Danielli Cavaretti Golinelli

Avaliação da coagulação e sinérese do leite por RMN-DT

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica
Orientador: Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos – SP

2019

Danielli Cavaretti Golinelli

Avaliação da coagulação e sinérese do leite por RMN-DT

São Carlos – SP

2019

Dedico esse trabalho à minha família, por todo incentivo, e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada, na comunhão com amigos, foi essencial durante minha formação acadêmica.

Agradecimentos

Ao professor Daniel Cardoso, pela orientação, cooperação e principalmente pela paciência e compreensão durante a minha ausência.

Ao Professor Colnago, meu pai científico, por me abrir as portas para a pesquisa, me fazendo acreditar que estava no caminho certo, pela orientação, incentivo e por toda a dedicação.

À Vivian Vazquez Thyssen, minha irmã, pela rede de apoio durante os momentos de ansiedade, pelos conselhos e pela ajuda na formatação das referências.

Aos meus amigos do IQSC, turma 06 e agredados, Daia (cumadi), Zé (cumpadi), Túlio, Juba, Balbino, Herbert, Fer pelos reencontros e momentos de nostalgia.

Aos meus amigos Jojo, Robs, Renata, Debs, Marquinhos, Georges, Pati Rodela e a à turma da Bife (Diego, Bueno, JH, Pacu, Vitão), pelos cafés, festas, momentos de distração e troca de experiências.

À família Matos, minha segunda família, pelas recepções calorosas e por acreditarem em mim: Rafa, Bia, Murilinho, Rê, Jibóia e agregados.

À Priscila Taboada, pelo direcionamento, pelo apoio durante as crises, por ouvir meus desabafos e por me ensinar a me cuidar, me ajudando a entender meu funcionamento. Você foi essencial na minha busca por realização pessoal e profissional.

À Juliana de Almeida Prado, pela sensibilidade, por me ajudar a dormir, e me ensinar a identificar meus pontos fracos.

Às minhas queridas amigas Tati, Gabi, Maiara, Cirlei, ao meu amigo Rodrigo e à toda equipe de pesquisa da RMN da Embrapa, pela colaboração e pelos momentos de diversão fora do laboratório também.

À Marcela, ao Luiz e ao grupo de Química Inorgânica e Analítica do IQSC, por me ajudarem prontamente sempre.

Aos técnicos da Embrapa e do IQSC.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo e a Embrapa pela infraestrutura oferecida para a realização do trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu irmão (Di) e minha cunhada (Lia), por trazerem ainda mais alegria para minha vida, nos dando o melhor presente de todos, a minha sobrinha e afilhada Marianinha!

À minha MãeZé e ao meu pai galinho chicken little, que sempre estiveram ao meu lado, nunca me deixando desistir, sendo os grandes responsáveis pelos caminhos que percorri até agora e por me ensinarem que a única coisa que a vida não pode nos tirar é o conhecimento

A todos, muito obrigada!

“HAKUNA MATATA”
(Timão e Pumba; Rei Leão, 1994.)

RESUMO

A Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo é amplamente utilizada em análises qualitativas de alimentos, por ser um método rápido, não destrutivo e que exige pouco preparo de amostra. Tendo em vista a importância econômica do setor de laticínios no Brasil, em especial na fabricação de queijos, este trabalho teve como objetivo principal estudar a coagulação e sinérese em queijo Minas frescal, com a finalidade de verificar a influência do ponto de corte e do tempo de coagulação durante a produção, garantindo a qualidade do produto final. Foi observado que a relaxação T_2 das amostras possui dois componentes, referidos como T_2 longo e T_2 curto, que estão associados aos diferentes ambientes dos hidrogênios da água gerados durante a coagulação, sendo o T_2 longo relativo aos hidrogênios da água presente no soro e T_2 curto referente aos hidrogênios da água confinada nos coágulos. Constatou-se que a técnica RMN-DT apresenta potencial para determinar o melhor momento de corte do coalho por meio da observação dos valores da razão entre T_2 longo/ T_2 curto. A partir desta razão, foi possível observar a evolução do processo de sinérese em queijos produzidos com leite em diferentes teores de gordura (3,5%, 1% e 0%) e determinar o melhor momento para a enformagem a fim de minimizar perdas na produção. Pensando na utilização da técnica para a avaliação da coagulação e sinérese do leite in situ, estudou-se também a influência de campo magnético durante o processo de coagulação e dessoro de queijo Minas do tipo frescal. Concluiu-se que a presença do campo magnético equivalente ao do equipamento (0,23T) interfere na coagulação do leite, bem como no processo de sinérese, já que houve variação significativa na razão T_2 longo/ T_2 curto ($p < 0,05$) entre as amostras que coagularam na presença do campo magnético (0,23T) e fora do contato de campo magnético. Sendo assim, a presença de campo magnético aparenta não causar prejuízos na coagulação podendo favorecer a sinérese.

ABSTRACT

Time Domain Nuclear Magnetic Resonance is widely used in qualitative food analysis because it is a fast, non-destructive method that requires little sample preparation. Given the economic importance of the dairy industry in Brazil, especially in the manufacture of cheese, this work aimed to study the coagulation and syneresis in Minas frescal cheese, to check the influence of the cutoff point and time of coagulation, ensuring the quality of the final product. It was observed that the T_2 relaxation of the samples has two components, referred to as T_2 long and T_2 short, which are associated with different environments of water hydrogens generated during coagulation, being T_2 long relative to water hydrogens present in serum and T_2 short referring to the hydrogens in the water confined in the clots. It was found that the NMR-DT technique has the potential to determine the best curd cutting moment by observing the values of the ratio between T_2 long/ T_2 short. Therefore, it was possible to observe the evolution of the syneresis process in cheeses produced with milk with different fat content (3.5, 1, and 0 %) and to determine the best time to transfer the rennet to minimize losses in production. Considering the use of the technique for the evaluation of milk coagulation and syneresis in situ, it was also studied the influence of the magnetic field during the coagulation and desorption process of Minas frescal cheese. It was concluded that the presence of the magnetic field equivalent to the equipment (0.23T) interferes with milk coagulation as well as the syneresis process, since there was a significant variation in the T_2 long/ T_2 short ratio ($p < 0.05$) between the samples that coagulated in the presence of the magnetic field (0.23T) and outside the magnetic field. Thus, the presence of the magnetic field does not appear to cause damage to coagulation and may favors syneresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das micelas de caseína no leite.....	6
Figura 2 - Etapas do processo industrial de produção do queijo Minas frescal.....	8
Figura 4 - Polarização da magnetização após a aplicação do pulso de RF.	17
Figura 5 - (a) FID adquirido em campo não homogêneo, com constante de tempo T_2^* ; (b) FID adquirido em campo homogêneo, com constante de tempo T_2 (natural da amostra).	20
Figura 6 - Sequência de pulso de CPMG.	20
Figura 7 - Esquema vetorial da sequência de pulsos CPMG.	22
Figura 8 - Sinais de RMN obtidos com sequência CPMG para amostras antes do corte do coalho e após 40 minutos de dessoro.	28
Figura 9 - Ajuste biexponencial do decaimento de CPMG feito com a amostra após 40 minutos de dessoro.	29
Figura 10 - Processamento ILT dos sinais CPMG após 40 minutos dessorando.....	30
Figura 11 - Processamento ILT dos sinais CPMG antes do corte do coalho	30
Figura 13 - Variação de T_2 curto após a sinérese em função do tempo de coagulação antes do corte.....	33
Figura 14 - Variação de T_2 longo em função do tempo de coagulação antes do corte.	34
Figura 15 - Variação da relação T_2 longo/ T_2 curto em função do tempo de coagulação antes do corte.....	34
Figura 16 – Curvas de decaimentos de sinal de CPMG em amostras de leite com diferentes teores de gordura: decaimentos de CPMG das amostras de leite com diferentes teores de gordura.	36
Figura 17 – Curvas de decaimentos de sinal de CPMG em amostras de leite ao final de 40 minutos de sinérese com diferentes teores de gordura.....	37
Figura 18 - Variação da relação relaxação T_2 longo/ T_2 curto em função do tempo de sinérese em leites com diferentes teores de gordura.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de relaxação T_2 e os pesos relativos, para os ajustes biexponencial e triexponencial.	29
Tabela 2 - Valores do tempo de relaxação das amostras controle, sem corte, durante os 40 minutos de análise.....	35
Tabela 3 – Variação de T_2 longo, T_2 curto e relação entre T_2 longo / T_2 curto em amostras coagulando na presença do campo magnético (B) do equipamento versus amostras fora do campo magnético (B=0)	41
Tabela 4 - Valores das médias da relação T_2 longo/ T_2 curto e P uni-caudal obtidos por teste T não pareado para amostras submetidas a coagulação enzimática dentro do campo (B) e fora do campo magnético (B=0).....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Composição do Leite	5
2.1 Produção de Queijo	Erro! Indicador não definido.
2.1.2 Etapas do processo de produção de queijo Minas frescal	7
2.2.1 Pasteurização	9
2.2.2 Preparo do leite para a etapa de coagulação	9
2.2.2.1 Adição de Fermento	9
2.2.2.2 Adição de Cloreto de Cálcio	10
2.2.2.3 Coagulante	10
2.2.2.3.1 Coagulação ácida	11
2.2.2.3.2 Coagulação enzimática	11
2.2.3 Tratamento da massa e agitação	12
2.2.4 Enformagem, salga, embalagem e armazenamento	12
2.2 Rendimento e padronização na produção de queijos	12
2.3 Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) em alimentos	14
2.4 Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear	15
2.4.1 Relaxação Longitudinal (T_1)	18
2.4.2 Relaxação Transversal (T_2)	19
2.4.2.1 Mecanismo de Relaxação Transversal (T_2) na difusão da água durante o processo de sinérese em queijos	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específico	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais	25

