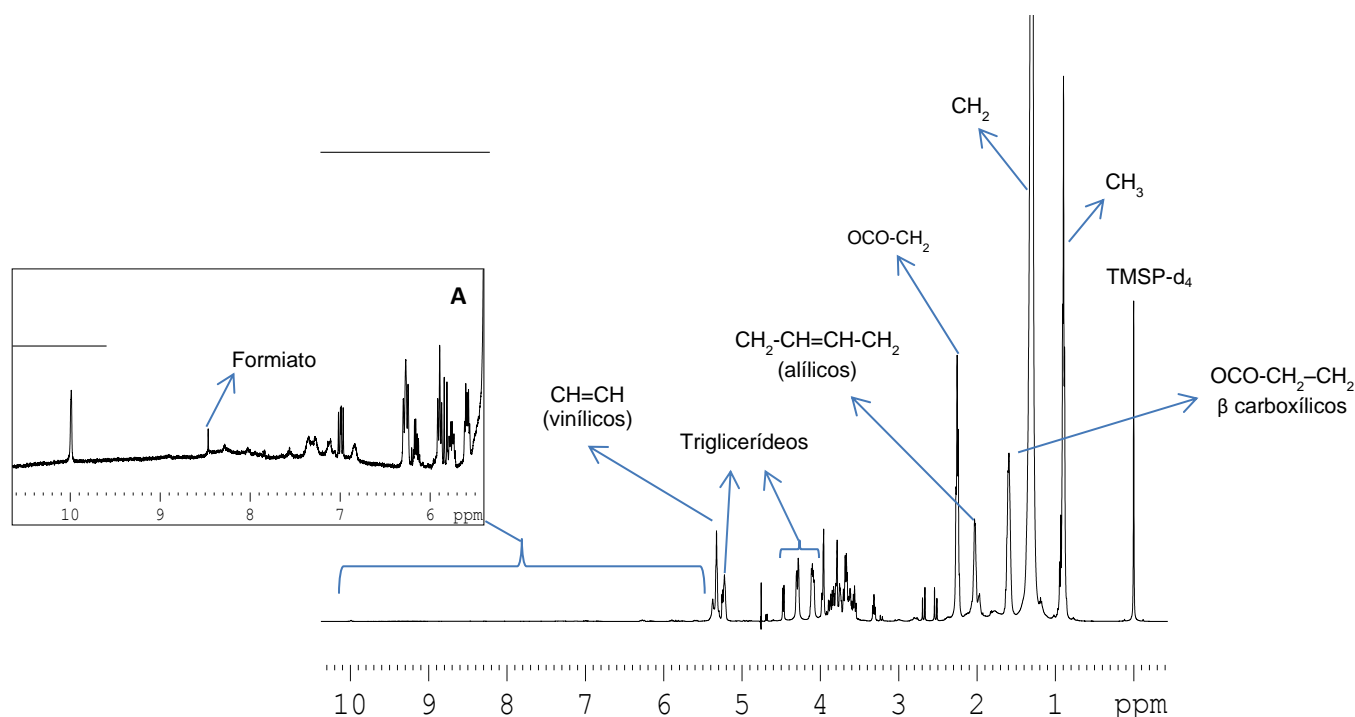
Para atribuir os sinais do citrato, característicos de acoplamento de segunda ordem de um sistema AB, realizou-se os cálculos dos deslocamentos químicos conforme proposto por Reich (2015).

Em sistemas de primeira ordem os valores de  $J$  são diretamente mensuráveis, de modo que esses sistemas só são formados se as diferenças de deslocamentos químicos dos prótons forem grandes em comparação com as constantes de acoplamento entre eles, caso contrário, os efeitos de segunda ordem aparecem. Dessa forma, quanto menor a diferença de deslocamento químico em relação a  $J$ , o efeito de segunda ordem torna-se mais pronunciado (REICH, 2015).

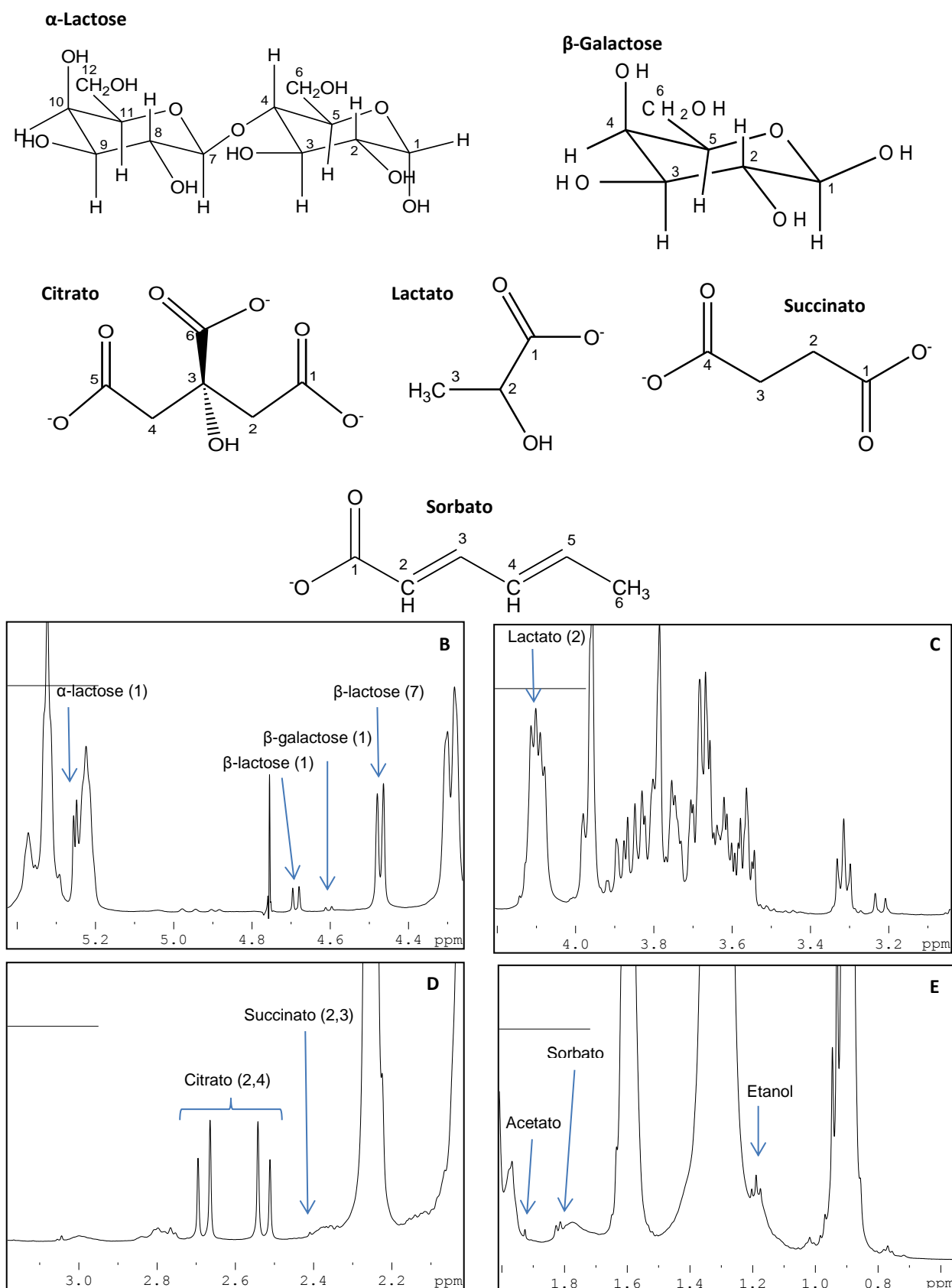
Em outras palavras, sempre que a constante de acoplamento entre dois núcleos for semelhante em magnitude ao deslocamento químico entre eles, o sistema de multiplicidade dos spins torna-se complexo. Entretanto, quanto maior a frequência do espectrômetro maior o espalhamento dos sinais, facilitando a compreensão desse sistema (REICH, 2015).

Cada sistema de spins de segunda ordem possui uma denominação que indica a forma com que os spins se acoplam e como se deve proceder na determinação de  $J$  e  $\delta$ . Um sistema AB, por exemplo, significa que o  $J$  pode ser medido diretamente, mas o  $\delta$  deve ser calculado, enquanto que em outros sistemas de spins pode ser necessário realizar cálculos computacionais para a definição dessas grandezas (REICH, 2015).

Sobre os espectros adquiridos, como não foi identificada a presença de novos sinais ou ausência de algum sinal ao longo do tempo a partir de uma inspeção visual dos espectros, levou-se em conta que as variações na concentração poderiam ser responsáveis por uma possível diferenciação entre as amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração, optando-se pelo uso da quimiometria nesse estudo inicial.



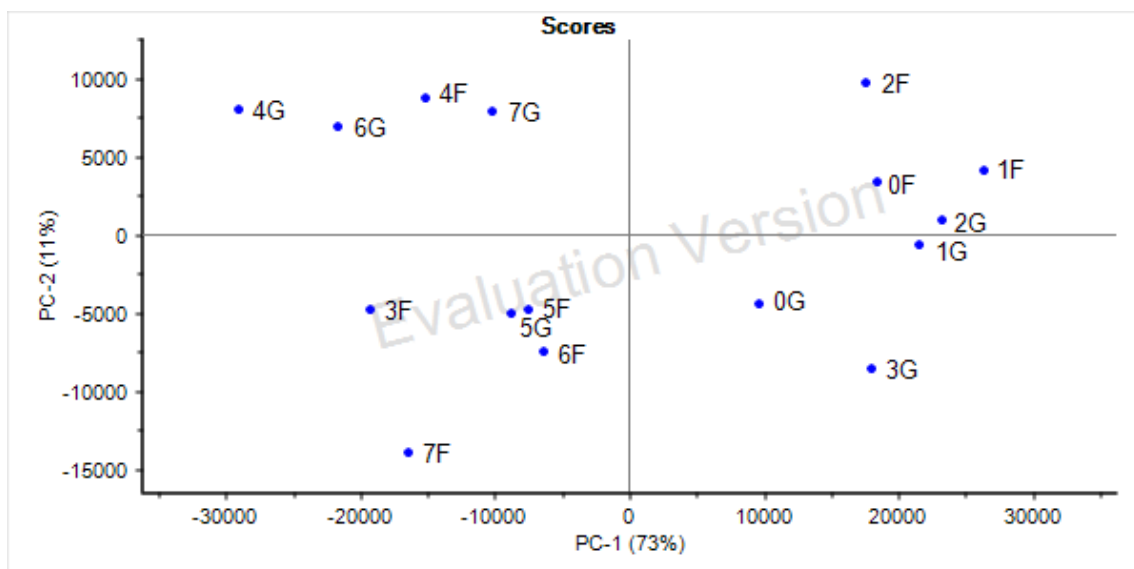
**Figura 18.** Principais constituintes do queijo tipo mozzarella processado. Com exceção do destaque **A** (região de 10,5 a 5,5 ppm), os demais sinais são característicos de ácidos graxo saturados, insaturados e triacilglicerídeos.



**Figura 19.** Destaques do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do queijo analisado. A região B compreende de 5,3 a 4,3 ppm, a região C de 4,2 a 3,1 ppm, a região D de 3,2 a 2,1 ppm e por fim, a região E de 2,0 a 0,6 ppm. Os números entre parênteses correspondem aos hidrogênios das correspondentes posições das moléculas.

#### 4.4 Análise quimiométrica dos dados de RMN do queijo tipo mozzarella processado

Na análise de componentes principais, observou-se uma importante separação em PC1, tanto para os dados deconvoluídos quanto para os dados não deconvoluídos. Essa separação é evidenciada na figura 20, que mostra o gráfico de scores (do inglês, pontos) de toda a região espectral dos espectros adquiridos de todas as amostras. Para esses dados fez-se o uso da deconvolução de referência, sendo 73% dos dados explicados pela PC1 e 11% pela PC2.



**Figura 20.** Gráfico de scores, PC1 x PC2, dos dados referentes a todas as regiões espectrais dos dados deconvoluídos. Os scores correspondem às amostras que permaneceram sob refrigeração adequada de zero a 7 semanas (0G a 7G) e às amostras que foram submetidas à refrigeração inadequada de zero a 7 semanas (0F a 7F).

Os scores no eixo positivo de PC1, referem-se às amostras que permaneceram na refrigeração adequada de zero a 3 semanas (0G a 3G) e às amostras que ficaram na refrigeração inadequada de zero a 2 semanas (0F a 2F). No eixo negativo de PC1, foram agrupadas as amostras submetidas à refrigeração inadequada de 3 a 7 semanas (3F a 7F) e de 4 a 7 semanas (4G a 7G) para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada. A separação observada ao longo de PC1, sugere que mudanças nas amostras analisadas a partir de 3 e 4 semanas podem estar relacionadas às diferentes condições de refrigeração, e que mudanças entre as amostras analisadas até 2 a 3 semanas não foram significativamente pronunciadas, lembrando que a 7ª semana corresponde a última semana dentro do prazo de validade dessa amostra.

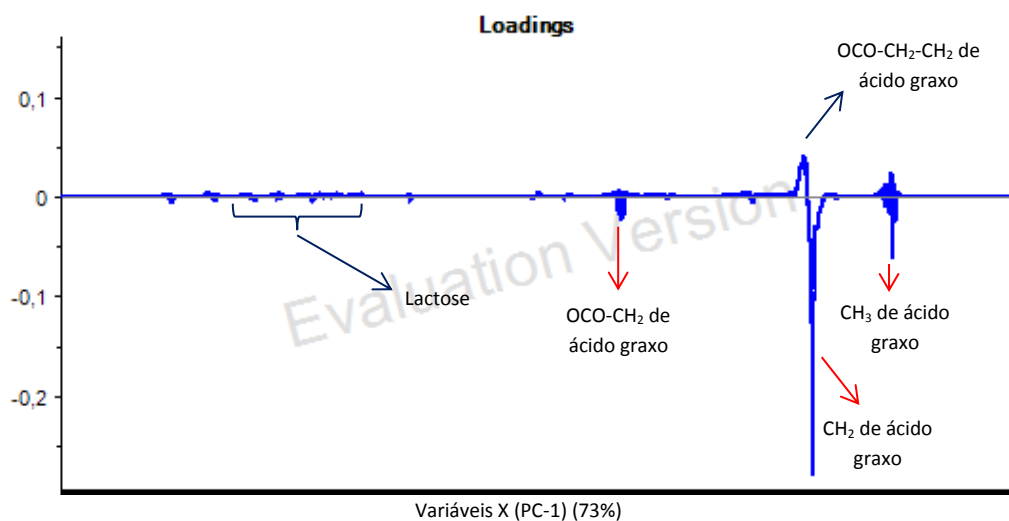
A partir dessa análise inicial, observa-se que a atividade enzimática inerente desse alimento, não se correlaciona às condições de refrigeração. Esse fato pode estar relacionado à presença de bactérias psicotróficas, que são capazes de se proliferar a baixas temperaturas. Os principais grupos dessas bactérias são os *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (gram-negativas), *Clostridium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (gram-positivas), bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e algumas estirpes de *Bacillus cereus* isoladas do leite (ARCURI *et al.*, 2008).

A maioria dessas bactérias não resiste à pasteurização ou processos térmicos mais drásticos, no entanto, psicotróficas do gênero *Bacillus* são resistentes a tais processos (MAZIERO, VIANA e BERSOT, 2010), de modo que, o principal fator a se levar em conta para garantir o mínimo de contaminação por psicotróficas baseia-se em boas práticas de higiene durante a fabricação do produto. No entanto, mesmo ocorrendo a inativação dos psicotróficos por pasteurização, as enzimas hidrolíticas são termorresistentes a esse processo, permanecendo ativas (ARCURI *et al.*, 2008).

Nessa perspectiva, levando-se em conta que têm sido relatados elevados níveis dessas bactérias no leite bovino em diferentes regiões do Brasil (PINTO, MARTINS e VANETTI, 2006), a separação observada na figura 20 pode estar relacionada à presença destes microorganismos no queijo. Essas bactérias produzem proteases, lipases e fosfolipases que hidrolisam a proteína e gordura do leite e seus derivados (ARCURI *et al.*, 2008). Deste modo, o fato de também se desenvolverem em temperaturas entre 0 e 7 °C (FRANK *et al.*, 1992 *apud* ARCURI *et al.*, 2008), sugere que mesmo os queijos que permaneceram na refrigeração adequada podem ter sofrido degradação devido a ação de bactérias psicotróficas ou a presença de suas enzimas.

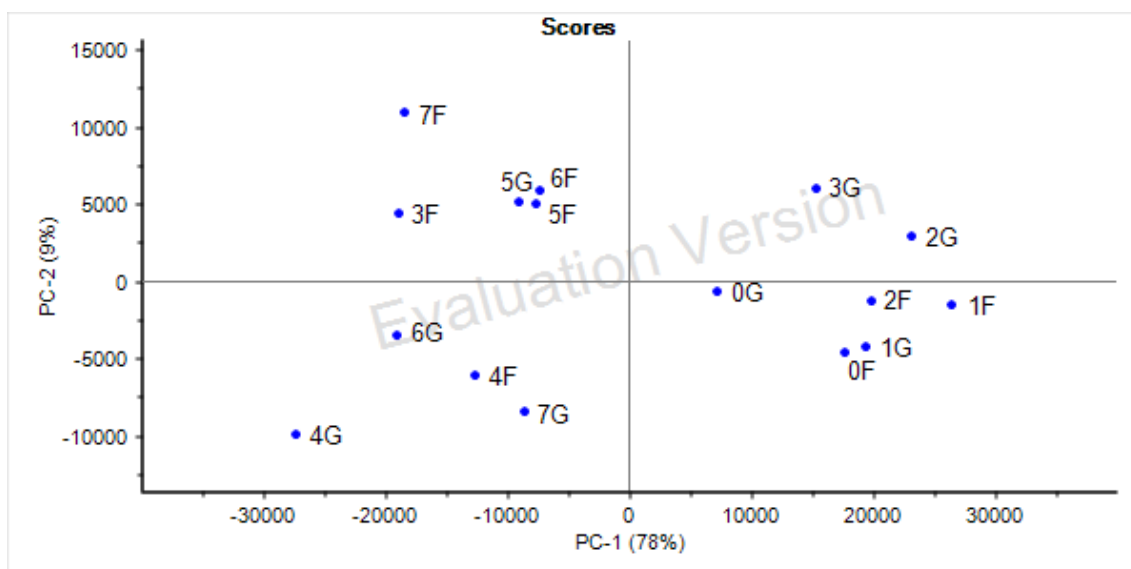
Na análise dos gráficos de *loadings* (do inglês, carregamento/peso) de todo o espectro, nota-se que os sinais característicos de CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> de ácidos graxos, e α carboxílicos de ácidos graxos, possuem relação com os scores presentes em valores negativos de PC1. Já os sinais característicos da lactose, entre 3,58 a

3,54 ppm, e hidrogênios  $\beta$  carboxílicos de ácido graxo, possuem relação com os *scores* presentes em valores positivos de PC1 (Figura 21).



**Figura 21.** Gráfico dos *loadings* de toda região espectral. As setas vermelhas indicam os sinais que possuem relação com as amostras em valores negativos de PC1, e as setas azuis indicam os sinais que se relacionam com as amostras em valores positivos de PC1.

Levando em conta a análise do gráfico de *loadings*, com o intuito de melhor visualizar o agrupamento observado, selecionaram-se somente esses sinais para se realizar um novo cálculo de componentes principais. Do gráfico de *scores* gerado, foi possível identificar uma tendência de separação entre as amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração (Figura 22).



**Figura 22.** Gráfico de scores, PC1 x PC2, referente aos sinais da lactose entre 3,58 a 3,54 ppm,  $\alpha$  e  $\beta$  carboxílicos de ácido graxo e  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de ácidos graxos. A numeração de 0F a 7F correspondem as amostras que foram submetidas a refrigeração inadequada, e a numeração de 0G a 7G às amostras que permaneceram na refrigeração adequada.

Os scores presentes em valores positivos de PC1 da figura 22 encontram-se mais agrupados em relação ao gráfico de scores da figura 20, indicando que os níveis de lactose e ácidos graxos são os principais responsáveis pela separação das amostras em diferentes condições de refrigeração a partir de 3 a 4 semanas. Exceto pelos scores 4F e 5G, os demais scores do eixo negativo de PC1 se distinguem entre os das amostras que permaneceram na refrigeração adequada (4G, 6G e 7G – quadrante negativo de PC2) dos das amostras submetidas à refrigeração inadequada (3F, 5F, 6F e 7F – quadrante positivo de PC2).

Observou-se ainda uma menor variância dos scores presentes no eixo positivo de PC1, reforçando a hipótese de que, até aproximadamente 3 semanas, as variações nos perfis químicos foram menores para esse conjunto de amostras. O gráfico de PCA gerado a partir dessas regiões apresentou uma variância explicada de 78% para PC1 e 9% para PC2, praticamente a mesma percentagem de variância explicada do gráfico de scores gerado de todas as regiões espectrais.

Considerando a contribuição dos sinais de ácidos graxos nesse agrupamento, de acordo com Collins, McSweeney e Wilkinson (2003), já é consenso que a gordura do leite é essencial para o desenvolvimento do sabor e

aroma de queijos durante o processo de envelhecimento. Os ácidos graxos poli-insaturados são bastante propensos à oxidação, levando a formação de vários aldeídos indesejados e afetando fortemente o sabor do queijo, o que pode levar a defeitos no produto como, por exemplo, o gosto de ranço (FOX *et al.*, 2004). Apesar de a oxidação lipídica ocorrer em uma pequena extensão, por outro lado, a hidrólise enzimática de triacilglicerídeos a ácidos graxos e glicerol é essencial para o desenvolvimento do sabor e aroma de diversas variedades de queijos (McSWEENEY e SOUZA, 2000).

Nesse contexto, apesar de não ter sido mensurada a proporção da variação desses compostos nas amostras do queijo tipo mozzarella processado, percebe-se que os agrupamentos observados na análise quimiométrica possuem forte relação com a variação de ácidos graxos, indicando que estes podem ser responsáveis pela alteração do sabor e aroma após determinado período de estocagem, independente das condições de refrigeração.

Como a lactose é o principal carboidrato presente nos queijos, e devido à adição de bactérias do ácido láctico ser um procedimento essencial na produção de todas as variedades de queijo, é natural que ocorra a fermentação da lactose (SMIT, SMIT e ENGELS, 2005). Assim, a influência dos sinais da lactose na separação dos *scores* em PC1, sugere estar relacionada com esse processo de fermentação, enquanto que a separação em PC2 pode estar relacionada ao nível de catabolismo da lactose influenciada pelas diferentes condições de refrigeração.

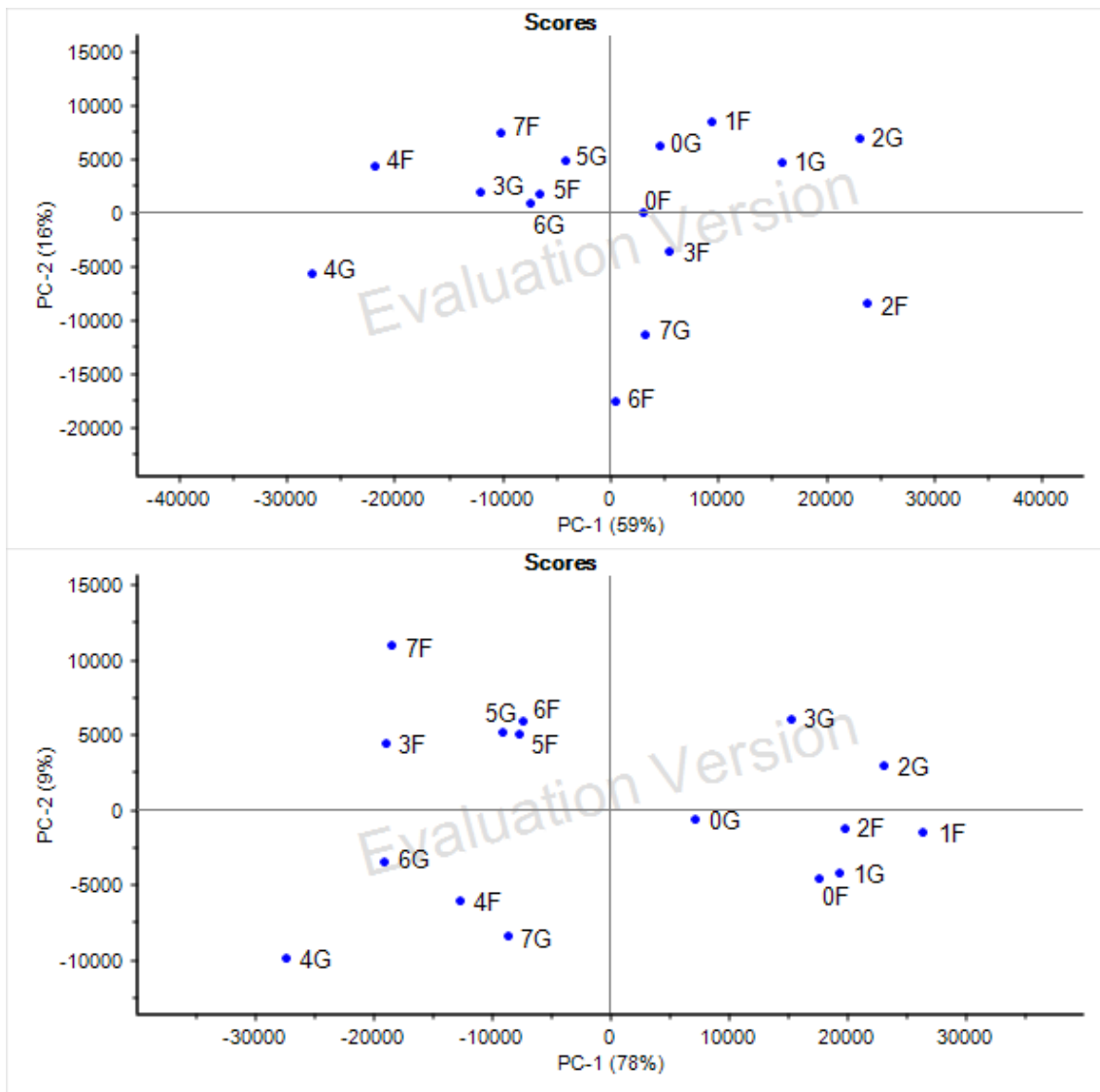
O tipo de queijo analisado possui ainda certas peculiaridades em relação aos demais queijos mozzarella convencionais. Observou-se, por exemplo, a presença do conservante sorbato, com dubleto característico em 1,82 ppm. O ácido sórbico, bastante utilizado pelas indústrias alimentícias, possui alta eficiência antimicrobiana, atuando na inibição das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos carboidratos e do ciclo do citrato presente nos microorganismos (GUERRA e GUERRA, 2003). A presença do conservante sugere então uma inibição da atividade enzimática natural de queijos.

O fato de não ter sido observadas diferenças significativas nos perfis químicos dos espectros adquiridos, pode estar relacionado à presença do sorbato como conservante. Entretanto, a PCA mostrou ser uma ferramenta que possibilita

diferenciar as amostras em diferentes condições de refrigeração, mesmo não sendo observadas mudanças significativas nos perfis químicos obtidos por RMN. Logo, as separações observadas nas PCs se devem a diferenças de intensidades dos sinais.

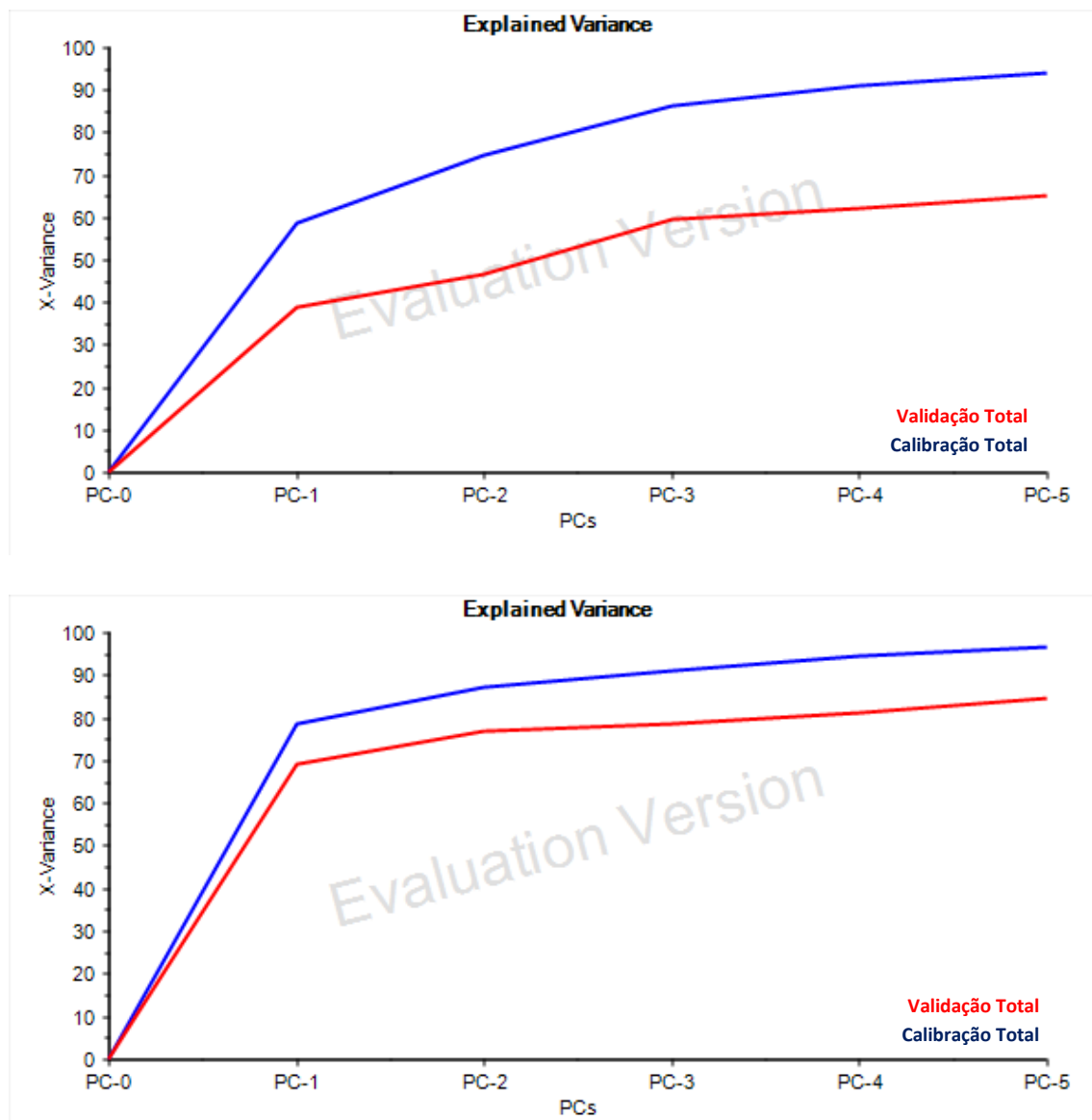
Quanto à deconvolução de referência, optou-se por utilizá-la com o propósito de aprimorar a forma dos sinais e diminuir o ruído, além do fato de este pós-processamento possibilitar a padronização da largura a meia altura do sinal de referência e, assim, promover uma maior variância dos dados na análise multivariada.