4.2 Preparação de amostras	25
4.3 Avaliação do ponto de corte do coalho	26
4.4 Avaliação do processo de sinérese em leite com diferentes teores de gordura. .	26
4.5 Previsão de rendimento no processo de produção do queijo Minas frescal a partir dos valores de T_2 longo.	Erro! Indicador não definido.
4.6 Interferência do campo magnético na coagulação do leite	27
4.6 Aquisição de dados por RMN-DT	27
4.6.1 Determinação do tempo de relaxação T_2 por meio do método de CPMG	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Análise do tempo de relaxação transversal (T_2) do leite.	28
5.2 Avaliação do ponto de corte do coalho	31
5.3 Avaliação do processo de sinérese em leites com diferentes teores de gordura.	35
5.4 Previsão do rendimento no processo de produção do queijo Minas frescal a partir dos valores de T_2 longo.	Erro! Indicador não definido.
5.5 Influência do Campo magnético na coagulação	40
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento importante, com nutrientes essenciais para o desenvolvimento, principalmente durante a infância. Segundo dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2015), um copo de leite por dia fornece a uma criança de cinco anos 21% da dose recomendada de proteína e 8% de calorias, além dos minerais, cálcio, magnésio e selênio, e vitáMinas como riboflavina (vitamina B₂), cobalamina (vitamina B₁₂), e ácido pantotênico (vitamina B₅).

Além de nutritivo, estudos relataram vários efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de leite e derivados. A ingestão de lactose, componente abundante em laticínios, é uma fonte de energia, que também favorece a absorção de Ca²⁺, estimulando a ossificação e prevenindo a osteoporose. Sua atuação consiste na interação com as vilosidades intestinais, sobretudo no nível do íleo, aumentando sua permeabilidade ao cálcio, o que minimiza, em parte, a deficiência de vitamina D (ORDONES, J. A. et al, 2005).

Produtos lácteos, como fonte de fosfolipídios, atuam na inibição da absorção do colesterol, regulação de reações inflamatórias e efeitos preventivos e terapêuticos em alguns tipos de câncer (COHN, 2010; DUAN; NILSSON, 2009).

Estudos relatam os efeitos benéficos do consumo de fosfolipídios provindos de produtos lácteos. Altos níveis do fosfolipídio esfingomielina na dieta demonstraram efeito preventivo e terapêutico em tumores de cólon quimicamente induzidos em cobaias (SCHMELZ, 2009).

Estudos com crianças encontraram uma associação entre a ingestão de leite e derivados e prevenção de cáries dentárias, perda de dentes ou as manchas dentárias, tanto na dentição de leite quanto na dentição permanente. O efeito positivo de leite e derivados na saúde dentária deve-se ao seu teor em cálcio, fósforo, caseína e lipídeos, que são componentes com ação anticariogénica segundo FERNÁNDEZ et al., 2015. Já na população adulta, a ingestão de laticínios associa-se a uma reduzida formação de placa dentária.

NAGAI ET AL (2012), evidenciaram que o consumo de fosfolipídios advindo de leite bovino pode prevenir a morte de células neuronais evitando a degeneração do

sistema nervoso, devido ao estresse oxidativo, associado com a perda de memória e capacidade cognitiva.

HARTMANN ET AL. (2009) investigaram o efeito de fosfolipídios na artrite quimicamente induzida em ratos. Eles encontraram um desenvolvimento significativamente reduzido de artrite após a suplementação com fosfolipídio, provavelmente devido a uma inibição da reação inflamatória.

Conforme dados do Anuário Leite Embrapa Gado de Leite (2018), nas últimas quatro décadas, a produção nacional de leite quadruplicou, passando de 7,1 bilhões para mais de 35,1 bilhões de litros de leite.

A FAO apontou que a produção de leite em 2016 foi de 798 milhões de toneladas, sendo 83% dessa produção proveniente de bovinos. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de produção de leite, sendo que, 42,9% do leite produzido é destinado ao consumo *in natura*, 25,2% é destinado a produção de queijo e 31,9% para outros derivados (FAO, 2015).

No Brasil, o setor de laticínios tem grande importância econômica, em especial na fabricação de queijos, ocupando o sexto lugar em produção mundial. Entre as variedades de queijos produzidas, destacam-se pelo elevado consumo os queijos do tipo: Minas, mozzarella, ricota, prato e parmesão (LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G., 2001).

Durante a produção de queijos, aproximadamente 25% das proteínas do leite não são aproveitadas, sendo perdidas no soro durante o processo de fabricação (KOSIKOWSKI, 1982; FOX e MCSWEENEY, 1998; WALSTRA et al., 1999).

De acordo com DE PAULA et al. (2009), nos processos industriais de fabricação de queijo no Brasil, cerca de 10 a 15% da gordura do leite se perdem no soro no momento do corte, sendo o rendimento e a composição do queijo determinados pela composição do leite e pelas etapas do processo de fabricação

Algumas etapas da conversão do leite em queijo, são determinadas sensorialmente pelo queijeiro, podendo influenciar na qualidade final do produto. As etapas principais são: coagulação, acidificação, dessoramento (sinérese), enformagem e a salga (DE PAULA et al., 2009).

O controle dessas etapas é essencial para um bom rendimento e padronização na produção do queijo contribuindo para garantir a competitividade do produto no mercado com relação a qualidade e preço (CIÊNCIA DO LEITE, Rendimento na fabricação de queijos, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição do Leite

O leite é um sistema coloidal estável composto por aproximadamente 87% de água e 13% de sólidos envolvendo lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. A composição do leite pode variar de acordo com o estágio de lactação, raça das vacas, alimentação, temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária.

Entre os componentes sólidos, a lactose compreende aproximadamente 52% dos sólidos totais do leite desnatado e 70% dos sólidos encontrados no soro do leite, sendo responsável pelo equilíbrio da pressão osmótica na glândula mamária.

As proteínas (caseínas e proteínas solúveis) representam entre 3% e 4% dos sólidos encontrados no leite, podendo variar de acordo com a raça e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite (HARAGUCHI, FABIANO K.; ABREU, WILSON C.; PAULA, H. DE., 2006).

As caseínas incluem diferentes subtipos e variantes genéticas (α , β e κ -caseína) e encontram-se associadas em micelas formando partículas coloidais no leite. As micelas de caseína e gordura são responsáveis pela maior parte das propriedades nutricionais, sensoriais e de textura, dos principais produtos lácteos, representando a maior concentração de elementos sólidos (DE KRUIF ET AL., 2012)

A caseína permanece estável durante a pasteurização, em forma de micelas, representadas na figura 1, devido sua propriedade anfifílica, possuindo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (DE KRUIF & GRINBERG, 2002). A conformação das micelas expõe os resíduos hidrofóbicos, formados pelos grupos fosfatos associando as caseínas, tornando-as insolúveis em água (GOFF, H.D., 2009).

Figura 1 - Representação das micelas de caseína no leite.

Fonte: Adaptado de WALSTRA, P. et al., 1999.

Aproximadamente 95% das caseínas no leite estão presentes na forma de partículas coloidais, micelas, que são as responsáveis pela estabilidade térmica do leite (FOX, P. F.; BRODKORB, A, 2008).

A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α s1-, α s2-, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína, glicoproteína, está localizada na superfície da micela e assume um papel importante na estabilidade do colóide (DALGLEISH, D.G., 2011).