A fim de averiguar a influência da deconvolução de referência na análise quimiométrica, foram geradas PCs para os espectros deconvoluídos e não deconvoluídos, representados nos gráficos de *scores* e variância explicada a seguir. Para tal, selecionaram-se as principais regiões consideradas responsáveis pela separação ao longo de PC1 dos dados deconvoluídos para posterior cálculo das PCs, pois não foi observada nenhuma separação ou tendência de separação ao longo de PC2 para o conjunto de dados não deconvoluídos.



**Figura 23.** Gráficos de scores dos espectros deconvoluídos (abaixo) e não deconvoluídos (acima). A numeração de 0F a 7F correspondem as amostras que foram submetidas a refrigeração inadequada, e a numeração de 0G a 7G às amostras que permaneceram na refrigeração adequada.

Como já discutido, para os dados deconvoluídos identificou-se diversas regiões responsáveis pela separação em PC1. Para o conjunto de dados não deconvoluídos, embora os mesmos sinais sejam responsáveis pelo mesmo padrão de separação na análise de todas as regiões espectrais, os *scores* se apresentaram mais dispersos e nenhuma indicação de separação em PC2 foi observada. Os gráficos de variância explicada a seguir também apontam esse resultado, onde se obteve um maior ajuste ao modelo para os dados deconvoluídos do que para os dados não deconvoluídos.



**Figura 24.** Gráficos da variância explicada dos dados correspondentes aos espectros deconvoluídos (abaixo) e não deconvoluídos (acima).

A partir da análise dos gráficos de scores da figura 23, propõe-se que os agrupamentos observados foram melhor explicados com os dados deconvoluídos, apresentando uma PC1 que explica 77% dos dados e 9% para PC2, do que para os dados não deconvoluídos, com 58% da variância explicada pela PC1 e 16% pela PC2. Verificou-se também que, os dados deconvoluídos explicam 95% do conjunto de dados com 4 PCs, enquanto que os dados não deconvoluídos necessitam de 5 PCs para explicar a mesma percentagem.

#### 4.5 Atribuição dos sinais de RMN do queijo tipo mozzarella convencional

Optou-se por realizar as análises desse queijo fazendo uso das sondas TBI e HR-MAS, a fim de verificar se as poucas variações observadas nos perfis químicos do queijo tipo mozzarella processado seriam em função da característica da amostra, ou do fato dos espectros terem sido obtidos com a amostra na forma *in natura* ao utilizar a sonda HR-MAS.

Verificou-se que os perfis químicos adquiridos do queijo tipo mozzarella convencional, apresentaram diferenças visíveis já nas primeiras semanas. Isso sugere que as poucas variações observadas nos perfis químicos do queijo tipo mozzarella processado, seria em função da característica da amostra, reforçando a hipótese de que a presença do conservante sorbato, não identificado no queijo tipo mozzarella convencional, pode ter contribuído para este resultado.

A partir da análise da tabela 5, observa-se que, devido à ausência dos sinais dos ácidos graxos nos espectros obtidos do extrato bruto (Figura 26), foi possível identificar um maior número de sinais. Identificaram-se os sinais da glicose, glutamato, leucina e fenilalanina no espectro da primeira semana de análise, e após onze semanas, apareceram os sinais do etanol, butirato, tirosina e valina, os quais não foram identificados nos espectros obtidos via HR-MAS. Desses espectros só não foram identificados os sinais dos ácidos graxos presente nos espectros obtidos das amostras na forma *in natura*. Os sinais dos ácidos graxos para esse tipo de queijo apresentaram mesma forma e deslocamentos químicos encontrados para o queijo tipo mozzarella processado (Figura 18).

A tabela a seguir mostra os sinais que foram identificados nos espectros adquiridos pelas duas sondas, evidenciando a partir de qual semana começam a ser observados fora do nível do ruído. A atribuição dos mesmos foi realizada com o auxílio do software Chenomx NMR Suite versão 8.1, disponível gratuitamente em sua versão para avaliação, do banco de dados *The Human Metabolome Database* - HMDB (WISHART *et al.*, 2007), e dados da literatura (BLAISE *et al.*, 2007; MANINNA, SOBOLEV e VIEL, 2012; MOZZI *et al.*, 2013; MAZZEI e PICCOLO, 2012; SHINTU e CALDARELLI, 2005; GIANFERRI *et al.*, 2007).

**Tabela 5.** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  ( $\delta$   $^1\text{H}$ ) com seus valores de acoplamento ( $J$ ) e multiplicidade ( $m$ ), deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$ , e o intervalo das semanas em que um dos sinais começaram a ser observados nas análises via TBI e via HR-MAS<sup>a</sup>.

Composto	$\delta$ $^1\text{H}$ ( $m^b$ , J Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	Grupo (posição)	Semanas	Semanas
				TBI <sup>c</sup>	HR-MAS <sup>c</sup>
Formiato	8,45 (s)	Não detectado	CH	1 – 11	1 – 11
Fenilalanina	7,41 (m)	132,08	CH (6,8 <sub>anel</sub> )	1 – 11	5 – 11
	7,32 (m)	132,23	CH (5,9 <sub>anel</sub> )		(GL)
	3,98 (m)	58,97	CH (2)		3 – 11
	3,27(m)	39,37	CH (3)		(FG)
Tirosina	7,18 (m)	133,70	CH (5,9 <sub>anel</sub> )	1 – 11	3 – 11
	6,88 (m)	118,81	CH (6,8 <sub>anel</sub> )		(FG)
	3,93 (m)	59,26	CH (2)		
N – acetil tirosina	7,13 (m)	133,66	CH (5,9 <sub>anel</sub> )	1 – 11	3 – 11
	6,83 (m)	118,49	CH (6,8 <sub>anel</sub> )		
	4,44 (m)	59,39	CH (2)		
Galactose	5,26 (d, 3,7)	95,07	CH <sub><math>\alpha</math></sub> -anomérico	1 – 5 (GL)	1 – 5 (GL)
	4,58 (d, 7,9)	99,25	(1)	1 – 2 (FG)	1 – 2 (FG)
			CH <sub><math>\beta</math></sub> -anomérico (1)		
Lactato	4,12 (q, 6,9)	71,56	CH (2)	1 – 11	1 – 11
	1,34 (d, 6,8)	22,80	CH <sub>3</sub> (3)		
Glicerol	3,76 (m)	75,16	CH (2)	2 – 11 (GL)	-----
	3,64 (m)	65,50	CH <sub>2</sub> (1,3)	2 – 11 (FG)	
	3,56 (m)	65,50	CH <sub>2</sub> (3,1)		
Lisina	3,01 (t, 7,6)	42,13	CH <sub>2</sub> (6)	7 – 11 (GL)	6 – 11
				4 – 11 (FG)	(FG)

Continuação da tabela 5

Citrato	2,71 (d <sub>AB</sub> , 16,4)	47,57	CH <sub>2</sub> (2,4)	1 – 11 (GL)	1 – 11 (GL)
	2,52 (d <sub>AB</sub> , 16,4)	47,57	CH <sub>2</sub> (4,2)	1 – 8 (FG)	1 – 8 (FG)
Succinato	2,46 (s)	35,77	CH <sub>2</sub> (2,3)	1 – 11	1 – 11
Glutamato	3,76 (dd, 4,6 e 7,2)*	54,06	CH (2)	1 – 11	-----
	2,37 (m)	27,03	CH <sub>2</sub> (4)		
Acetona	2,22 (s)**	33,25	CH <sub>3</sub> (1,3)	1 – 11	-----
Butirato	2,19 (t, 7,3)	41,75	CH <sub>2</sub> (2)	7 – 11 (GL)	-----
	1,56 (sex, 7,3)*	Não detectado	CH <sub>2</sub> (3)	6 – 11 (FG)	
	0,89 (t, 7,3)*	Não detectado	CH <sub>3</sub> (4)		
Acetato	1,93 (s)	25,66	CH <sub>3</sub>	1 – 11	1 – 11
Leucina	0,96 (d, 6,4)*	Não detectado	CH <sub>3</sub> (6)	1 – 11	-----
	0,95 (d, 6,6)*	Não detectado	CH <sub>3</sub> (5)		
Etanol	1,18 (t, 7,1)	Não detectado	CH <sub>3</sub>	5 – 11 (GL)	8 – 11 (GL)
				2 – 11 (FG)	4 – 11 (FG)
Valina	3,59 (m)	63,21	CH (2)	1 – 11	-----
	1,04 (d, 7,0)*	23,06	CH <sub>3</sub> (5)		
	0,99 (d, 7,0)*	17,34	CH <sub>3</sub> (4)		
Ácidos Graxos	0,91; 1,29; 1,56;	13,2; 30;	CH <sub>3</sub> ; CH <sub>2</sub> OCO- CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ; OCO- CH <sub>2</sub>	-----	1 – 11
	2,26 (não definida).	25; 34			
Ácidos Graxos Insaturados	1,32; 2,03; 5,35	21; 27;	CH <sub>2</sub> ;CH <sub>2</sub> - CH=CH-CH <sub>2</sub> ; CH=CH	-----	1 – 11
	(multiplicidade não definida).	130			

Continuação da tabela 5

Triglicerídeos	4,09; 4,29; 5,22 (multiplicidade não definida).	62; 62; 69,5	CH <sub>2</sub> -α-glicerol; CH <sub>2</sub> -α'-glicerol; CH-glicerol.	-----	1 – 11
----------------	---	-----------------	---	-------	--------

<sup>a</sup>deslocamentos químicos são relatados usando como referência o singleto do TMS-*d*<sub>4</sub> em 0,00 ppm.

<sup>b</sup>multiplicidades: s, singleto; d, dubleto; *d*<sub>AB</sub>, dubletos com acoplamento de segunda ordem de um sistema AB; dd, duplo dubleto; t, tripleto; q, quadrupletto; sex, sexteto; m, multipletto.

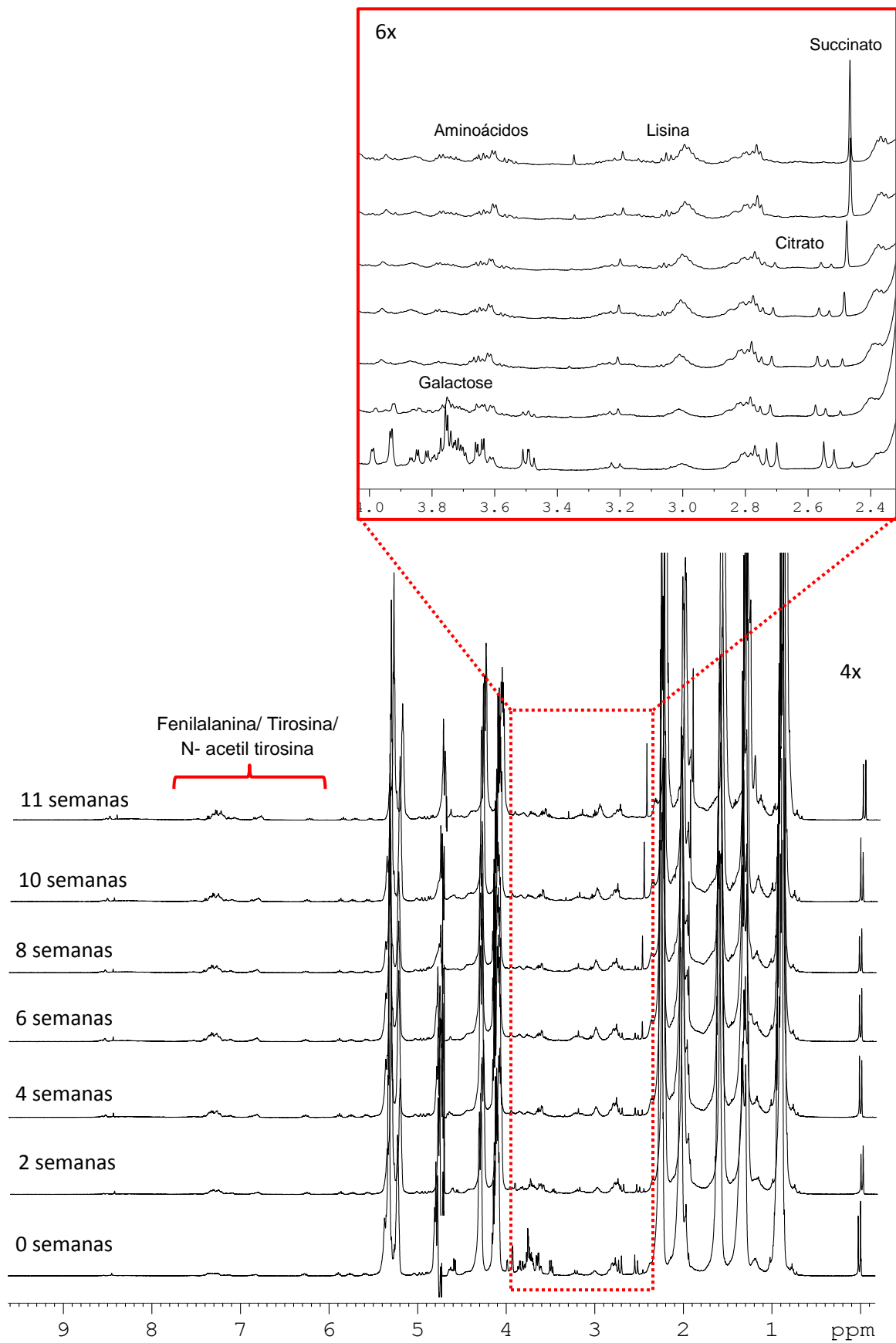
<sup>c</sup>Intervalos das semanas em que um dos sinais dos respectivos compostos foram identificados. Amostras que permaneceram na refrigeração adequada (GL) e na refrigeração inadequada (FG).

\*confirmados pelo *J-Res*.

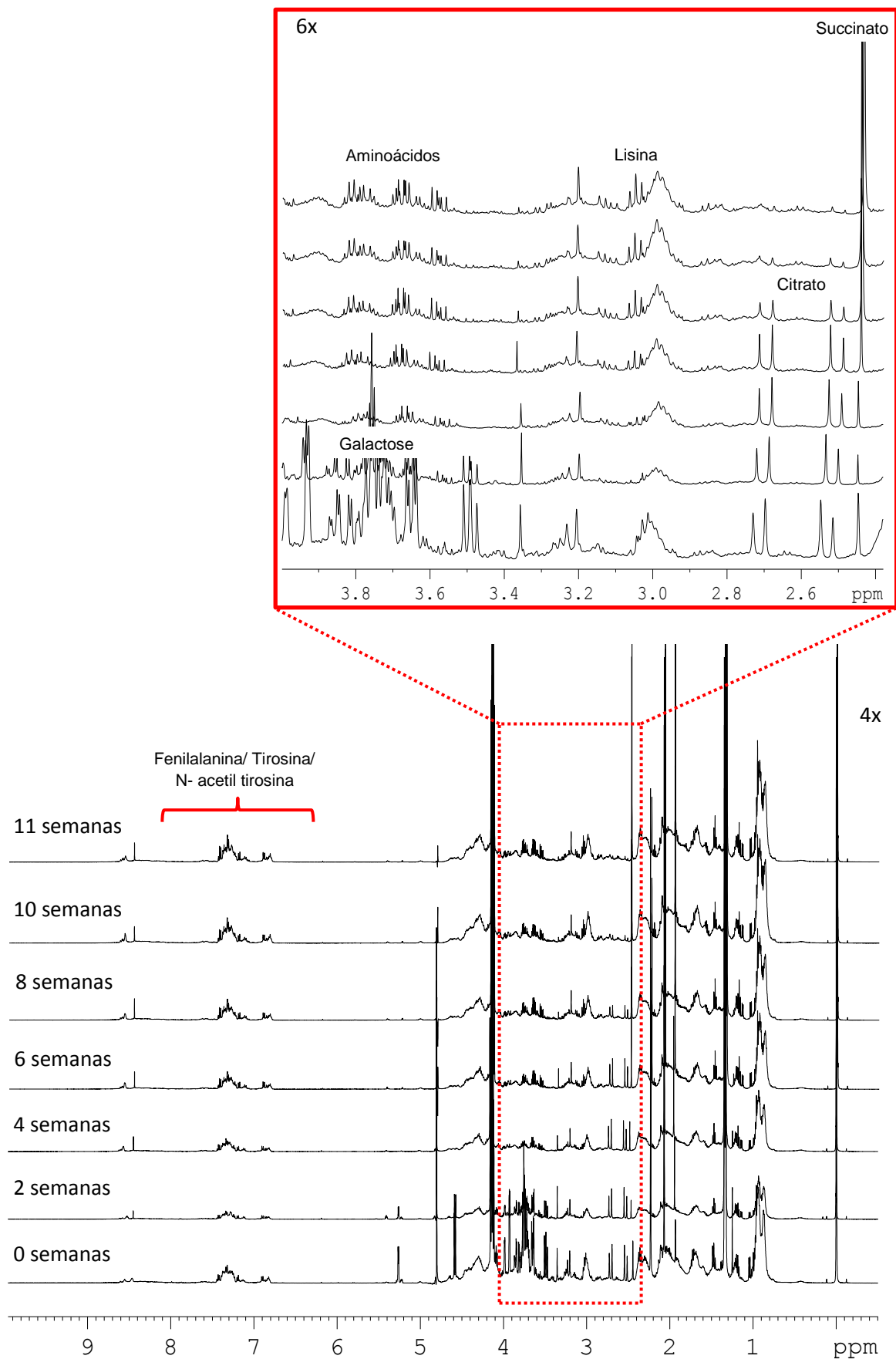
\*\*presença possivelmente devido aos processos de lavagem dos tubos/rotores.