Quando ocorre uma mudança de pH ou adição de enzimas proteolíticas, há rompimento da estrutura das micelas, ocorrendo a precipitação da caseína e a formação de coágulos, importante na obtenção dos derivados do leite (FOX, P. F.; BRODKORB, A, 2008).

No soro encontramos outras proteínas, das quais se destacam a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro de vaca, algumas imunoglobulinas, e ainda lactotransferrina, lactoperoxidase e lisozima que possuem propriedades antimicrobianas (VELOSO, A.C.A., 2001).

As proteínas do soro são em sua maioria proteínas globulares, com alta hidrofobicidade (Phadungath, 2005), e permanecem solúveis no soro do leite após a

precipitação da caseína em pH 4,6 e temperatura de 20°C (Farrell Jr et al., 2006). As principais proteínas do soro são β -lactoglobulina e α -lactalbumina. A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante do soro, aproximadamente 80%, representando, no leite bovino, cerca de 3,2 g/L e apresenta alta resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago além de apresentar o maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, sendo também importante carreadora de retinol (pró vitamina A) (DE WIT, 1998).

A α -lactalbumina, precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário (LÖNNERDAL, 2003), é a segunda proteína do soro em maior quantidade (15% a 25% das proteínas do soro) do leite bovino (SHANNON ET AL., 2003), de fácil e rápida digestão. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes proteicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cisteína (MARKUS ET AL., 2002).

A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos, suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por fosfolipídios, que apresentam comportamento anfifílico, e impedem a união dos glóbulos, mantendo a gordura na forma de suspensão (COSTA, M. R ET AL., 2010).

A fração de gordura do leite varia geralmente entre 3,5 e 5,3%, em razão de diferenças entre raças, estágio da lactação e de acordo com a alimentação dos animais e serve de veículo para as vitáminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e outras substâncias solúveis em gordura, como os carotenóides (pro-vitamina A) (COSTA, M. R ET AL., 2010).

O leite é uma excelente fonte de sais minerais, cálcio, fósforo e vitáminas. Algumas vitaminas se associam com a gordura (A, D, E e K), enquanto outras se associam com o soro, tais como as vitaminas do complexo B e a vitamina C (GONZÁLEZ, F.H.D., 2001).

2.2 Etapas do processo de produção de queijo Minas frescal

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997), o queijo Minas do tipo frescal trata-se de um queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de

bactérias lácticas específicas, sendo classificado como um queijo fresco, semi-gordo, com 25% e 44,9% de matéria gorda no extrato seco (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, 1996), com umidade entre 52 % e 62 %, possuindo formato cilíndrico, peso entre 0,3 kg e 5,0 kg, cor esbranquiçada, consistência branda e/ou macia, textura com ou sem olhaduras mecânicas, odor e sabor suave e característico e baixa acidez.

Segundo Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), em 2015, foram captados por indústrias de laticínios aproximadamente 70% da produção nacional. O leite informal é vendido diretamente ao consumidor e processado na própria fazenda. A maior parte desta produção se transforma em queijo Minas padrão, mozzarella e queijo Minas frescal que ocupa terceiro lugar na escala de produção.

As etapas do processo de produção estão ilustradas na figura 2, e serão descritas nos próximos tópicos.

Figura 2 - Etapas do processo industrial de produção do queijo Minas frescal

Fonte: Adptado de SILVA ,2005.

2.2.1 Pasteurização

O leite utilizado na fabricação de queijos frescos deve ser pasteurizado de acordo com a portaria Nº 146/1996 do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, que tem por objetivo fixar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade. De acordo com o item 7 dessa portaria, o leite utilizado na produção de queijos deverá ser higienizado por meios mecânicos apropriados e pasteurizado.

A pasteurização garante que o leite esteja isento de microrganismos contaminantes prejudiciais à saúde, podendo ser feita por dois processos: lento, aquecendo-se o leite até 65°C, mantendo-o nessa temperatura por 30 minutos e resfriando-o em seguida, até 34°C, ou rápido, utilizando um pasteurizador de placas, no qual o leite deve ser aquecido a temperatura de 72°C a 75°C, durante 12 a 15 segundos e resfriado até 34°C, próxima a temperatura ótima da enzima utilizada para a produção do queijo (SILVA, 2005).

2.2.2 Preparo do leite para a etapa de coagulação

2.2.2.1 Adição de Fermento

Após a pasteurização, etapa onde ocorre a inativação de microrganismos favoráveis à produção de queijo, é preciso repor essa perda por meio da adição de fermento. O fermento tem como finalidade produzir ácido láctico inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis, melhorar a consistência do coágulo e auxiliar na etapa de retirada do soro (SILVA, 2005).

Para a fabricação de queijo Minas frescal é utilizado fermento composto por *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*. Esses microrganismos são classificados como mesófilos, ou seja, crescem bem na faixa de temperatura entre 30°C e 37°C. A quantidade a ser adicionada é de 1% a 1,5% em relação à quantidade de leite utilizada na fabricação dos queijos (SILVA, 2005; SANGALETTI, 2007).

2.2.2.2 Adição de Cloreto de Cálcio

Após a pasteurização, os íons de cálcio solúveis, presente naturalmente no leite, precipitam, sendo necessário a adição de cloreto de cálcio. De acordo com FURTADO (1991), o tratamento térmico rompe o equilíbrio entre os sais de cálcio e fósforo solúveis e coloidais e com a diminuição do teor de cálcio solúvel, as ligações entre as micelas de paracaseína são enfraquecidas, dificultando a formação do coágulo de paracaseinato de cálcio.

O cloreto de cálcio, quando adicionado, garante a coagulação rápida, completa e confere elasticidade à massa do queijo. A quantidade a ser acrescentada varia de 0,02% a 0,03% m/m (de 20 a 30 g por 100 L de leite) (SILVA., 2005).

2.2.3 Coagulação

A fabricação de queijos requer coagulação do leite para posterior desenvolvimento de sinérese ou dessoro. Sinérese é a denominação do fenômeno de encolhimento da rede do gel, do qual resulta a expulsão de líquidos de poros, ou seja, é o processo de expulsão gradativa do soro devido à contração do gel formado após a adição de um agente coagulante (ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; BOLINI, H. M. A., 2004.)

A adição do agente coagulante ou coalho vai promover a coagulação do leite, formando a massa do queijo e deve ser o último ingrediente a ser acrescentado. O coagulante pode ser ácido gerando a coagulação ácida ou de origem animal, microbiana ou vegetal para uma coagulação enzimática.

A quantidade de coalho a ser adicionada é sugerida pelo fabricante, assim como a temperatura ideal do leite para a etapa.

O coalho deve ser adicionado aos poucos e sempre sob agitação, devendo essa operação levar no máximo 3 minutos. Após esse momento o leite deve ficar em repouso até que a coalhada esteja firme para o corte (SILVA, 2005).

2.2.3.1 Coagulação ácida

A coagulação ácida do leite consiste na redução do pH por acúmulo de ácido láctico produzido por bactérias presentes no leite, por meio do metabolismo da lactose.

A redução do pH produz dois efeitos nas micelas de caseínas presentes no leite:

- Influencia na solubilização dos sais cálcicos das micelas de caseína, produzindo migração progressiva do cálcio e dos fosfatos para a fase aquosa, promovendo a desmineralização das caseínas fazendo com que a micela se desestabilize e precipite;
- Quando o pH é próximo ao ponto isoelétrico (4,6) neutraliza as cargas e a repulsão deixa de existir permitindo que as partículas se unam formando um coágulo (SGARBIERI, V.C., 2005).

2.2.3.2 Coagulação enzimática

A coagulação do leite tem seu início após a adição do coalho. A estabilidade coloidal da caseína no leite *in natura* é decorrente de repulsões eletrostáticas e impedimento estérico conferido especialmente pelo glicopeptídeos terminal da κ -caseína presente nas micelas (WALSTRA, 1999). Quando a enzima quimosina (coalho) é adicionada ao meio (leite), ocorre a clivagem da ligação peptídica entre o aminoácido fenilalanina e metionina da K-caseína, liberando o glicopeptídeo, expondo o núcleo hidrofóbico, e assim desestabilizando o sistema coloidal pela formação da paracaseína, que na presença de íons Ca^{2+} forma o paracaseinato de cálcio, que se une em coágulos (FOX et al., 2000). Após coagular, as micelas de paracaseína formam um gel. Conforme os glóbulos se aproximam, aumentam de tamanho e consequentemente aumentam também a pressão sobre o sistema, estimulando a expulsão da água de dentro do sistema após o corte do coalho, fazendo com que o gel se encolha gradativamente (WALSTRA, P., et al, 1985). O tempo necessário para que ocorra essa etapa é de aproximadamente 45 minutos e é determinado sensorialmente pelo queijeiro na indústria.

2.2.3 Tratamento da massa e agitação

Ao final da etapa de coagulação é feito o corte da coalhada que deve ser feito no momento correto, pois se for antecipada estimula a perda de caseína e gordura para o soro, e quando cortada com atraso, prejudica a retirada do soro, deixando a massa com aspecto “emborrachado” (PIRES, 2013).

O ponto de corte correto é determinado sensorialmente com a parte dorsal da mão (“costas da mão”), pelo queijeiro, fazendo uma leve pressão na superfície da massa próximo à parede do recipiente onde está sendo feito o queijo. Quando a massa se desprende facilmente da parede, é sinal de que está no ponto de corte (SILVA, 2005).

O corte é feito com a lira, utensílio formado por lâminas ou fios cortantes dispostos paralelamente e igualmente distantes entre si, sendo utilizadas uma lira vertical e uma horizontal (SILVA, 2005).

Após o corte, é feita a agitação dos cubos durante 1 minuto, intercalando com repouso de 3 minutos, repetindo essa operação por 30 minutos (SILVA, 2005).

2.2.4 Enformagem, salga, embalagem e armazenamento

Após a agitação, a massa é transferida para a forma com furos, de modo a retirar o excesso de soro. Após 30 minutos a massa é revirada. Esse procedimento deve ser repetido ao menos 3 vezes, e ao final da viragem coloca-se sal na superfície do queijo e embala-se em saco plástico para armazenamento (SILVA, 2005).

2.3 Rendimento e padronização na produção de queijo Minas frescal.

O Minas frescal, é um queijo bastante variável no que diz respeito a consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento (FURTADO, 1991), não apresentando uma padronização durante seu processo podendo variar de 12 a 18% de proteína e 17% até 19% de gordura (OLIVEIRA, 1986).

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I., 2006, evidenciaram em trabalho publicado a necessidade da padronização em queijos Minas frescal para garantir qualidade do produto e segurança para o consumidor.

Alguns parâmetros são responsáveis por influenciar na qualidade final do queijo e no rendimento da produção, como o controle da qualidade do leite e dos ingredientes utilizados, assim como a padronização durante todo o processo de fabricação de laticínios (DE PAULA, et al., 2009).

Na fabricação dos queijos o teor de gordura é um dos fatores que implicam na qualidade do queijo. De acordo com RODRÍGUEZ, 1998, o teor de gordura no leite determina a textura do queijo, proporcionando maciez, quando interage com a proteína. Quando a gordura é retirada em excesso, a massa do queijo torna-se mais firme e elástica (PINHEIRO, M. V. S.; PENNA A. L. B., 2004).

Além disso, a gordura está relacionada com o rendimento, pois quando retirada, é substituída por água, mas não na mesma proporção. (MISTRY., 2001). Diante disso, fica evidente a necessidade de padronizar o leite, estabelecendo-se um teor de gordura padrão, por meio da adição de creme e leite desnatado e da homogeneização dos glóbulos de gorduras (HOHENDORFF; SANTOS., 2006, SILVEIRA, P. RODRIGUES DA; ABREU, L. RONALDO DE., 2003.).

A composição do leite com relação ao teor de proteínas também é responsável pelo rendimento final (SILVEIRA, P. RODRIGUES DA; ABREU, L. RONALDO DE., 2003.). Em relação as proteínas, a mais importante é a caseína, responsável pela formação do gel formado quando a para- κ -caseína se liga ao cálcio formando o paracaseinato de cálcio (FOX et al., 2000) e responsáveis pela maior parte das funções nutricionais e sensoriais dos principais produtos lácteos. (DE KRUIF et al., 2012).

A perda de sólidos durante o corte da coalhada, também é uma etapa crítica na produção, uma coagulação bem controlada é essencial para um bom rendimento do produto final.

De acordo com SILVA (2005), independente do grau de industrialização, a produção de queijo requer do queijeiro dedicação e cuidados em cada etapa de produção, para a obtenção de um produto com qualidade.

Considerando que o ponto de corte, mexedura e tempo de coagulação da produção do queijo Minas frescal são determinadas sensorialmente pelo queijeiro, observa-se a necessidade de um método não destrutivo para padronização dessas etapas críticas, determinantes na qualidade e no rendimento da produção.

2.4 Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) em alimentos

Os sinais de Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT), como decaimento livre da indução (FID) ou eco de spin, são amplamente usados em análises qualitativas em alimentos. Essas análises são baseadas nas diferenças de tempo de relaxação transversal T_2 das amostras. Vários exemplos dessas aplicações podem ser encontrados na literatura (ANDRADE, F.D.; COLNAGO, L. A., 2012.; NORDON, Alison; MCGILL, Colin A.; LITTLEJOHN, David, 2011)

CALLAGHAN ET AL. (1983), fizeram uso da ressonância magnética nuclear de gradiente de campo pulsado para medir os coeficientes de autodifusão de água e gordura nos queijos Cheddar e suíço, concluindo que há fortes evidências de que as moléculas de água se difundem por toda a matriz proteica, percorrendo longas distâncias.

TELLIER ET AL. (1993), utilizaram a RMN-DT para predição da quantidade de água dentro da coalhada e no soro durante a fase de sinérese. Por meio dos valores de $1/T_2$ foi possível obter informações sobre a geometria dos poros formados durante a coagulação, assim como sobre a distribuição de água.

ÖZILGEN, MUSTAFA E KAUTEN, ROBERT J. (1994) aplicaram os princípios fundamentais da termodinâmica e do fluxo de fluidos, para descrever o encolhimento simultâneo e a expulsão do soro de leite na coalhada, utilizando os dados obtidos por RMN por imagem-DT.

HANSEN, ET AL. (2009), estudaram o efeito da firmeza do gel com o tempo de corte, pH e temperatura na coagulação do leite, *in situ*, por RMN no domínio do tempo. Com base na quantificação por RMN da água do soro, obtiveram resultados sobre a taxa de sinérese, que se mostrou significativamente dependente do pH e da temperatura.

ALTAN, ET AL. (2011), mostraram que a ressonância magnética nuclear no domínio do tempo pode ser usada para acompanhar a absorção de sal e as mudanças no conteúdo de água no queijo tipo feta durante a salga, a partir da correlação entre a intensidade do sinal e o teor de água.

SANTOS ET AL. (2016), demonstraram um método rápido, fazendo uso da RMN-DT para identificar e quantificar adulterações em leite. Concluiu que o uso da

técnica, em conjunto com processamento e análise multivariada, pode ser eficaz na avaliação de adulteração em leite sendo foi possível discriminar amostras de leite controle com adulterantes que podem ser encontrados em leite (soro, ureia, peróxido de hidrogénio, urina sintética e leite sintético) a um nível de adulteração > 5% v/v.

PEREIRA ET AL. (2017), mostraram a utilização de dados de relaxação transversal no domínio do tempo (DT) e de análise multivariada na determinação não destrutiva do teor de gordura para amostras de alimentos em pó. O método apresentou uma elevada correlação ($r = 0,95$) com o teor de lípidos, determinado pelo método de extração padrão de Bligh e Dyer.

SANTOS ET AL. (2017), demonstraram um procedimento rápido usando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) para detectar adulteração de azeite de oliva com óleos vegetais poliinsaturados diretamente nas garrafas de azeite de oliva sem a adulteração do lacre. O estudo indicou cinco marcas de azeite comercializados no Brasil adulteradas com ácidos graxos poli-insaturados.

Sabendo do interesse da indústria por métodos de controle de qualidade que sejam confiáveis, rápidos, de baixo custo e com o mínimo de geração de resíduo químico, e observando o grande potencial demonstrado nos trabalhos citados utilizando a técnica para a avaliação de vários parâmetros em alimentos, em análises *in situ*, apresentando-se como um método não destrutivo, rápido e que exige pouco preparo de amostras, utilizou-se a RMN-DT para o estudo da coagulação e sinérese do leite em vários aspectos.

2.5 Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

Todas as técnicas espectroscópicas constituem um exemplo de interação da radiação eletromagnética com a matéria. Particularmente, a espectroscopia por RMN fundamenta-se na interação da rádio frequência com núcleos atômicos magnéticos com número quântico de spin I diferente de zero (apresentam número ímpar de prótons e/ou nêutrons), na presença de um campo magnético estático B_0 (CLARIDGE T. D. W, 1999).

Através de uma descrição semi-clássica, é possível explicar a interação entre o campo magnético externo com o momento magnético nuclear. Esta interação incita a orientação do spin em relação ao campo externo B_0 , precessionando com uma

frequência angular denominada frequência de Larmor (ω_L) como representado na figura 3.