Embora tenha sido possível identificar mais sinais nos espectros obtidos do extrato bruto do que da amostra na forma *in natura*, foram observadas visíveis variações na intensidade dos sinais do succinato, galactose, fenilalanina, tirosina, N-acetil-tirosina, lisina, acetato e citrato, nos espectros obtidos via HR-MAS (Figura 25). As diferenças nos níveis de ácidos graxos não foram tão pronunciadas, sendo identificados os mesmos tanto nos espectros da primeira semana de análise quanto da última.

Nesse sentido, pode-se considerar que, utilizando o padrão interno adequado, é possível fazer o uso dessa sonda para avaliar os teores de metabólitos desse alimento quando submetido a diferentes condições de refrigeração. Os metabólitos em destaque na figura 25, são os mesmos em que foi possível realizar a quantificação relativa a partir dos espectros do extrato bruto (Figura 26).



**Figura 25.** Espectros da variação do perfil químico das amostras submetidas à refrigeração inadequada fazendo uso da sonda HR-MAS. Todos os espectros se encontram na mesma escala.



**Figura 26.** Espectros da variação do perfil químico das amostras submetidas à refrigeração inadequada fazendo uso da sonda TBI. Todos os espectros se encontram na mesma escala.

#### 4.6 Quantificação relativa de substâncias presentes no queijo tipo mozzarella convencional

O principal carboidrato presente na maioria dos queijos é a lactose, um dissacarídeo encontrado naturalmente no leite que produz D-glicose e D-galactose quando hidrolisado. O carbono anomérico do resíduo de D-glicose encontra-se disponível para oxidação, sendo a lactose um dissacarídeo redutor (NELSON e COX, 2011). Essa característica possibilita uma alta taxa de glicólise promovida pelas bactérias do ácido láctico durante a elaboração de queijos, sendo um processo natural na produção desse alimento.

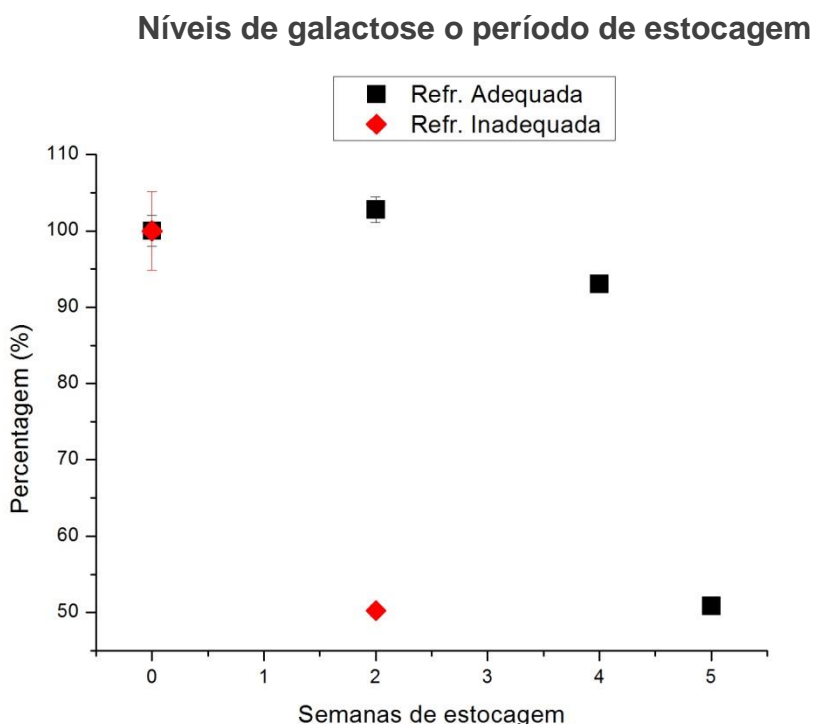
Entretanto, no queijo tipo mozzarella convencional, identificou-se a galactose. A presença deste foi identificada mesmo nos espectros adquiridos na primeira semana de análise, em que as amostras haviam sido recém fabricadas e mantidas na refrigeração adequada. Assim, a presença da galactose sugere que, na fabricação do referente queijo, a hidrólise já havia ocorrido. De fato, a hidrólise da lactose é uma das etapas iniciais esperada no processo de fabricação de queijos (SMIT, SMIT e ENGELS, 2005) e, segundo Marth e Steele (2001), o fato da galactose ter sido identificada no queijo tipo mozzarella convencional, indica que a principal bactéria do ácido láctico utilizada como cultivo iniciador foi a *Streptococcus thermophilus*.

A *Streptococcus thermophilus* utilizada como cultivo iniciador, primeiramente hidroliza a lactose através da enzima  $\beta$ -galactosidase e, em seguida, a glicose liberada é rapidamente fermentada a ácido láctico. A maioria do cultivo iniciador não fermenta a unidade de galactose, em vez disso, o carboidrato é expelido e acumula-se no meio extracelular da bactéria (MARTH e STEELE, 2001), justificando a permanência da galactose nos espectros das primeiras semanas.

A presença da galactose em queijos do tipo mozzarella pode ser considerada um defeito para alguns consumidores, pois sua reação com aminoácidos livres via aquecimento, promove as chamadas reações de acastanhamento não enzimáticas, de modo que esse escurecimento em produtos como pizza, por exemplo, são indesejáveis pelos consumidores (MARTH e STEELE, 2001). Por isso, os fabricantes de queijo mozzarella que utilizam essa bactéria como cultivo iniciador, procuram meios de contornar esse problema. Uma

das formas é utilizar outras bactérias do ácido láctico junto a estas para posterior degradação da galactose.

Como observado na figura 27, os níveis de galactose do queijo tipo mozzarella convencional diminuíram nas primeiras semanas, independente das condições de refrigeração. Embora estudos apontem que a *Streptococcus thermophilus* possui genes necessários para o metabolismo da galactose, verificou-se que o efluxo desse carboidrato é prevalecido sob seu catabolismo (MARTH e STEELE, 2001). Isso sugere que outras bactérias foram responsáveis pela degradação da galactose e que, por ter sido identificado esse carboidrato nos espectros das primeiras semanas, a *Streptococcus thermophilus* pode ter sido a principal bactéria do ácido láctico utilizada como cultivo iniciador.



**Figura 27.** Percentuais dos níveis de galactose durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

Com base na figura 27, observou-se que a degradação da galactose foi muito diferente entre os queijos submetidos a diferentes condições de refrigeração. Para as amostras que permaneceram na geladeira, a presença da galactose foi observada até a 5ª semana, diminuindo 49,1% em relação aos níveis da semana zero, enquanto que para as amostras que passaram as noites fora da

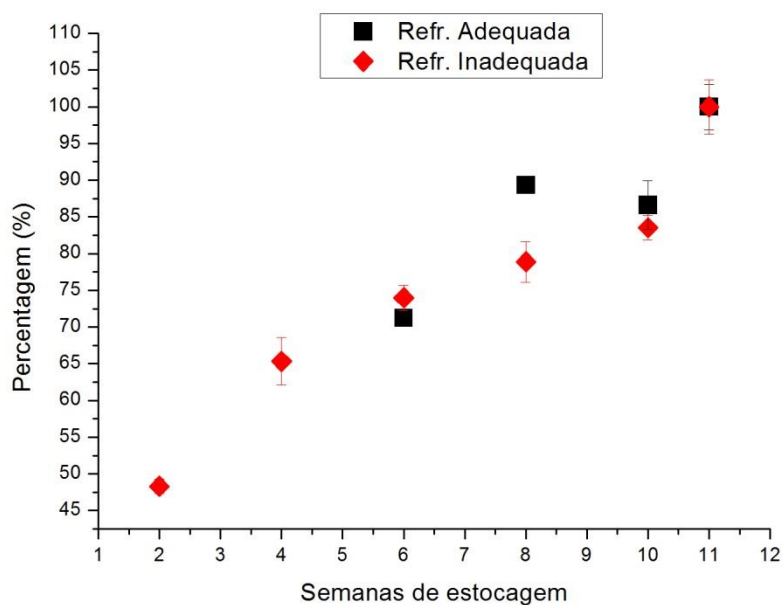
geladeira, a presença do carboidrato foi observada somente até a 2ª semana, diminuindo 49,7% em relação aos níveis da semana zero. Dessa forma, o percentual de degradação da galactose para as amostras refrigeradas adequadamente na 5ª semana, foi praticamente o mesmo das amostras submetidas à refrigeração inadequada na 2ª semana.

As bactérias do ácido láctico são predominantes no processo de fabricação de queijos, os principais grupos de bactérias são *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus species*, *Streptococcus thermophilus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Como mencionado, essas bactérias atuam na fermentação da lactose, ou galactose, a lactato na etapa da adição do cultivo iniciador e, uma vez que o lactato é o principal produto desse processo metabólico, é importante ressaltar que seu teor influencia de diversas formas no processo de produção do queijo desejado (ver item 1.3). Além do lactato, uma fração intermediária da fermentação dos carboidratos pode conduzir à formação de acetaldeído, ácido acético, diacetil e acetoina (SMIT, SMIT e ENGELS, 2005).

O metabolismo do citrato e lactato ocorre também pela ação das bactérias do ácido láctico, sendo igualmente de grande importância para a formação do sabor do produto. O lactato, por exemplo, pode ser oxidado a formiato, etanol e acetato pela ação das bactérias iniciadoras (FOX *et al.* 2004). Esses produtos foram também identificados no queijo em estudo, aumentando com o passar do tempo, principalmente para as amostras refrigeradas inadequadamente. Dessa forma, considera-se que um dos mecanismos de degradação do lactato tenha ocorrido via oxidação, pela ação das bactérias do ácido láctico (McSWEENEY E SOUSA, 2000).

Outro importante fator que reforça essa hipótese, é que o tamanho do queijo e a permeabilidade de oxigênio pela embalagem ou casca influenciam muito na disponibilidade de oxigênio para que essas reações ocorram (McSWEENEY E SOUSA, 2000). Dessa forma, levando em conta que o queijo fatiado possui maior superfície de contato e não possui casca, a presença de oxigênio na embalagem pode ter também contribuído na formação desses produtos.

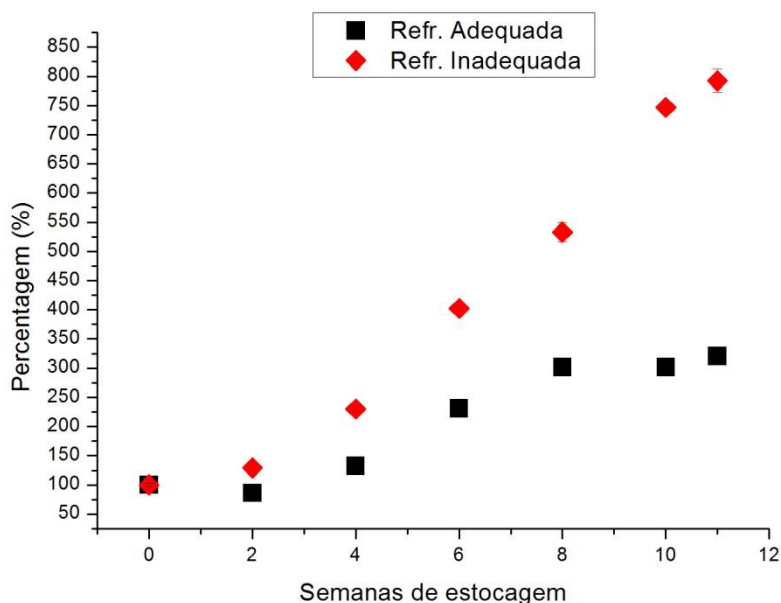
### Níveis de etanol durante o período de estocagem



**Figura 28.** Percentuais dos níveis de etanol durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11ª semana. Cada medida contém o erro padrão das médias ( $n = 3$ ).

Analisando a figura 28, verificou-se que os níveis de etanol são também importantes marcadores na diferenciação das condições de refrigeração. Para os queijos que passaram as noites fora da geladeira, identificou-se a presença do etanol desde a segunda, com 50,7% a menos em relação à 11ª semana, enquanto que para o queijo que permaneceu na geladeira, somente a partir da sexta semana foi possível identificar a presença de etanol, com 28,7% a menos em relação à 11ª semana.

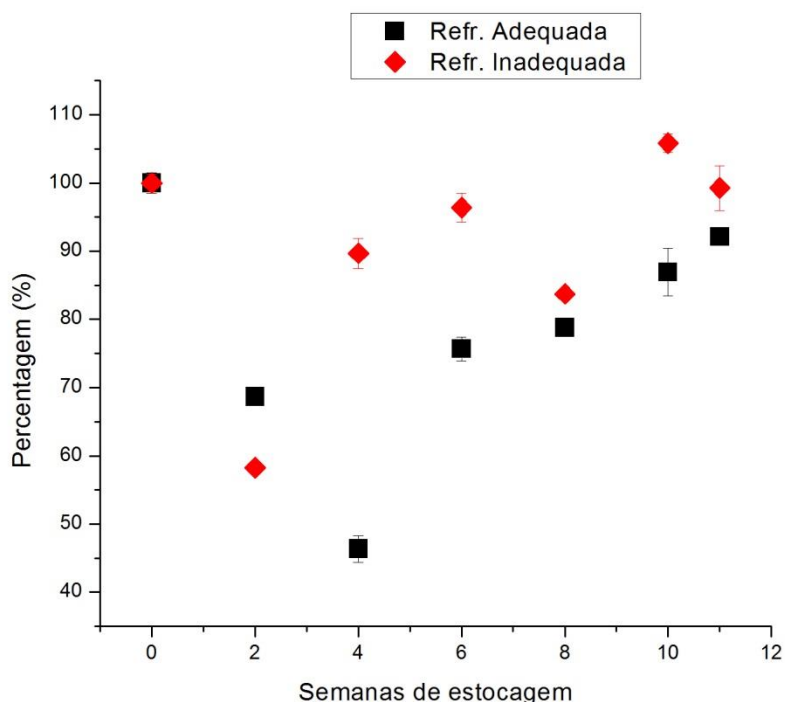
### Níveis de acetato durante o período de estocagem



**Figura 29.** Percentuais dos níveis de acetato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias ( $n = 3$ ).

Nesse contexto, verificou-se que o teor de acetato aumentou significativamente nas amostras, independente das condições de refrigeração. Relativizando os teores a partir da semana zero, em que as amostras ainda não haviam sido submetidas a diferentes condições de refrigeração, observou-se que houve um aumento de 220,6% da semana zero até a 11ª semana para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada. Para as amostras refrigeradas inadequadamente, esse aumento foi de 692,2% da semana zero até a 11ª semana. Logo, verifica-se que foi mais pronunciado o aumento do teor de acetato para as amostras submetidas à refrigeração inadequada do que para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada.