Figura 3 - Representação vetorial do movimento de precessão do momento magnético nuclear na presença de um campo magnético externo B_0 .

Fonte: SILVA, C.B.S.,2007.

A condição de ressonância é obtida quando se aplica uma radiação eletromagnética, com frequência igual à frequência de precessão ou Larmor. Esta radiação eletromagnética é então absorvida promovendo a transição de spins entre os níveis de energia α (menor energia) e β (maior energia).

A distribuição de população de spins nucleares entre os dois níveis energético, α e β , ilustrados acima é dada pela equação de Boltzmann eq. (1):

$$N_\alpha/N_\beta = \exp(\Delta E/kT) \quad (1)$$

onde:

N_α = população do nível de menor energia;

N_β = população do nível de maior energia;

k = constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$);

T = temperatura.

A equação de Boltzmann demonstra que nas condições de equilíbrio haverá sempre um pequeno excesso de população no estado de menor energia. Essa diferença de população dá origem a uma magnetização resultante (M_0) que aponta na

direção z, que é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos μ que precessionam em torno de B_0 como representado na figura 4.

Figura 4 - Representação do cone de precessão e magnetização resultante M_0 na direção z.

Fonte: CLARIDGE T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Pergamon: Oxford, UK, 1999. v.1, p.14.

A condição de ressonância é então atingida quando um campo magnético oscilante linearmente polarizado B_1 e de frequência igual à de Larmor é aplicado perpendicularmente a B_0 . Dessa forma, exerce-se um torque sobre M_0 , deslocando-a θ graus em relação ao eixo z, projetando sobre este uma componente M_z e, sobre o plano xy, uma componente transversal denominada M_{xy} como exemplificado na figura 5. A componente M_{xy} é a responsável pela geração do sinal de RMN, através da indução de corrente elétrica em uma bobina receptora (CLARIDGE T. D. W, 1999).

Figura 5 - Polarização da magnetização após a aplicação do pulso de RF.

Fonte: CLARIDGE T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Pergamon: Oxford, UK, 1999. v.1, p.18.

Quando o campo aplicado B_1 é suspenso, um fenômeno denominado relaxação passa a atuar no sistema, promovendo o retorno à condição inicial de equilíbrio caracterizada por $M_z = M_0$ e $M_{xy} = 0$. O processo de relaxação envolve dois mecanismos distintos, denominados relaxação longitudinal (spin-rede) e relaxação transversal (spin-spin) (CLARIDGE T. D. W, 1999).

2.5.1 Relaxação Longitudinal (T_1)

O retorno da magnetização ao eixo z ($M_z = M_0$), ou seja, ao estado de equilíbrio térmico, é caracterizado por um crescimento exponencial cuja constante de tempo de relaxação longitudinal é denominada T_1 . Este processo está diretamente relacionado ao restabelecimento da distribuição de população dos níveis de Zeeman de energia, transferindo o excesso de energia do estado excitado para vizinhança ou rede, sob a forma de energia cinética molecular (CLARIDGE T. D. W, 1999).

Essa transferência de energia não é um fenômeno de emissão espontânea, e sim o resultado da existência de campos magnéticos flutuantes, que oscilando com frequências apropriadas em torno da frequência de Larmor, tornam a rede capaz de absorver essa energia (FORATO, L. A.; VIEIRA, CE de M.; COLNAGO, L. A., 2009). Este processo de transferência é conhecido como relaxação spin-rede ou longitudinal, e é responsável pela recuperação, de forma exponencial, da magnetização ao longo do eixo z, de acordo com a equação 2:

$$M_z = M_0[1 - \exp(-t/T_1)] \quad (2)$$

onde T_1 é o tempo de relaxação spin-rede.

O tempo de relaxação T_1 tem efeito prático marcante sobre um experimento de RMN. Se for longo, o tempo total de uma análise de RMN se estende muito, uma vez que cada sequência de pulsos deverá ser precedida por um tempo da ordem de $5T_1$ para que a magnetização recupere 99% de sua intensidade no equilíbrio térmico, evitando a saturação do sinal de RMN. O valor de T_1 depende, principalmente, da mobilidade da substância, do meio e da temperatura da amostra (CLARIDGE T. D. W, 1999).

2.5.2 Relaxação Transversal (T_2)

No processo de relaxação transversal, diferente do que ocorre no processo de relaxação longitudinal, o desaparecimento do sinal no plano xy ($M_{xy} = 0$), independe da transferência de energia para a rede. Para que suas componentes no plano xy se anulem, basta que elas percam a coerência de fase adquirida após o pulso, e comecem a precessionar ao redor de B_0 de forma incoerente. Essa perda de coerência é atribuída a interações diretas entre os momentos magnéticos individuais, sem que haja modificação da energia total do sistema, causando um processo de relaxação conhecido como spin-spin ou relaxação transversal.

A relaxação transversal é caracterizada por um decaimento exponencial da magnetização transversal, com constante de tempo T_2 , demonstrado segundo a equação 3.

$$M_{y(t)} = M_{xy} \cos(\omega_0 t) \exp(-t/T_2) \quad (3)$$

onde:

T_2 = tempo de relaxação spin-spin

M_{xy} = componente da relaxação no plano xy.

Após a aplicação do pulso de radiofrequência (radiação eletromagnética), é gerado o sinal denominado decaimento livre da indução (FID, *Free Induction Decay*). Experimentalmente, o decaimento da magnetização transversal observado no FID não retrata somente o tempo de relaxação spin-spin natural da amostra, pois a não homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) interfere nas componentes transversais da magnetização dispersando-as no plano xy. Dessa forma, a constante de tempo com a qual o FID decai é na verdade representada por um tempo de relaxação efetivo T_2^* dado pela equação 4.

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B_0 \quad (4)$$

A diminuição de T_2^* contribui para que o sinal de RMN decaia rapidamente, causando o alargamento das linhas do espectro no domínio da frequência, como ilustrado na figura 6.

Figura 6 - (a) FID adquirido em campo não homogêneo, com constante de tempo T_2^* ; (b) FID adquirido em campo homogêneo, com constante de tempo T_2 (natural da amostra).

Fonte: CLARIDGE T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Pergamon: Oxford, UK, 1999. v.1, p.18.

Sequências de pulso de radiofrequência tais como as técnicas de Eco de Spin e de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) têm sido desenvolvidas desde 1950 para a obtenção de medidas de tempo de relaxação transversal independente da homogeneidade do campo B_0 (T_2).

O método mais usado para a medida de T_2 é conhecido como CPMG, que traz as iniciais de seus autores, Carr-Purcell-Meibom-Gill (MEIBOOM S.; GILL, D., 1958.). As sequências de eco como a CPMG recuperam o sinal de RMN na forma de eco de spin, representado na figura 7, cuja intensidade é independente da não homogeneidade do campo e só decai com o tempo de relaxação T_2 .

Figura 7 - Sequência de pulso de CPMG.

Fonte: MEIBOOM, S.; GILL, D. **Modifies spin-echo method for measuring nuclear relaxation times**. The Review of Scientific Instruments, 1958. v.29, p.93.

Na figura 8 podemos observar o esquema vetorial da sequência CPMG que consiste na aplicação de um pulso de 90° no eixo x' , no instante zero (A), causando a rotação dos spins para o plano $x'y'$ (B). Ao longo do tempo τ , os spins se separam (C), então, aplica-se um pulso de 180° no eixo y' (D), ocorrendo a re-focalização para o tempo 2τ no eixo y' (E). Após o desfasamento seguinte (F), o segundo pulso de 180° , aplicado em y' , inverte as componentes no plano $x'y'$ (G) onde ocorre a re-focalização para $\tau = 4\tau$ (H). Essa mudança de fase nos pulsos de re-focalização permite que todos os ecos tenham a mesma fase (MEIBOOM, S.; GILL, D, 1958).

Com as repetições desses pulsos de 180° a cada 2τ (n), gera-se um sinal de RMN cuja intensidade máxima de cada eco resulta de um decaimento exponencial cuja constante de tempo é T_2 (relaxação transversal) da amostra, independente da não homogeneidade do campo (MEIBOOM, S.; GILL, D, 1958).

Após n pulsos de 180° , espera-se um tempo (tempo de repetição ou T_r) igual ou maior que $5T_1$ para iniciar uma nova aquisição de dados.

Figura 8 - Esquema vetorial da sequência de pulsos CPMG.

Fonte: Adaptada de MEIBOOM, S.; GILL, D. **Modifies spin-echo method for measuring nuclear relaxation times**. The Review of Scientific Instruments, 1958. v.29, p.98.

2.5.2.1 Mecanismo de Relaxação Transversal (T_2) na difusão da água durante o processo de sinérese em queijos

De acordo com os trabalhos publicados por Tellier C et al. (1993), durante o processo de formação do coalho a relaxação T_2 pode ser descrita por um decaimento monoexponencial. No entanto, após a perturbação do gel (corte do coalho) inicia-se a sinérese, causando o encolhimento do gel e a liberação do soro, tornando a relaxação biexponencial, representada pela equação 5:

$$Y(t) = A_1 \exp\left(-\frac{t}{T_{21}}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{T_{22}}\right) + y_0 \quad (5)$$

Cada tempo de relaxação obtido por um tratamento biexponencial pode ser atribuído a uma fração de água, a fração de água expelida do gel, e a fração confinada no gel encolhido (Tellier C. et al., 1993) ou seja, é referente ao ambiente dos hidrogênios durante o processo de sinérese e permite detectar mudanças na distribuição de água em uma amostra.

Recentemente, Peters et al. (2016) utilizaram a RMN-DT para avaliar o comportamento da água em sistemas porosos, demonstrando que o relaxamento da água em um *pellet* de micropartículas de proteína de soro de leite pode ser descrito por dois tempos distintos. O T_2 , com menor constante de tempo (~ 10 ms), denominado T_{21} foi atribuído à água no interior das micropartículas e o T_2 com maior constante de tempo (~ 100 ms) denominado T_{22} foi atribuído à água entre as micropartículas. Ou seja, a água confinada gera um tempo de relaxação menor (T_2 curto) com relação a água dispersa entre as partículas (T_2 longo).

.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho visou a investigação da coagulação do leite , sob vários aspectos, utilizando a medição do tempo de relaxação transversal (T_2) obtido experimentalmente com a sequência CPMG, em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT). Com isso espera-se estabelecer referências para a padronização no processo industrial de laticínios visando a diminuição de perdas durante o processo, garantindo a qualidade do produto final.

3.2 Objetivos Específico

Neste trabalho os valores de relaxação T_2 obtidos a partir das análises dos decaimentos de CPMG adquiridos a partir da técnica RMN-DT foram empregados para:

- Verificar a influência do tempo de espera para o corte do coalho na qualidade do coalho formado;
- Analisar a variação na qualidade de formação da coalhada durante o tempo de dessoro, para determinação do melhor tempo para enformagem, visando minimizar perdas de rendimento na produção durante o processo;
- Avaliar a influência do campo magnético externo (0,23T) no processo de coagulação e sinérese do queijo tipo Minas frescal, apontando a utilizando da técnica para análises *in situ*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Todas as análises foram feitas utilizando amostras de leite pasteurizado e homogeneizado, obtido em mercado local, armazenados em garrafa plástica (1L).

Para as análises de coagulação em leite com diferentes teores de gordura, foram utilizados: Integral com 3,5% de teor de gordura, semidesnatado 1% de teor de gordura, e desnatado 0% de teor de gordura em m/v segundo as informações especificadas no rótulo.

Na avaliação do ponto de corte, sinérese, rendimento e influência do campo magnético, foi utilizado o leite integral (3,5% de gordura), para garantir o teor de gordura segundo a classificação do queijo Minas frescal (semi-gordo 25% a 44,9%).

Como agente coagulante utilizou-se o coalho em pó da marca Rica Nata, composto por Pepsina bovina (80 à 90%) e Renina (10 à 20% Quimosina).

Na fase da fermentação foi utilizado o Fermento lácteo em pó Rica Nata para produção de queijos como Minas Padrão, Queijo Prato e Coalhada, composto por cultura láctica mista mesofílica/termofílica homofermentativa, composta de multicepas naturais não geneticamente modificadas *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro SLK-SG-200, equipado com um ímã permanente de 0,23 T (frequência de 9 MHz para ^1H) e utilizando-se uma sonda de 13 mm x 30 mm de área útil, e os dados adquiridos com o software Condor IDE.

4.2 Preparação de amostras para avaliação da coagulação e sinérese em queijo Minas frescal.

O leite pasteurizado foi previamente aquecido até a temperatura de $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ para a adição do fermento em pó na concentração de 0,04 g/L. Após 30 minutos, acrescentou-se o cloreto de cálcio na concentração de 0,3 g/L e o agente coagulante em uma concentração de 0,2 g/L.

4.3 Avaliação da influência do ponto de corte do coalho

Para a avaliação da influência do ponto de corte do coalho na coagulação do leite, 5mL das amostras preparadas com cloreto de cálcio, fermento e coalho foram colocadas em tubo do tipo falcon de 5 ml e foram divididas em 4 grupos com tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos de coagulação e mantidas numa estufa a $37,0 \pm 0,5$ °C. Após o tempo de espera determinado para cada amostra, fez-se o corte do coalho, com um fio de metal em quatro partes simétricas, esperando 40 minutos para que ocorresse o dessoro fazendo a aquisição do sinal de CPMG para a aquisição do tempo de relaxação T_2 .

Para assegurar que durante os diferentes tempos de coagulação não houvesse variação nos valores de T_2 , foi mantida uma amostra controle, sem corte, durante as análises. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4 Avaliação do processo de sinérese em leite com diferentes teores de gordura.

Para avaliar processo de sinérese após o corte do coalho, 5mL das amostras preparadas foram divididas em tubos do tipo falcon de 5 ml para as medidas do tempo de relaxação (T_2) e mantidas a uma temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C.

As medidas foram realizadas em triplicata para cada tipo de leite: integral, semidesnatado e desnatado.

As medidas foram feitas após o corte (40 minutos de coagulação), no tempo zero, 20, 40 e 60 minutos de dessoro.

Fez-se o corte em 4 partes, com um fio de metal em quatro partes simétricas, mexendo em círculo uma vez para ocorrer o dessoro, repetindo o procedimento após cada medida. A mexedura do coalho foi feita de maneira cuidadosa em cada etapa, para que os coágulos não se rompessem e voltassem a se dissolver no soro.

4.6 Interferência do campo magnético na coagulação do leite

Para a avaliação da influência do campo magnético (0,23 Tesla) na coagulação enzimática, 10 amostras preparadas, conforme item 4.2, com 5mL foram armazenadas em tubos Falcon, e foram divididas em dois grupos:

- $B_0 = 0,23$ Tesla, as amostras preparadas permaneceram dentro do campo magnético durante toda a coagulação, a uma temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- $B_0 = 0$, as amostras preparadas com coagulante e fermento, permaneceram fora do campo magnético durante toda a coagulação, a temperatura de $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Determinou-se os tempos de relaxação T_2 das amostras, após 40 minutos de decesso, para avaliar a coagulação nos diferentes ambientes ($B_0 = 0$ e $B_0 = 0,23\text{T}$).

Todas as análises foram realizadas em quintuplicata de amostra.

4.6 Aquisição de dados por RMN-DT

4.6.1 Determinação do tempo de relaxação T_2 por meio do método de CPMG

Para avaliar a distribuição dos tempos de relaxação dos hidrogênios da água, em diferentes ambientes químicos, foi utilizada a sequência de pulso CPMG, com os seguintes parâmetros experimentais: $P_{90^\circ} = 5,96 \text{ us}$, $P_{180^\circ} = 11,72 \text{ us}$, tempo entre os pulsos $\tau = 1,5 \text{ ms}$, com 4000 ecos, tempo de repetição, $T_r = 1,5 \text{ s}$ e número de varredura $ns = 4$.

Para a obtenção dos valores de relaxação T_2 por meio do ajuste biexponencial utilizou-se o programa OriginLab, versão 9.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do tempo de relaxação T_2 do leite por meio do método de CPMG.

Na figura 9 estão apresentados os decaimentos dos sinais de RMN obtidos com a sequência de CPMG, de uma amostra de coalho preparada com coagulante e fermento antes do corte e da mesma amostra, após o corte do coalho, 40 minutos após o dessoro. Nesta figura pode-se verificar um aumento no tempo de relaxação transversal da amostra, após 40 minutos de dessoro, em comparação à amostra antes do corte do coalho.

A partir desses decaimentos, pode-se determinar os tempos de relaxação transversal (T_2). Através do ajuste bi-exponencial, como apresentado na figura 10, podemos obter dois valores de relaxação T_2 (T_2 longo e T_2 curto), apresentados na tabela 1.

Figura 9 - Sinais de RMN obtidos com sequência CPMG para amostras antes do corte do coalho e após 40 minutos de dessoro.

Figura 10 - Ajuste biexponencial do decaimento de CPMG feito com a amostra após 40 minutos de dessoro.

Tabela 1 - Valores de relaxação T_2 e contribuição dos sinais (I) para ajustes biexponencial em amostra após 40 minutos de dessoro.