### Níveis de formiato durante o período de estocagem



**Figura 30.** Percentuais dos níveis de formiato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

Quanto ao ácido fórmico, observou-se que, até a segunda semana, os níveis de formiato diminuíram independente das condições de refrigeração das amostras. A partir da 2ª semana, observa-se um significativo aumento para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, de 41% até a 11ª semana. Já para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada, esse aumento foi observado a partir da 4ª semana, de 45,7% até a 11ª semana. Fazendo então uma análise a partir da 4ª semana, nota-se um maior percentual dos níveis de formiato para as amostras refrigeradas inadequadamente, em relação às amostras que permaneceram na refrigeração adequada.

Quanto ao decréscimo dos níveis de formiato até a segunda semana, verificou-se no estudo de Llano, Rodrigues e Cuesta (1996) um efeito similar. Nesse estudo, em que foi avaliado o efeito de culturas do ácido láctico na composição de ácidos orgânicos de leite e queijos durante a maturação, durante 3, 8, 15 e 30 dias para o queijo Afuega'l pitu, observou-se que os níveis de ácido fórmico não foram significativamente alterados. Entretanto, notou-se um ligeiro decréscimo em seus níveis após oito dias de envelhecimento e, posteriormente, um ligeiro aumento ao longo dos dias.

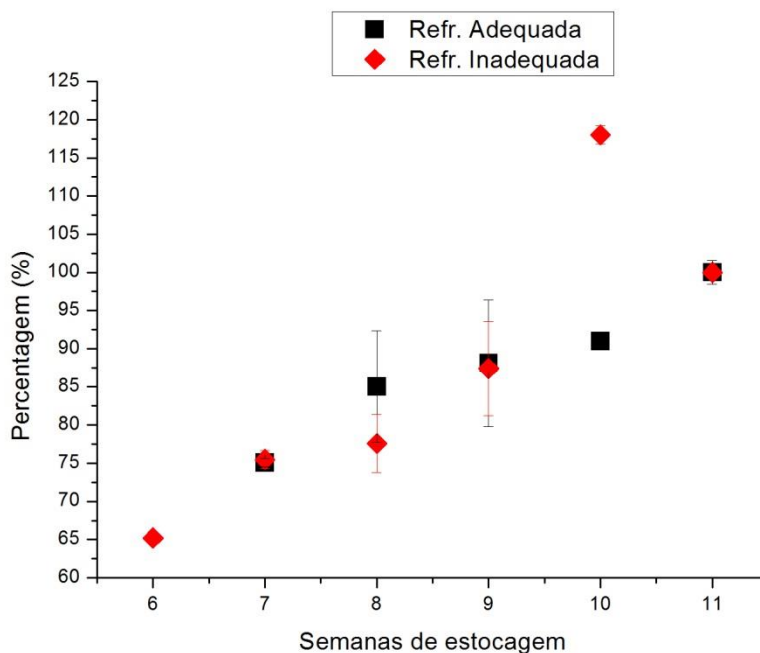
Ainda sobre esse estudo, ressalta-se que esse padrão foi observado utilizando diferentes cultivos iniciadores, levando à hipótese de que esse efeito ocorre pelo fato dos microorganismos tenderem a metabolizar a lactose por vias hetero fermentativas sob condições de crescimento subótimas (THOMAS, 1979 *apud* LLANO, RODRIGUES e CUESTA, 1996).

Outro importante composto identificado foi o ácido butírico, pois a presença deste em queijos pode estar relacionada a defeitos como forte odor de ranço e sabor desagradável, tornando-o impróprio para consumo (PERRY, 2004). Altos níveis de butirato podem resultar na fermentação butírica, produzindo gases que causam estufamento no produto, além de outras substâncias como o ácido propiônico, acético, acetona, butanol e etanol (PERRY, 2004).

Um dos tipos de bactérias responsáveis pela produção de butirato em queijos são as do gênero *Clostridium*, mais especificamente *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutiricum* ou *Clostridium butyricum* (principais da espécie *Clostridium* encontradas no leite), proveniente da contaminação do leite em procedimentos como a ordenha ou em outros processos durante a fabricação (PERRY, 2004).

Nesse sentido, os teores de ácido acético e etanol identificados no referido queijo, também podem ser provenientes da ação de *Clostridium sp.*, visto que, além do lactato, açúcares como a sacarose, galactose e glicose também são utilizadas como substrato por essas bactérias. Estudos mostram que o principal microorganismo encontrado em amostras de queijos estufados produzidos no Brasil é a *Clostridium butyricum* (Mesquita *et al.*, 2001 *apud* Perry, 2004), reforçando essa hipótese.

### Níveis de butirato durante o período de estocagem



**Figura 31.** Percentuais dos níveis de butirato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11ª semana. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

A figura 31 mostra que os percentuais de butirato para as amostras refrigeradas inadequadamente aumentaram a partir da 6ª semana, pois nas semanas anteriores seus sinais não foram detectados, apresentando 34,8% a menos da 6ª semana em relação à 11ª semana. Entretanto, na 10ª semana, observou-se um teor de 18% a mais em relação à 11ª semana. Esse decréscimo na última semana ocorre, possivelmente, devido à ocorrência de fermentação butírica, indicando que para esse conjunto de amostras, o grau de fermentação foi mais pronunciado.

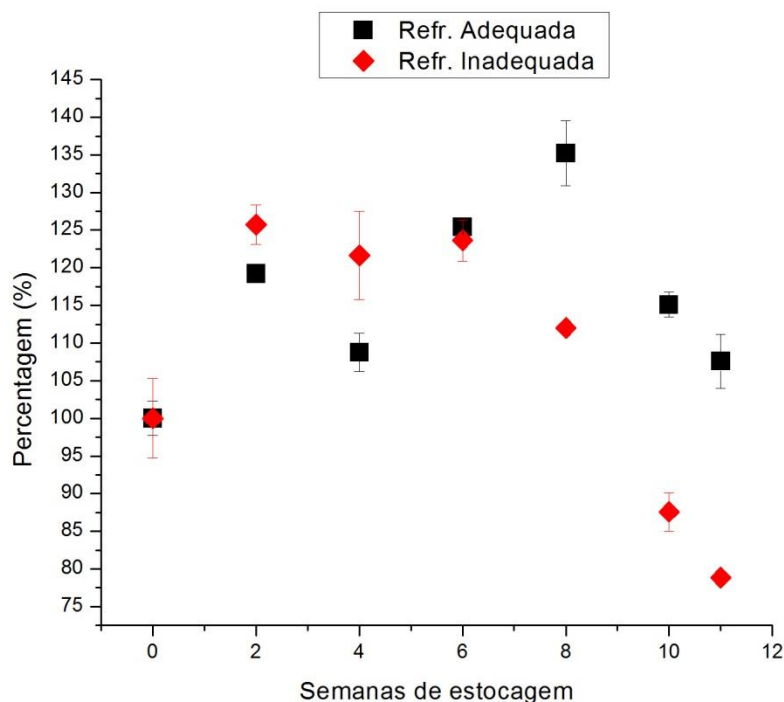
Para as amostras que permaneceram na geladeira observou-se um aumento menos pronunciado dos níveis de butirato a partir da 7ª semana, com 24,9% a menos em relação à 11ª semana. A partir da sétima semana, observou-se que os níveis de butirato ficaram relativamente constantes, apresentando pequenas variações. Essas variações também foram observadas no estudo de Llano, Rodrigues e Cuesta (1996) para o queijo Afuega'l pitu, onde atribuíram esse fenômeno aos complexos processos bioquímicos da microflora presente no queijo durante sua maturação, sendo consideradas alterações não significativas.

Outro importante componente identificado no queijo em estudo foi o citrato, o qual é advindo naturalmente do leite e é transferido para a coalhada do queijo em um teor aproximado de  $10 \text{ mmol.kg}^{-1}$  (McSWEENEY E SOUSA, 2000). Entretanto, o citrato também é adicionado ao queijo, pois sua ação promove uma série de reações físico-químicas inter-relacionadas e simultâneas durante sua fabricação. A presença do citrato promove a ligação/troca iônica dos íons cálcio, ajuste do pH, dispersão da caseína insolúvel e emulsificação da gordura, hidratação de proteínas e agregação das mesmas, além de atuar como agente antimicrobiano para alguns fungos e bactérias (LUCEY, MAURER-ROTHMANN e KALIAPPAN, 2011).

Considerando-se a importância do citrato na produção de queijos como os do tipo fundidos, normalmente acrescenta-se cerca de 3 g de citrato para cada 100g de queijo. O uso do citrato nesses casos é fundamental, pois o ácido cítrico tem como função manter a estabilidade do produto durante seu armazenamento, podendo-se considerar que a diminuição dos níveis de citrato compromete a qualidade do produto quando se deseja manter tais propriedades.

A figura 32 mostra a variação dos níveis de citrato durante o envelhecimento do queijo tipo mozzarella convencional. Até a segunda semana, pôde-se observar que houve um aumento de 19,2% para as amostras refrigeradas adequadamente, enquanto que para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, esse aumento foi de 25,7%. Da 2ª para a 4ª semana, houve uma pequena diminuição de 4,0% e 10,4% para as amostras submetidas à refrigeração inadequada e adequadas, respectivamente. Posteriormente, da 4ª para a 6ª semana, aumentaram-se novamente os níveis de citrato em 16,6% para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada, e 1,99% para as amostras refrigeradas inadequadamente.

### Níveis de citrato durante o período de estocagem



**Figura 32.** Percentuais dos níveis de citrato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias ( $n = 3$ ).

Para as amostras que foram mantidas na refrigeração adequada, verificou-se que, da 2ª para a 6ª semana, essas oscilações de aumento seguido de decréscimo dos níveis de citrato, foram mais pronunciados. Da 6ª à 11ª semana, houve um decréscimo dos níveis de citrato de 24,7%. Entretanto, embora tenha se observado uma linearidade na diminuição do teor de citrato a partir da 6ª semana, ao comparar a 11ª semana com a semana zero, observou-se um ligeiro aumento de 17,8%. Já para as amostras que foram submetidas à refrigeração inadequada, verificou-se um decréscimo de 44,8% da 6ª à 11ª semana, e de 21,1% da semana zero à 11ª semana. Verifica-se então que a degradação do citrato foi mais pronunciada para as amostras inadequadamente refrigeradas em relação às amostras que permaneceram na refrigeração adequada, o que, considerando a importância do citrato na conservação desse alimento, pode resultar em uma menor estabilidade do produto inadequadamente refrigerado.

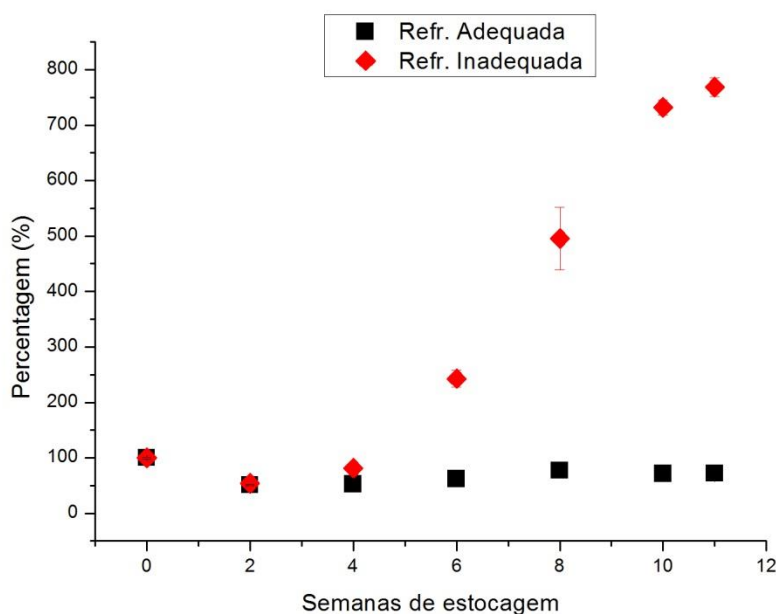
Segundo Akalin, Gönç e Akbast (2002), que estudaram a variação dos conteúdos de ácidos orgânicos durante a maturação do queijo branco em conserva, o citrato está envolvido no ciclo de Krebs atuando tanto como substrato

quanto como produto. Os autores encontraram inconstâncias nos teores de citrato do queijo analisado, apresentando uma tendência de diminuir seus níveis no final da maturação. Conforme o estudo de Lombardi *et al.* (1994) *apud* Akalin, Gönç e Akbast (2002), encontrou-se um efeito similar para o queijo reggiano. Por ter sido observada essa mesma tendência para o queijo tipo mozzarella convencional em estudo, considera-se que o fenômeno observado pode estar relacionado ao uso do citrato no metabolismo da cultura láctica presente no queijo.

Um estudo realizado por Dudley e Steele (2005), mostra que o succinato é um dos principais produtos do metabolismo do citrato. Esse processo é promovido pela bactéria láctica secundária *Lactobacillus plantarum*, pois as demais bactérias do gênero *lactobacilli* testadas pelos autores, não apresentaram o mesmo resultado. Embora no queijo mozzarella não sejam acrescentadas bactérias secundárias, estas podem estar presentes no queijo em pequenas quantidades, proveniente naturalmente do leite, de processos de pasteurização inadequada, ou devido a contaminações após a pasteurização (DUDLEY e STEELE, 2005).

A figura 33 apresenta um significativo aumento dos níveis de succinato. Para as amostras que não foram devidamente refrigeradas, esse aumento foi de 51,7% para 734,6% da 2ª à 11ª semana. Já para as amostras refrigeradas adequadamente, esse aumento foi de 50,8% para 68,1%, também da 2ª à 11ª semana. Devido a essa grande diferença observada nos níveis de ácido succínico, considera-se que este constituinte é outro importante marcador para diferenciar as condições de refrigeração. A grande produção desse ácido é comum no metabolismo de queijos de uma forma geral, pois pode ser produzido não somente a partir do citrato, mas também do lactato (DUDLEY e STEELE, 2005), que são uns dos principais componentes desse tipo de queijo.

### Níveis de succinato durante o período de estocagem



**Figura 33.** Percentuais dos níveis de succinato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias ( $n = 3$ ).

Para as amostras refrigeradas inadequadamente, verificou-se na figura 32 que os teores de citrato diminuíram a partir da 6ª semana, e na figura 33, que os teores de ácido succínico aumentaram também a partir da sexta semana. Essa relação condiz com o observado por Dudley e Steele (2005) para o queijo cheddar, em que foi atribuída à bactéria *Lactobacillus plantarum* a degradação do citrato a succinato. Nesse sentido, sugere-se que esta bactéria pode estar relacionada com parte da produção de succinato observada, mesmo que em pequenas quantidades, de modo que sua proliferação seria favorecida na refrigeração inadequada.

As bactérias do ácido láctico também são responsáveis pela proteólise primária do queijo. Embora bactérias lácteas sejam consideradas fracamente proteolíticas, elas possuem um sistema de proteinases e peptidases associadas à parede celular que são liberadas no meio após a quebra das células (McSWEENEY E SOUSA, 2000). A ação destas resulta na produção de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres, pois atua nos peptídeos de alto e

baixo peso molecular advindos da hidrólise da  $\alpha$ S1-caseína pela ação da quimosina (FOX *et al.*, 2004).