$T_{2,1}$ longo (ms)	$T_{2,2}$ curto (ms)	$I_{2,1}$	$I_{2,2}$
1071	169	0,8	0,2

Observando os valores de $I_{2,1}$ e $I_{2,2}$, apresentados na tabela 1, que indica a contribuição de cada sinal, verificamos que a contribuição do T_2 longo é de 80%, enquanto que T_2 curto apresenta uma contribuição de 20%.

Para confirmar essas contribuições pode-se usar outra forma de processamento muito utilizada na análise de sinais CPMG, que é a transformação matemática denominada Transformada Inversa de Laplace (ILT). Esse processamento transforma o decaimento CPMG da figura anterior em espectros de T_2 , onde podemos visualizar os picos de cada contribuição.

A figura 11 mostra a ILT dos sinais acima, utilizando $\alpha = 1$ e 100 pontos no processamento, onde o resultado mostra que temos dois picos centrados em $T_{2,1} = 346$ ms (longo) e outro $T_{2,2} = 36$ ms (curto) com amplitudes de $I_{2,1} = 0,23$ e $I_{2,2} = 0,77$, ou seja, cerca de 75% da água está confinada nos coágulos, e 25% dispersas no soro.

Figura 11 - Processamento ILT dos sinais CPMG após 40 minutos dessorando

Figura 12 - Processamento ILT dos sinais CPMG antes do corte do coalho

Na figura 12, podemos observar que antes do corte do coalho, o comportamento é monoexponencial, pois há apenas um pico contribuindo para o sinal de CPMG, portanto, para obtenção dos tempos de relaxação T_2 após o dessoro das amostras, foi adotado o tratamento biexponencial.

5.2 Avaliação da influência do ponto de corte do coalho

O tempo de coagulação antes do corte do coalho é um dos fatores que influenciam na qualidade do produto final. Atualmente o ponto de corte do coalho é determinado sensorialmente, pelo queijeiro (DE PAULA, et al. 2009). O ponto ótimo de corte pode ser avaliado a partir de dois aspectos ao final do processo de sinérese: firmeza do coalho e sólidos dissolvidos no soro, relacionando os dois aspectos foi proposto um método para avaliar a qualidade do queijo.

Os métodos instrumentais de análise de textura avaliam propriedades de compressão, cisalhamento, corte e tensão aplicadas ao alimento. A Análise do Perfil de Textura (TPA) instrumental aplica forças deformantes, simulando a compressão e corte dos dentes durante a mastigação (LI et al., 1998). Quanto maior a resistência à deformação, menor será a maciez do queijo (FOX, 1998).

Na figura 12, estão representados os decaimentos de CPMG das amostras com diferentes tempos de coagulação antes do corte do coalho. Observamos um sensível aumento no tempo de relaxação T_2 com o aumento no tempo de espera para iniciar o corte do coalho.

Figura 12 - Decaimento de CPMG de amostras de queijo com diferentes tempos de coagulação, antes do corte do coalho (10,20,40 e 60 minutos).

Após o corte do coalho a relaxação indica que a água se encontra em dois ambientes diferentes, como observado na figura 11.

De acordo com trabalhos apresentados por Tellier C et al. (1993), esses ambientes são provenientes da água confinada nos coágulos e da água dispersa no soro, ou seja:

- T_2 curto, relativo aos hidrogênios da água confinada no coágulo
- T_2 longo, relativo aos hidrogênios da água no soro.

Partindo dessa informação, foi proposto um método para avaliar a firmeza do coalho por meio do tempo de relaxação relativo aos hidrogênios da água que formam os coágulos, o T_2 curto, pois, quanto menor o valor de T_2 curto ao final da sinérese, mais confinados estarão os hidrogênios da água, sugerindo maior firmeza dos coágulos.

A figura 13 mostra a variação de relaxação T_2 curto, após a sinérese, em função do tempo de coagulação antes do corte. Nesta figura observamos que quanto maior

o tempo de espera para iniciar o corte, menor a mobilidade da água e menor o valor de relaxação T_2 curto, sugerindo maior firmeza ao coágulo.

A quantidade de sólidos carregados no soro pode ser observada a partir dos valores de relaxação T_2 longo apresentados na figura 14. Quanto menor a quantidade de sólidos dissolvidos no soro, maior a mobilidade dos hidrogênios da água e maiores serão os valores de relaxação T_2 longo. Na figura 14 podemos observar um crescimento nos valores com o tempo de espera do corte.

A partir dessa perspectiva, podemos avaliar a qualidade da coalhada após a sinérese pela relação T_2 longo/ T_2 curto, ou seja, quanto maior o valor dessa relação mais firmeza apresentará o coalho e menor será a quantidade de sólidos dissolvidos no soro, como apresentado na figura 15. A partir de 40 minutos de espera para o corte, os dados obtidos nas, sugerem uma tendência a valores constantes, atingindo o ponto máximo de dessoro, como apresentados nas figuras: 13,14 e 15.

Figura 13 - Variação de T_2 curto após 40 minutos de sinérese em função do tempo de coagulação antes do corte.

Figura 14 - Variação de T_2 longo, após 40 minutos de sinérese, em função do tempo de coagulação antes do corte.

Figura 15 - Variação da relação T_2 longo/ T_2 curto após 40 minutos de sinérese, em função do tempo de coagulação antes do corte

Para garantir que não houve variação do tempo de relaxação T_2 , foram mantidas amostras controle que permaneceram intactas (sem corte) durante as análises. Após 40 minutos avaliou-se o tempo de relaxação T_2 das amostras controle, comprovando que antes do corte não houve variação significativa entre as amostras, como observado nas médias e desvio padrão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores do tempo de relaxação T_2 das amostras controle, sem corte, durante os 40 minutos de análise.

Tempo (min)	T_2 longo ($\pm$ DP)	T_2 curto ($\pm$ DP)	T_2 longo/ T_2 curto($\pm$ DP)
0	195,3 ($\pm$ 0,6)	98,7 ($\pm$ 2,5)	2,23 ($\pm$ 0,08)
40	194 ($\pm$ 1)	87 ($\pm$ 4)	1,98 ($\pm$ 0,06)

5.3 Avaliação do processo de sinérese em leites com diferentes teores de gordura.

O leite utilizado para fabricação de queijo Minas frescal, é normalmente padronizado para um teor de 3,2 a 3,5% de gordura, no entanto nos últimos anos, a crescente preocupação com a saúde aumentou a demanda por produtos com menores teores de gordura saturadas, incentivando as indústrias a optarem por produzir, também, queijo Minas Frescal com baixo teor de gordura (CUNHA, et al., 2002.).

Após a etapa do corte do coalho, ocorre a mistura da coalhada, para que o dessoro continue ocorrendo, em torno de 30 minutos, para posteriormente a massa ser enformada. A determinação do momento correto para enformagem também determina o rendimento final do produto, uma vez que uma retirada tardia resulta em uma massa com pouca umidade e o adiantamento pode fornecer um queijo com pouca firmeza e uma massa quebradiça (PAYNE, F. A., et al..1993).

Pensando em avaliar o potencial da técnica RMN-DT para determinação do melhor momento da enformagem em queijos com diferentes teores de gordura, fez-se um estudo da coagulação em coalhos produzidos com leite integral (3,5%), semidesnatado (1%) e desnatado (0%).

A partir dos resultados descritos no item 5.2 pôde-se avaliar o processo de sinérese a partir da evolução das relações entre T_2 longo/ T_2 curto, com relação ao tempo de deessoro, em leites com diferentes teores de gordura.

A figura 16 mostra as curvas de decaimentos de sinal de CPMG das amostras de leite com diferentes teores de gordura: Integral (3,5%), Semi- desnatado (1%) e Desnatado (0%).

Figura 16 – Curvas de decaimentos de sinal de CPMG em amostras de leite com diferentes teores de gordura: decaimentos de CPMG das amostras de leite com diferentes teores de gordura.

A partir da figura 16, observa-se que o leite apresenta o mesmo tempo de relaxação, a temperatura $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, independente do teor de gordura, pois, provavelmente a técnica não apresenta sensibilidade para diferenciar os ambientes nos quais os hidrogênios se encontram.

Ao final do processo de deessoro os ambientes tornam-se significativamente diferentes, como apresentado na figura 17 em que demonstra as curvas de decaimentos de sinal de CPMG das amostras aos 40 minutos de sinérese.

O tempo de 40 minutos de sinérese foi escolhido para diferenciar os processos de coagulação, pois é o tempo próximo de 30 minutos de duração do processo na indústria.