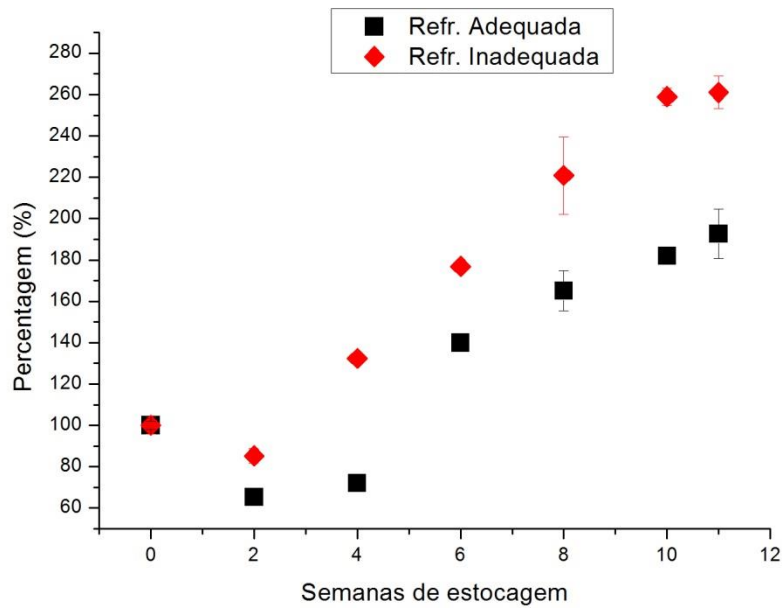
A quimosina é a principal proteinase em coalhos animais tradicionais, responsável por 94% da coagulação, enquanto que a pepsina atua no restante do processo. Entretanto, a maior parte das enzimas coagulantes é removida no soro, ficando retido cerca de 6% na coalhada (McSWEENEY E SOUSA, 2000). A proteólise pode ainda ocorrer pela ação de alguns agentes como o coagulante residual, enzimas naturais do leite como a plasmina, fermento láctico e suas enzimas, fermentos secundários para o caso de queijos que sofrem longo período de maturação, e bactérias contaminantes (FOX *et al.*, 2004).

Devido ao período de maturação do queijo mozzarella ser curto, além do processo de filagem durante sua produção provocar a desnaturação da quimosina (McSWEENEY, 2004), espera-se que a extensão da proteólise não seja tão pronunciada. No entanto, apesar de inicialmente encontrar-se em baixos níveis, as bactérias lácteas não iniciadoras podem crescer rapidamente dentro de quatro semanas, permanecendo relativamente constantes e, dependendo do nível de morte dessas bactérias, podem se tornar predominantes na microflora do alimento e atuar na ação proteolítica (McSWEENEY E SOUSA, 2000).

Existem diversas substâncias responsáveis pelo sabor indesejado nos queijos advindos da proteólise, como as aminas, amidas, amidas substituídas, cetonas de cadeias longas, alguns monoglicerídeos, e peptídeos de cadeia curta (McSWEENEY E SOUSA, 2000). Entretanto, somente alguns aminoácidos como a fenilalanina, tirosina, leucina, valina, lisina e glutamato, que caracterizam o gosto amargo em queijos (McSWEENEY E SOUSA, 2000), foram identificados no queijo tipo mozzarella convencional.

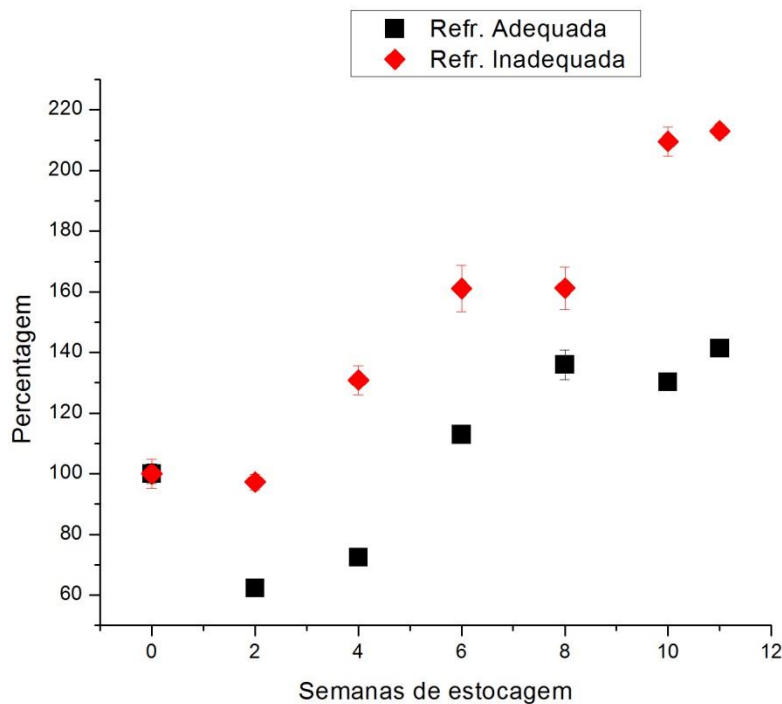
Nessa perspectiva, os teores de aminoácidos, que são importantes indicadores do nível de maturação de queijos, também foram considerados importantes na diferenciação das diferentes condições de refrigeração. A seguir são mostrados os gráficos do percentual dos níveis desses aminoácidos para as amostras do queijo tipo mozzarella convencional, submetidas a diferentes condições de refrigeração.

### Níveis de fenilalanina durante o período de estocagem



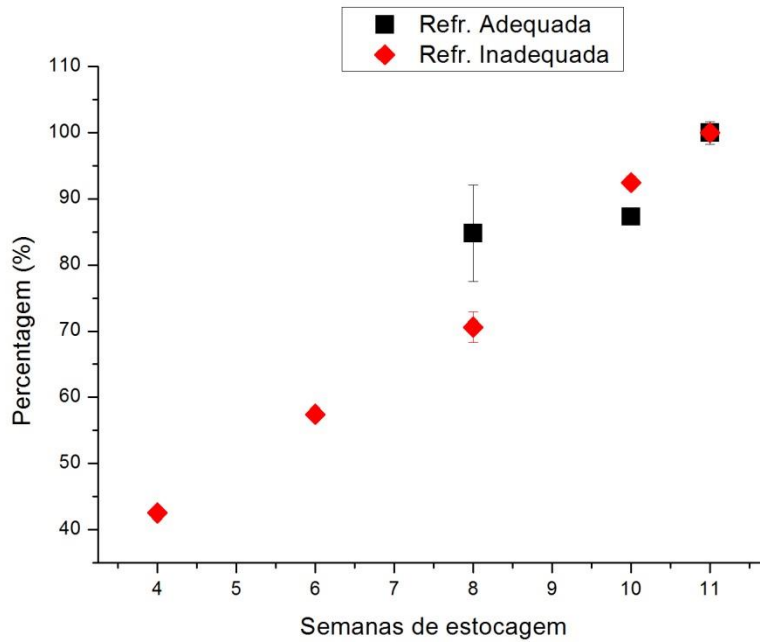
**Figura 34.** Percentuais dos níveis de fenilalanina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

### Níveis de tirosina durante o período de estocagem



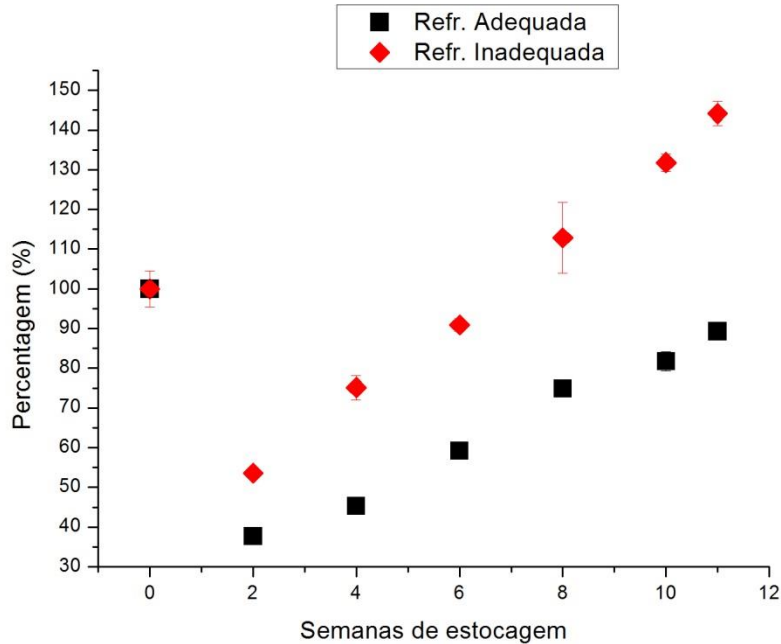
**Figura 35.** Percentuais dos níveis de tirosina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

### Níveis de lisina durante o período de estocagem



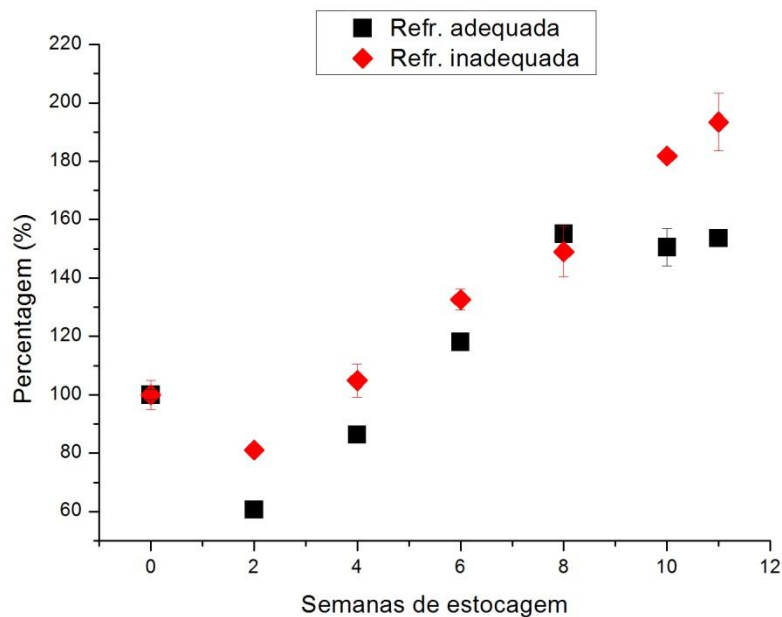
**Figura 36.** Percentuais dos níveis de lisina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da 11ª semana. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

### Níveis de valina durante o período de estocagem



**Figura 37.** Percentuais dos níveis de valina durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

### Níveis de glutamato durante o período de estocagem



**Figura 38.** Percentuais dos níveis de glutamato durante o período de estocagem, relativizados aos níveis da semana zero. Cada medida contém o erro padrão das médias (n = 3).

Os níveis de fenilalanina, tirosina, valina e glutamato seguiram a mesma tendência durante as 11 semanas. Em todos os casos observou-se um aumento de 175,7%, 115,7%, 90,5% e 112,4%, respectivamente, para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, da 2<sup>a</sup> à 11<sup>a</sup> semana, enquanto que para as amostras mantidas na refrigeração adequada, esse aumento foi de 127,3%, 79,0%, 51,61% e 93,01%, respectivamente.

Na figura 36, em que os percentuais dos teores da lisina foram relativizados pelos teores da 11<sup>a</sup> semana, observou-se que, para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, a presença da lisina foi identificada a partir da 4<sup>a</sup> semana. Já as amostras que foram mantidas na refrigeração adequada, a presença da lisina foi identificada a partir da 8<sup>a</sup> semana e, em ambos os casos, notou-se um crescente aumento dos níveis de lisina até a 11<sup>a</sup> semana. Dessa forma, pôde-se observar que o grau de proteólise foi significativamente maior para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, comprometendo o sabor e conseqüentemente a qualidade do queijo em questão.

Embora a leucina seja outro importante indicador do nível de proteólise do queijo em estudo, não foi possível realizar sua quantificação devido a seus sinais

se encontrarem em uma região muito congestionada do espectro, o que dificultou a integração.

Quanto à diminuição dos níveis de glutamato, valina, fenilalanina e tirosina, observado da semana zero até a 2ª semana, verificou-se que pode estar relacionado a um fenômeno comum em alguns alimentos que passam pelo processo de fermentação, pois este fenômeno se trata da característica do metabolismo de alguns microrganismos.

No estudo de Boucher *et al.* (2013), por exemplo, foi verificado que durante as 48h de maturação do queijo tipo gorgonzola, os níveis de leucina e valina diminuíram nas primeiras 8h e, a partir de então, começaram a aumentar significativamente. Embora a microflora utilizada no queijo gorgonzola seja diferente da comumente empregada no queijo mozzarella, os resultados observados nos gráficos que mostram as variações dos teores de aminoácidos, permite inferir que as complexas vias bioquímicas em alimentos fermentados como o queijo possuem uma tendência similar.

Nesse sentido, é de conhecimento que bactérias lácteas não podem sintetizar algumas vitaminas e aminoácidos. As *Lactococcus* e *S. Thermophilus*, por exemplo, não sintetizam isoleucina, leucina, valina ou histidina. As do gênero *Lactobacillus* necessitam desses aminoácidos e vários outros, enquanto que as *Leuconostoc ssp.* requerem valina e glutamato, dentre outras espécies que necessitam de outros aminoácidos específicos (MONNET *et al.*, 1996 *apud* MARTH e STEELE, 2001). Assim, a presença dos aminoácidos estimula o crescimento da cultura láctica.

Embora o leite possua muitos dos aminoácidos essenciais que promovem o crescimento das bactérias lácteas, estes não se encontram em quantidades suficientes para manter as taxas de crescimento máximas (MONNET *et al.*, 1996 *apud* MARTH e STEELE, 2001). Nessa perspectiva, presume-se que o decréscimo dos níveis de aminoácidos observado para o glutamato, valina, fenilalanina e tirosina, até a 2ª semana, se deve ao consumo dos aminoácidos essenciais naturalmente presente no queijo de modo a favorecer o crescimento das culturas lácticas presentes na matriz.

Uma vez que as bactérias da espécie *Streptococcus thermophilus* podem estar presentes no queijo tipo mozzarella convencional, é importante frisar o efeito da temperatura na atividade proteolítica das mesmas. O estudo de Giori *et al.* (1985) trata justamente do estudo da influência da temperatura e pH na atividade proteolítica das bactérias do ácido láctico, dentre elas, a *Streptococcus thermophilus*.

Nesse estudo foi observado que o nível de proteólise dessa bactéria aumenta nas temperaturas em torno de 15 e 45 °C. O nível de proteólise foi expresso pelo teor de tirosina liberada no processo, resultando em uma máxima liberação pela ação das *Streptococcus thermophilus*, nas temperaturas em torno de 15 e 20 °C. Partindo dessa premissa, considera-se que a temperatura média em que os queijos submetidos à refrigeração inadequada foram sujeitados, ficou em uma faixa propícia para a atividade dessa bactéria.

Quanto aos processos de lipólise, sabe-se que a principal fonte de lipases em queijos é oriunda também das bactérias lácteas. Outra importante lipase, natural do leite, é a lipoproteína lipase, que atua nas posições sn-1 e sn-3 de mono, di ou triacilglicerídeos. Devido a 80% desta lipase estar associada às micelas das caseínas, basicamente toda ela é incorporada na coalhada, porém, em leites que sofrem um rigoroso processo de pasteurização, praticamente todas elas são inativadas (McSWEENEY E SOUSA, 2000).

A gordura do leite é um dos principais componentes responsáveis pelo desenvolvimento do sabor de queijos, de modo que lipídeos específicos caracterizam sabores específicos. A oxidação ou hidrólise lipídica é comum em alimentos que contenham gordura em sua composição, entretanto, devido ao baixo potencial de oxidação-redução desse alimento, a oxidação lipídica é menos pronunciada, de modo que o sabor advindo dos lipídeos é caracterizado pela hidrólise enzimática dos triacilglicerídeos de ácidos graxos e de gliceróis, mono ou diglicerídeos (McSWEENEY E SOUSA, 2000).

Os ácidos graxos de cadeia curta, geralmente encontrados na posição sn-3 dos triacilglicerídeos, possuem maior impacto no sabor. Isso ocorre devido à especificidade de lipases nesse processo, podendo liberá-las em grande escala.

Entretanto, uma lipólise extensa é considerada indesejável em muitas variedades de queijos, pois pode levar ao sabor de ranço.

A hidrólise de 1 a 2 % (m/v) de triacilglicerídeos a ácidos graxos livres no leite, está relacionada ao sabor de ranço. Assim, para queijos que possuem como característica baixos níveis de ácidos graxos livres associados a sua qualidade, uma alta taxa de lipólise pode caracterizá-lo com sabor de ranço (COLLINS, MCSWEENEY e WILKINSON, 2003). No caso do queijo mozzarella, espera-se que a concentração de ácidos graxos livres esteja em torno de  $363 \text{ mg.kg}^{-1}$ , visto que baixos teores estão associados ao sabor suave desse tipo de queijo (McSWEENEY E SOUSA, 2000).

Dos cultivos iniciadores utilizados na elaboração do queijo mozzarella, sabe-se que a espécie *Lactococcus* e alguns *lactobacilos* que atuam em vias heterofermentativas são fracamente lipolíticos, no entanto, lipases e esterases de *Lactococcus* podem liberar grandes quantidades de ácidos graxos livres quando submetidos a longos períodos de maturação (McSWEENEY E SOUSA, 2000). Outros importantes microorganismos responsáveis pela lipólise do queijo são os psicotróficos que, como já mencionado, possuem lipases resistentes à pasteurização, além dessas bactérias sobreviverem e se proliferarem em temperaturas em torno de  $7^{\circ}\text{C}$  (FRANK *et al.*, 1992 *apud* ARCURI *et al.*, 2008).

Woo e Lindsay (1984) investigaram as lipólises que ocorreram nos carbonos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 dos ácidos graxos do queijo mozzarella. Os autores verificaram que somente o butirato, liberado pela lipólise no carbono 4, foi responsável pela mudança no sabor, passando de suave, insípido e leitoso, para suave, leitoso e azedo, mesmo que o queijo tenha sido produzido com leite desnatado. Os autores não identificaram o uso de esterases pregástricas ou lipases em diferentes amostras de queijos mozzarella, indicando que as lipólises ocorreram a partir do cultivo iniciador.

Os mesmos compostos que foram identificados no queijo mantido sob refrigeração adequada, foram identificados nas amostras submetidas à refrigeração inadequada. A presença das bactérias do ácido lático e outros microorganismos advindos de uma possível contaminação, possivelmente contribuíram para esse resultado. Dessa forma, os subprodutos da degradação do

queijo mozzarella em função da refrigeração inadequada não se caracterizam pelo surgimento de novas substâncias, mas sim pelos teores dos compostos identificados.

Os principais marcadores em potencial para a distinção das amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração foram o ácido acético, ácido succínico, etanol, ácido butírico, galactose e lisina.

No caso do ácido acético, por exemplo, observou-se que o teor de acetato começou a aumentar significativamente para as amostras que foram submetidas à refrigeração inadequada a partir da 4ª semana, verificando um teor de 132,3% para as amostras que permaneceram sob refrigeração adequada e de 230,2% para as amostras submetidas a refrigeração inadequada, aumentando significativamente nas semanas subsequentes.

Uma relação similar foi observada para os níveis de ácido succínico, entretanto, tal diferença começou a ser mais pronunciada a partir da 6ª semana, em que o teor de succinato para as amostras que permaneceram sob refrigeração adequada foi de 62,1%, e para as amostras submetidas a refrigeração inadequada foi de 218,3%.

No caso do etanol, ácido butírico, galactose e lisina, a diferenciação dos dois conjuntos de amostras, pode ser realizada verificando a partir de qual semana os teores dessas substâncias começaram a surgir ou desaparecer em cada condição de refrigeração. Os níveis de galactose, por exemplo, marcadamente presentes na semana zero, foram observados até a 5ª semana para as amostras adequadamente refrigeradas, enquanto que para as amostras que foram submetidas à refrigeração inadequada, a presença da galactose foi identificada somente até a 2ª semana.

O mesmo raciocínio segue para o butirato, no qual níveis significativos começaram a aparecer a partir da 6ª semana para as amostras submetidas à refrigeração inadequada, e a partir da 7ª semana para as amostras que permaneceram sob refrigeração adequada. Do mesmo modo, os níveis de butirato aumentaram a partir da 2ª semana para as amostras refrigeradas adequadamente, e a partir da 6ª semana para as amostras inadequadamente

refrigeradas. Já os níveis de lisina, aumentaram a partir da 8<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana para as amostras refrigeradas de forma adequada e inadequada, respectivamente.

Quanto à validade do queijo tipo mozzarella convencional, equivalente a oito semanas, fez-se um comparativo dos teores desses subprodutos nas amostras adequadamente refrigeradas, com os teores encontrados para as amostras submetidas à refrigeração inadequada. Para tal utilizou-se como referência os teores encontrados na 8<sup>a</sup> semana da amostra mantida na refrigeração adequada para, posteriormente, verificar a partir de qual semana as amostras submetidas à refrigeração inadequada teriam teores comparáveis a esta.

Desse comparativo, observou-se que, para as amostras que permaneceram na refrigeração adequada, os teores encontrados na 8<sup>a</sup> semana foram: 70,3% para o succinato, 301,7% para o acetato, 165,1% para a fenilalanina, 135,9% para a tirosina, 74,8% para a valina e 155,0% para o glutamato. Nas amostras que foram submetidas à refrigeração inadequada, teores comparáveis foram observados na 4<sup>a</sup> semana, sendo 78,8% para o succinato, 230,2% para o acetato, 130,8% para a tirosina e 75,1% para a valina. No caso da fenilalanina e glutamato, foi encontrado teores comparáveis de 176,8% e 132,6%, respectivamente, na 6<sup>a</sup> semana. Com base nessa análise, verificou-se que, possivelmente, o queijo submetido à refrigeração inadequada, teve sua validade reduzida a partir da quarta semana.

Tendo em vista as variações observadas nos perfis químicos do queijo tipo mozzarella convencional, e que, das análises físico-químicas realizadas, não foram encontradas diferenças entre os dois conjuntos de amostras, não foi possível correlacionar os dados físico-químicos com os resultados obtidos por RMN de <sup>1</sup>H. Entretanto, verificou-se que a quantificação relativa utilizando a técnica de RMN de <sup>1</sup>H, mostrou ser uma ferramenta em potencial para avaliar as variações nos perfis químicos de queijos que se encontram em diferentes condições de refrigeração.

#### 4.7 Quantificação absoluta de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional

A partir dos resultados da quantificação relativa, foi possível verificar que a variação dos níveis de succinato ao longo das semanas foi um importante marcador na distinção das amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração. Como os sinais deste metabólito nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram os únicos a apresentarem uma relação sinal/ruído adequada para se realizar uma quantificação absoluta, e por ter sido considerado um dos principais marcadores na diferenciação das amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração, optou-se por realizar a quantificação absoluta dos seus teores para que, a posteriori, pudesse ser correlacionado com o prazo de validade do queijo tipo mozzarella convencional e, assim, obter uma estimativa do quanto os níveis de succinato pode comprometer a qualidade de queijos tipo mozzarella.

A quantificação absoluta foi realizada a partir da equação 1 baseada na equação :

$$[\text{succinato}] = \frac{[\text{TMSP-d}_4] \times N_{(\text{TMSP-d}_4)} \times A_{(\text{succinato})} \times \text{MM}_{(\text{succinato})}}{N_{(\text{succinato})} \times A_{(\text{TMSP-d}_4)}} \quad \text{equação (1)}$$

Onde  $[\text{succinato}]$  é a concentração calculada de succinato em mg/mL no tubo de RMN,  $[\text{TMSP-d}_4]$  é a concentração de TMSP-d4 em mol/mL no tubo de RMN,  $N_{(\text{TMSP-d}_4)}$  é o número de hidrogênios do padrão,  $A_{(\text{succinato})}$  é o valor médio das áreas das integrais das triplicatas do succinato,  $\text{MM}_{(\text{succinato})}$  é a massa molar do succinato em mg/mol,  $N_{(\text{succinato})}$  é o número de hidrogênios relativos do succinato e  $A_{(\text{TMSP-d}_4)}$  representa a área do padrão interno relativo ao número de hidrogênios do padrão.

As tabelas 6 e 7 a seguir mostram os resultados obtidos desse cálculo para os dois conjuntos de amostras submetidos a diferentes condições de refrigeração ao longo das 11 semanas de análises.

**Tabela 6.** Valores das áreas das triplicatas, médias e desvio padrão dos sinais de succinato, relativos à área do TMS<sup>p</sup>-d<sub>4</sub> = 1, e os teores de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram na refrigeração adequada durante as noites.

Semanas	Área 1 <sup>a</sup> triplicata	Área 2 <sup>a</sup> triplicata	Área 3 <sup>a</sup> triplicata	Média ± desvio padrão	Teor (mg/mL)
0	0,0758	0,0735	0,0717	0,0737 ± 0,0021	0,0379
2	0,0373	0,0368	0,0383	0,0375 ± 0,0008	0,0193
4	0,0368	0,0364	0,0429	0,0387 ± 0,0036	0,0199
6	0,0474	0,0443	0,0457	0,0458 ± 0,0016	0,0235
8	0,048	0,0673	0,0556	0,0570 ± 0,0097	0,0293
10	0,0522	0,0511	0,0543	0,0525 ± 0,0016	0,0270
11	0,0493	0,0584	0,0511	0,0529 ± 0,0048	0,0272

**Tabela 7.** Valores das áreas das triplicatas, médias e desvio padrão dos sinais de succinato, relativos à área do TMS<sup>p</sup>-d<sub>4</sub> = 1, e os teores de succinato presente no queijo tipo mozzarella convencional que permaneceram fora da refrigeração adequada durante as noites.

Semanas	Área 1 <sup>a</sup> triplicata	Área 2 <sup>a</sup> triplicata	Área 3 <sup>a</sup> triplicata	Média ± desvio padrão	Teor (mg/mL)
0	0,0708	0,0781	0,0646	0,0712 ± 0,0068	0,0366
2	0,0403	0,0375	0,0378	0,0385 ± 0,0015	0,0198
4	0,0579	0,0595	0,0559	0,0578 ± 0,0018	0,0297
6	0,1663	0,1936	0,1588	0,1729 ± 0,0183	0,0889
8	0,4314	0,3028	0,3237	0,3526 ± 0,0690	0,1813
10	0,5374	0,5036	0,5218	0,5209 ± 0,0169	0,2678
11	0,5577	0,5595	0,5236	0,5469 ± 0,0202	0,2812

Os resultados correspondem aos obtidos na quantificação relativa. Por meio da quantificação absoluta, pode-se verificar que a partir da 6<sup>a</sup> semana de análise a amostra inadequadamente refrigerada continha 0,0889 mg/mL, e que a amostra adequadamente refrigerada continha 0,0293 mg/mL a partir da 8<sup>a</sup> semana de análise. Logo, na sexta semana, a amostra inadequadamente refrigerada possuía um maior teor do que a amostra adequadamente refrigerada na oitava semana (correspondente a última semana de validade). Verifica-se também que os níveis de succinato não variaram significativamente ao longo das

semanas para as amostras adequadamente refrigeradas, levando-se a concluir que uma amostra de queijo tipo mozzarella convencional ao alcançar teores de succinato aproximados ou superiores a 0,0889 mg/mL trata-se de uma amostra que não foi mantida na refrigeração adequada.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSÃO

No estudo do queijo tipo mozzarella processado, foi verificado que as diferenças nas intensidades dos sinais foram responsáveis pelas separações observadas na análise quimiométrica. O fato de não ter sido observadas diferenças entre os espectros em termos de composição de sinais, pode estar relacionado à presença do conservante sorbato, pois o mesmo possui alta eficiência antimicrobiana, o que pode ter resultado nas pequenas variações encontradas nos perfis químicos adquiridos.

No gráfico de *scores* da análise inicial do queijo tipo mozzarella processado, verificou-se que houve variações nos perfis químicos das amostras independente das condições de refrigeração a partir de aproximadamente quatro semanas. Esse fato pode estar associado à presença de bactérias psicotróficas, pois possuem a capacidade de se proliferar em baixas temperaturas, atuando na degradação dos dois conjuntos de amostras.

Ainda para esse tipo de queijo, na análise de outro gráfico de *scores*, gerado a partir dos sinais de maior peso do gráfico de *loadings*, observou-se a mesma tendência de separação encontrada na análise inicial, sendo os sinais da lactose um dos principais responsáveis pelo padrão observado. Já no estudo do queijo tipo mozzarella convencional foi verificada a degradação da galactose, permitindo distinguir as amostras submetidas a diferentes condições de refrigeração. Estes resultados sugerem que o metabolismo de carboidratos é característico nesse processo, sendo mais pronunciado nos queijos submetidos à refrigeração inadequada.

Das análises de RMN para o queijo tipo mozzarella convencional, os principais subprodutos de degradação identificados foram o acetato, succinato, etanol, fenilalanina, tirosina, valina, lisina, e glutamato. Os níveis de acetato e succinato foram os mais acentuados na diferenciação das amostras em diferentes condições de refrigeração. Analisando os teores dos mesmos, verificou-se que o queijo submetido à refrigeração inadequada apresentou teores de succinato e

acetado, em quatro semanas de estocagem, comparáveis aos teores de succinato e acetato do queijo mantido na refrigeração adequada após oito semanas de estocagem.

Uma análise similar foi realizada para os níveis de fenilalanina, tirosina e glutamato, o que levou a mesma conclusão. Dessa forma, por meio desses dados, conclui-se que a refrigeração inadequada compromete a validade desse tipo de queijo, reduzindo-a em cerca de quatro semanas, assim como observado para o queijo tipo mozzarella processado. Logo, em termos de composição química, considera-se que a qualidade desse alimento pode ter sido afetada, visto que o sabor suave desse tipo de queijo é associado a baixos níveis de atividade enzimática.

Quanto a quantificação absoluta realizada para o succinato, verificou-se que uma amostra de queijo tipo mozzarella convencional ao alcançar teores de succinato aproximados ou superiores a 0,0889 mg/mL, sugere que este produto que não foi mantido na refrigeração adequada, sendo este um importante marcador nesse tipo de análise.

Quanto às análises fazendo uso da sonda HR-MAS para o queijo tipo mozzarella convencional, a partir de uma inspeção visual, foi possível identificar diferenças nos perfis químicos dos queijos submetidos a diferentes condições de refrigeração, tanto em termos de intensidade quanto de composição dos sinais. Ao comparar as variações dos mesmos metabólitos que foram quantificados a partir do extrato bruto, observou-se uma mesma tendência a respeito da intensidade desses sinais. Nesse sentido, conclui-se que, utilizando um padrão interno adequado, para esse tipo de amostra, é possível analisar as variações dos teores dos metabólitos de queijos submetidos às diferentes condições de refrigeração estudadas fazendo uso também da sonda HR-MAS.

No âmbito da pesquisa realizada, a identificação das amostras de queijo submetidas a diferentes condições de refrigeração não pôde ser realizada utilizando-se os parâmetros físico-químicos, comumente empregados em análises da qualidade de queijos, visto que os resultados obtidos não apresentaram variações significativas. No entanto, a técnica de RMN e o seu uso aliado a ferramentas quimiométricas mostraram-se promissores na referente identificação.

## CAPÍTULO 6

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. R. M. P.; GEMAL, A. L. e GIL, A. S. S. Caracterização de Polimorfismo em Fármacos por Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido. **Química Nova**, v.22, n.4, p.553-564, jul/aug,1999.

AKALIN, A. S.; GÖNÇ, S. e AKBAS, Y. Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.7, p.1670-1676, jul, 2002.

ALTAN, A.; OZTOP, M. H.; McCARTHY, K. L. e McCARTHY, M. J. Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry. **Journal of Food Engineering**, v.107, n.2, p.200-207, dec, 2011.

ALCÂNTARA, G. B.; LIÃO, L. M.; SAN GIL, R. A. S.; MENEZES, S. M. C. M. Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear. **Associação de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear**, n. 5, ed. 1, p. 1517-1264, jul, 2014.

ANTUNES, L. A. F.; SILVA, L. O.; VILELA, S. C.; CAMPOS, S.; SAITO, M. M. e MALLMANN, D. B. Padronização da relação proteína/gordura: Um importante parâmetro na fabricação de queijos. **Informativo HA-LA BIOTEC**; Ano XX, n.111, abr/mai/jun, 2010.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciências Rural** (Santa Maria), v.38, n.8, p.2250-2255, nov, 2008.

AS ENZIMAS na fabricação de produtos lácteos. **Aditivos e Ingredientes**, v.78, p.27-36, 2011.

BLAISE, B. J.; GIACOMOTTO, J.; ELENA, B.; DUMAS, M. E.; TOULHOAT, P.; SÉGALAT, L. e EMSLEY, L. Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v.104, n.50, p.19808-19812, 2007.

BOUCHER, C. Le; COURANT, F.; JEANSON, S.; CHEREAU, S.; MAILLARD, M. B.; ROYER, A. L.; THIERRY, A.; DERVILLY-PINEL, G.; BIZEC, B. Le e LORTAL, S. First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese. **Food Chemistry**, v.141, n.2, p.1032-1040, nov, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária – MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de Leite e produtos Lácteos.

**Diário Oficial da União**, 14 dez., 2006, Seção 1. Disponível em:

<<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária – MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. Departamento de inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996: Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispões sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, 16 set., 2004. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4a3b680040bf8cdd8e5dbf1b0133649b/RESOLUÇÃORDC+N+216+DE+15+DE+SETEMBRO+DE+2004.pdf?MOD=AJPERES>>.

BRUKER. **Bruker**: User Manual. Version 3.0. Germany: Bruker GmbH, 2010. 416 p.

CASTELL-PALOU, A.; ROSSELÓ, C.; FEMENIA, A. e SIMAL, S. Simultaneous Quantification of Fat and Water Content in Cheese by TD-NMR. **Food Bioprocess Technology**, v.6, n.10, p.2685-2694, oct, 2013.

CASTELL-PALOU, A.; ROSSELÓ, C.; FEMENIA, A.; BOM, J. e SIMAL, S. Moisture profiles in cheese drying determined by TD-NMR: Mathematical modeling of mass transfer. **Journal of Food Engineering**, v.104, n.4, p.525-531, jun, 2011.

CHENOMX INC. **Metabolite Discovery and Measurement**. Disponível no site:

<<http://www.chenomx.com/software/>> Acesso em: 02/02/2015.

CIFUENTES, A. Food Analysis and Foodomics. **Journal of Chromatography**, v.2016, n.43, p.7109-7358, oct, 2009.

CIFUENTES, A. Food analysis: Present, Future and Foodomics. **International Scholarly Research Network**, v.2012, p.1-16, 2012.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2ª ed. Vol. 27. Oxford: Elsevier, 2009. 383 p.

- COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H. e WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v.13, n.11, p.841-866, 2003.
- CONSONI, R. e CAGLIANI, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Talanta**, v.76, n.1, p. 200-205, jun, 2008.
- CORTEZ, M. A. S.; FURTADO, M. M.; GIGANTE, M. L. e KINDSTEDT, P. S. Effect of pH on Characteristics of Low-Moisture Mozzarella Cheese during Refrigerated Storage. **Journal of Food Science**, v.73, n.9, p.443-448, nov, 2008.
- CURTIS, S. de A.; CURINI, R.; DELFINI, M.; BROSIO, E.; D'ASCENZO, F. e BOCCA, B. Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: a NMR study. **Food Chemistry**, v.71, n.4, p.495-502, dec, 2000.
- DOSY Toolbox**. University of Manchester, 2012. Disponível em: <<http://dosytoolbox.chemistry.manchester.ac.uk/dosytoolbox/doku.php>> Acesso em: 08/08/2014.
- DUDLEY, E. G. e STEELE, J. L. Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.1, p.14–23, 2005.
- EBRAHIMI, P.; NILSSON, M.; MORRIS, G. A.; JENSEN, H. M e ENGELSEN, S. B. Cleaning up NMR spectra with reference deconvolution for improving multivariate analysis of complex mixture spectra. **Journal Chemometrics**, v.28, n.8, p.656-662, aug, 2014.
- FAN, T. W. M. e LANE, A. N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.52, n.2, p.69–117, fev, 2008.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Codex Alimentarius: Milk and Milk Products**. 2<sup>a</sup> ed. Rome, 2011.
- FAROOQ, H.; COURTIER-MURIAS, D.; SOONG, R.; BERMEL, W.; KINGERY, W. M. e SIMPSON, A. J. HR-MAS NMR Spectroscopy: A Practical Guide for Natural Samples. **Current Organic Chemistry**, v.17, n.24, p.3013-3031, 2013.

FERNIE, A.R.; TRETHERWEY, R.N; KROTZKY, A.J.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.5, p.763-769, sep, 2004.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics.**, v.2, n.3, p.155–168, jun, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v.48, n.1-2, p.155-171, jan, 2002.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol. 2. Major Cheese Groups. 3<sup>a</sup> edition. Oxford, Elsevier: Academic Press, 2004. 640 p.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Editora Globo S.A, 1991. 297 p.

GIANFERRI, R.; MAIOLI, M.; DELFINI, M. e BROSIO, E. A low-resolution and high-resolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufala Campana cheese. **International Dairy Journal**, v.17, n.2, p.167-176, feb, 2007.

GIORI, G. S.; VALDEZ, G. F.; HOLGADO, A. P. R. e OLIVER, G. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.9, p.2160-2164, sep, 1985.

GOBET, M.; RONDEAU-MOURO, C.; BUCHIN, S.; QUÉRÉ, J. Le.; GUICHARD, E.; FOUCAT, L. e MOREAU, C. Distribution and mobility of phosphates and sodium ions in cheeses by solid-state <sup>31</sup>P and double quantum filtered <sup>23</sup>Na NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.48, n.4, p.297-303, apr, 2010.

GRANDIZOLI, C. W. P. S. **Investigação de biomarcadores indicativos da evolução do acidente vascular encefálico através de RMN aliada a quimiometria**. 2014. 187f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Curitiba, 2014.

GUERRA, T. M. M. e GUERRA, N. B. Influência do Sorbato de Potássio e do Tipo de Embalagem Sobre a Vida Útil do Queijo de Manteiga (Requeijão do Norte). Braz. **Journal of Food Thecnology**, v.06, n.2, p.259-265, jul/dez, 2003.

- IBAÑEZ, E. E CIFUENTES, A. New analytical techniques in food science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.41, n.6, p.413-450, sep, 2001.
- KAFFARNIK, S.; EHLERS, I.; GROBNER, G; SCHLEUCHER, J. e VETTER, W. Two-Dimensional  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy Profiling of Phospholipids in Cheese and Fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.29, p.7061-7069, jul, 2013.
- KINDSTEDT, P. S. **Cheese and Culture: A History of Cheese and Its Place in Western Civilization**. White River Junction: Chelsea Green Publishing, 2012. 256 p.
- LAMANNA, R.; PISCIONERI, I.; ROMANELLI, V. e SHARMA, N. A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by  $^1\text{H}$ -NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.46, n.9, p.828-831, sep, 2008.
- LATTIN, J.; CARROLL, J. D. e GREEN, P. E. **Análise de dados multivariados**. Tradução: Harue Avritscher. São Paulo, Cengage learning, 2011. 475 p.
- LEITE, A. L. B. e LOURES, A. G. R. A inserção do Brasil no Mercado internacional de lácteos. **Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite** (Juiz de fora, MG), 2005. 180 p.
- LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basics of Magnetic Nuclear Resonance**. 2<sup>a</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2008. 714 p.
- LLANO, D. G. de; RODRIGUEZ, A. e CUESTA, P. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening – analysis by HPLC. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, n.5, p.570 – 576, may, 1996.
- LUCEY, J. A.; MAURER - ROTHMANN, A. e KALIAPPAN, S. Functionality of Ingredients: Emulsifying Salts. **Processed Cheese and Analogues**. First edition, Blackwell Publishing, 2011. 368 p.
- MAAS, W. **Applications of High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy**: version 1.0. Bruker Instruments, Inc, 1997. 41 p.
- MANINNA, L.; SOBOLEV, A. P. e VIEL, S. Liquid State  $^1\text{H}$  high field NMR in food analysis. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.66, p.1 – 39, oct, 2012.
- MARTH, E. H. e STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. Second edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. 736 p.

- MATTANA, P. **Desenvolvimento de requeijão cremoso com baixo teor de lactose produzido por acidificação direta e coagulação enzimática**. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2011.
- MAZIERO, M. T.; VIANA, C. e BERSOT, L. S. Microrganismos psicrotróficos lipolíticos em produtos lácteos durante o prazo comercial. **Rev. Inst. Latic. “Candido Tostes”**, v.65, n.372, p.30-35, jan/fev, 2010.
- MAZZEI, P.; PICCOLO, A. <sup>1</sup>H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability for mozzarella cheese from Campania buffalo milk. **Food Chemistry**, v.132, n.3, p.1620-1627, jun, 2012.
- McKAY, R, T. How the 1D-NOESY Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: An Examination of the Pulse Sequence Components and Evolution. **Concepts in Magnetic Resonance Part A - Bridging Education and Research**, (Edmonton, Alberta, Canada), 2011, v.38A, n.5, p.197 – 220, sep, 2011.
- McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n. 2/3, p.127 – 144, may/aug, 2004.
- McSWEENEY, P. L. H. e SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. **Dairy Science and Technology**, v.80, n.3, p.293 – 324, may/jun, 2000.
- MINGOTI, S. A. **Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 295 p.
- MOZZI, F.; ORTIZ, M. A.; BLECKWEDEL, J.; VUYST, L. D. e PESCUA, M. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 54, n.1 p.1152-1161, nov, 2013.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Trad. Fabiana Horn (coord.). 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.1273 p.
- NORONHA, N.; DUGGAN, E.; ZIEGLER, G. R.; O’RIORDAN, E. D. e O’SULLIVAN, M. Investigation of imitation cheese matrix development using light microscopy and NMR relaxometry. **International Dairy Journal**, v.18, n.6, p.641-648, jun, 2008.

NUNES, P. G. A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicadas às espectrometrias UV-VIS e NIR**. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, João Pessoa, 2008.

OCHI, H.; NAITO, H.; IWATSUKI, K.; BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Metabolomics based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses whit gas chromatography/time-of-flight-mass spectroscopy, and its application to sensory predictive modeling. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.113, n.6, p.751-758, jun, 2012.

PAULI, G. F.; GODECKE, T.; JAKI, B. U. e LANKIN, D. C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR. Development and Potencial of na Analytical Mhethod: An Update. **Journal of Natural Products**, v.75, n.4, p.834 – 851, 2012.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C; ÁLVAREZ, L. F; SANZ, M. L. G; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALLES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Trad. Fátima Murrad. Vol. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, mar/apr, 2004.

PILLONEN, L.; LUGINBUHL, W.; PICQUE, D.; SCHALLER, E.; TABACCHI, R. e BOSSET, J. O. Analytical Mhethods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese mid- and near-infrared spectroscopy. **European Food Research Technology**, v.216, n.2, p.174 – 178, feb, 2003.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul/sep, 2006.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S. e MOURA, A. C. Qualidade Microbiológica de Queijo Minas Frescal comercializado no Município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico** (São Paulo), v.78, n.2, p.191-198, 2011.

PIRAS, C.; MARINCOLA, F. C.; SAVORANI, F.; ENGELSEN, S. B.; COSENTINO, S.; VIALE, S. e PISANO, M. B. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. **Food Chemistry**. v.141, n.3, p.2137-2147, dec, 2013.

**POLO de Excelência do Leite - Tecnologia de Queijos.** Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior - Governo de Minas. [Desenvolvida pela Equipe Agrotube], 2011. Disponibiliza informações sobre a tecnologia de queijos e derivados. Reportagem, 6'07". Disponível em <<https://www.youtube.com/watch?v=HEEvUcP9dic>> Acesso em: 06 de abril de 2014.

RABELO, M. **Decon:** Distribuidora que armazenava produtos vencidos e de forma irregular é interditada. Polícia Civil do Estado de Goiás – Delegacia de Defesa do Consumidor. Publicado em 09/03/2012. Disponível em <<http://www.policiacivil.go.gov.br/noticias/policia-civil-distribuidora-que-armazenava-produtos-vencidos-e-de-forma-irregular-e-interdita-pela-decon.html>>.

REICH, J. H. **Second Order Effects in Coupled Systems**, Last update: 02/12/2015. Disponível em: <<http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem605/>>. Acesso em: 02/05/2015.

ROBINSON, R. K. M. A. **Microbiologia Lactologica: Microbiologia de los productos lácteos.** Trad. Bernabé Sanz Perez e Juan Antonio Ordóñez Pereda. Vol. 2. Zaragoza: ACRIBIA, S. A., 1987. 298 p.

SCANO, P.; ANEDDA, R.; MELIS, M. P.; DESSI, M. A.; LAI, A. e ROGGIO, T. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. **Journal of the America Oil Chemists' Society**. v.88, n.9, p.1305-1316, sep, 2011.

SCHIEVANO, E.; GUARDINI, K. e MAMMI, S. Fast Determination of Histamine in Cheese by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.57, n.7, p.2647-2652, 2009.

SHINTU, L. e CALDARELLI, S. High-Resolution MAS NMR and Chemometrics: Characterization of the Ripening of parmigiano reggiano Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.4026-4031, may, 2005.

SHINTU, L.; ZIARELLI, F. e CALDARELLI, S. Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.42, n.4, p.396-401, apr, 2004.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A. V.; ALMEIDA, M. F.; SOUZA, R. C. N. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. Circular Técnica 104. **Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite** (Juiz de Fora, MG), 2010. 11 p.

SMIT, G.; SMIT, B. A. e ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.3, p. 591-610, aug, 2005.

TUNICK, M. H. **The science of cheese**. New York: Oxford University Press, 2014. 281 p.

VICINI, L. **Análise Multivariada da Teoria à Prática**. 2005. 215 f. Monografia (Especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa), Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Estatística, Santa Maria, 2005.

VIEIRA, L. C. e LOURENÇO JR, J. B. Tecnologia de Fabricação do Queijo mussarela. Comunicado Técnico 162. **Embrapa – Amazônia Oriental** (Belém, PA), nov, 2006. 4 p.

WISHART, D. S.; TZUR, D.; KNOX, C.; EISNER, R.; GUO, A. C.; YOUNG, N.; CHENG, D.; JEWELL, K.; ARNDT, D.; SAWHNEY, S.; FUNG, C.; NIKOLAI, L.; LEWIS, M.; COUTOULY, M. A.; FORSYTHE, I.; TANG, P.; SHRIVASTAVA, S.; JERONCIC, K.; STOTHARD, P.; AMEGBEY, G.; BLOCK, D.; HAU, D. D.; WAGNER, J.; MINIACI, J.; CLEMENTS, M.; GEBREMEDHIN, M.; GUO, N.; ZHANG, Y.; DUGGAN, G. E.; MACLNNIS, G. D.; WELJIE, A. M.; DOWLATABADI, R.; BAMFORTH, F.; CLIVE, D.; GREINER, R.; LI, L.; MARRIE, T.; SYKES, B. D.; VOGEL, H. J. e QUERENGESSER, L. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v 35, p. 521-526, jan, 2007.

WOO, A. H. e LINDSAY, R. C. Concentrations of Major Fatty Acids and Flavour Development in Italian Cheese Varieties. **Journal Dairy Science**, v.67, n.5, p.960-968, may, 1984.