Figura 17 – Curvas de decaimentos de sinal de CPMG em amostras de leite ao final de 40 minutos de sinérese com diferentes teores de gordura.

Tabela 3 - Tempos de relaxação T_2 obtidos por ajuste biexponencial de amostras de leite ao final de 40 minutos de sinérese com diferentes teores de gordura

	Integral	Semidesnatado	Desnatado
T_2 Longo (ms)	1071	1321	1519
T_2 Curto (ms)	169	163	154
T_2 Longo/ T_2 Curto	6	8	10

A partir das diferenças nos decaimentos de CPMG, e nos valores de T_2 apresentados na tabela 3, pode-se observar que a maior diferença está na razão T_2 longo/ T_2 curto dos coalhos produzidos com leite desnatado.

VALLE, et al.,2004 avaliaram a influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella e concluíram que à medida que houve diminuição do teor de gordura, o produto tornou-se significativamente mais firme.

A partir dos dados obtidos pode-se sugerir que o teor de gordura interfere na coagulação do leite, influenciando tanto na formação dos coágulos e consequentemente nos valores de relaxação T_2 curto, quanto na quantidade de sólidos dissolvidos no soro do leite no final da coagulação referente ao T_2 longo.

Partindo dessa premissa e dos estudos feitos no item 5.2, utilizou-se a variação na relação entre T_2 longo/ T_2 curto em função do tempo de dessoro em leites com diferentes teores de gordura para avaliar o processo de sinérese.

Observa-se na figura 18, que mostra a variação na relação entre T_2 longo/ T_2 curto ao longo do processo de sinérese, que quanto menor o teor de gordura, ocorre um sensível aumento nos valores na relação T_2 longo/ T_2 curto.

Associando os dados obtidos com a conclusão de VALLE, et al.,2004, os resultados se convergem e estão de acordo com o previsto. Pois, quanto menor o teor de gordura, mais rígidos serão os coágulos causando uma diminuição nos valores de relaxação T_2 curto, presentes nos coágulos, e menor será a quantidade de sólidos solúveis no soro, aumentando os valores de T_2 longo.

Figura 18 - Variação da relação relaxação T_2 longo/ T_2 curto em função do tempo de sinérese em leites com diferentes teores de gordura.

Para avaliar se as diferenças entre as razões T_2 longo/ T_2 curto, em 40 minutos de deossoro, foram significativas, aplicou-se um teste-t não pareado entre as três amostras, utilizando valores de P uni-caudal. Os valores de corte encontrados na literatura são de 0,05. Ou seja, para valores de $p < 0,05$, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que existe uma diferença significativa entre os grupos

As diferenças foram significativas apenas entre as amostras produzidas com leite integral e leite desnatado apresentando $p = 0,005$ ($p < 0,05$).

Sendo assim, a técnica tem potencial para ser usada para determinar o melhor tempo de sinérese em amostras produzidas com diferentes teores de gordura, porém não apresentam sensibilidade para diferenças menores que 3% de gordura (leite integral e desnatado) segundo os resultados obtidos neste trabalho.

5.5 Influência do Campo magnético na coagulação

A partir dos resultados apresentados nos itens 5.2, 5.3 e 5.4 pode-se demonstrar que a técnica RMN-DT sugere potencial para avaliar a coagulação do leite e ponto ótimo de corte do coalho durante o processo industrial de queijo Minas Frescal.

Pensando em uma possível utilização da técnica para avaliação da coagulação em leite *in situ*, verificamos a influência do campo magnético no processo de coagulação e sinérese em queijo Minas frescal

Em trabalho recente publicado por, FRANCO, P. et al (2016), concluíram que a coagulação química em tratamento de esgoto pode ser melhorada empregando-se um campo magnético externo.

Outros pesquisadores avaliaram o efeito do campo magnético sobre a floculação em sistemas de tratamento água. Em trabalho publicado, Krzemieniewski et al., 2002; Lebkowska, 1991; Szczypiorkowski e Nowak (1995) sugerem que pode haver uma melhora na velocidade de floculação e decantação dos sólidos suspensos, e creem que a maioria dos efeitos pode ser atribuído a diminuição da tensão superficial da água e molhabilidade da fase sólida, devido ao maior ângulo de contato da fronteira sólido-líquido.

Uma vez que o processo de coagulação e sinérese é semelhante ao fenômeno de floculação em tratamento de água, no que diz respeito à dependência de ambos da tensão superficial da água, sugerindo que quanto menor a tensão superficial da água nos coágulos, mais fácil a passagem desta para o soro durante o processo de sinérese, decidiu-se estudar a influência do campo do equipamento (0,23T) no processo de coagulação e sinérese do leite.

A Tabela 4 mostra as médias, com os respectivos desvios padrões dos valores de relaxação T_2 longo, T_2 curto e a relação entre T_2 longo/ T_2 curto ao final de 40 minutos de coagulação das amostras que estavam presentes no campo magnético ($B_0 = 0,23$ T) e das amostras fora do campo ($B_0 = 0$).

Observa-se que as médias e o desvios do T_2 curto apresentam menor diferença entre as amostras que estavam na presença do campo magnético (B_0) às amostras fora dele ($B_0 = 0$) se comparados ao T_2 longo, que é maior para as amostras que ficaram submetidas ao campo magnético. Com isso, obtêm-se uma maior razão

T_2 longo/ T_2 curto, para as amostras que foram coaguladas na presença do campo magnético.

Tabela 4 – Variação de T_2 longo, T_2 curto e relação entre T_2 longo / T_2 curto em amostras coagulando na presença do campo magnético (B_0) do equipamento versus amostras fora do campo magnético ($B_0 = 0$)

	$B_0 = 0,23 \text{ T}$	$B_0 = 0$
T_2 longo	961 $\pm$ 45	699 $\pm$ 90
T_2 curto	153 $\pm$ 7	165 $\pm$ 2
T_2 longo/T_2 curto	6,3 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,5

Para avaliar se a hipótese de que a presença do campo magnético influencia no aumento da razão T_2 longo/ T_2 curto, e que há diferença significativa entre as médias, fez-se uso do procedimento estatístico teste-t não pareado, utilizando valores de P uni-caudal.

Na tabela 5, podemos observar os valores de P uni-caudal e das médias obtidas por meio do teste t não pareado das médias das quintuplicadas das amostras B_0 e $B_0=0$.

Tabela 5 - Valores das médias da relação T_2 longo/ T_2 curto e P uni-caudal obtidos por teste T não pareado para amostras submetidas a coagulação enzimática dentro do campo (B_0) e fora do campo magnético ($B_0 = 0$).

Média B/ $B_0=0$	6,3 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,5
P uni-caudal	0,00007	

Os valores de corte encontrados na literatura são de 0,05. Ou seja, para valores de $p < 0,05$, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que existe uma diferença significativa entre os grupos B e $B_0=0$.

Os valores encontrados foram $p=0,00007$ ou seja $p < 0,05$ concluindo que há uma diferença significativa entre as médias e que o campo magnético tem influência sobre a coagulação do leite.

Este resultado está de acordo com o sugerido inicialmente, pois a maior influência do campo magnético se dá nos valores de T_2 longo, referente aos

hidrogênios da água presentes no soro. Quando o campo magnético diminui a tensão superficial da água dentro do coágulo ele facilita a sua saída. Assim, a água do soro sai com menos solutos causando um aumento nos valores de relaxação T_2 longo e aumentando a razão T_2 longo/ T_2 curto.

A partir dos resultados pode-se concluir que a técnica de RMN-DT pode ser utilizada para a avaliação da coagulação do leite *in situ* sem prejuízo do processo de coagulação, podendo atuar como auxiliadora do processo de sinérese do queijo Minas frescal.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, da literatura científica consultada e dos objetivos propostos para o presente trabalho de mestrado, pode-se concluir que a técnica RMN-DT apresenta potencial para ser utilizada para avaliar a coagulação do leite e permitir uma padronização durante o processo de produção.

Com a sequência de pulso de CPMG, a RMN-DT pode ser utilizada para diferenciar a qualidade da coagulação em diferentes pontos de corte, assim como, determinar o melhor tempo de sinérese antes da enformagem do queijo por meio das relações entre os tempos de relaxação T_2 longo/ T_2 curto, evitando perdas durante o processo.

A técnica apresenta potencial para avaliar a coagulação e sinérese em queijos produzidos a partir de leites com diferentes tipos de gordura, porém não apresentou sensibilidade para diferenças menores que 3% entre os teores de gordura.

A utilização da RMN-DT para análises *in situ* se mostrou promissora, no que diz respeito à qualidade da coagulação e do processo de sinérese na presença do campo magnético do equipamento. Concluiu-se que o campo magnético não causa prejuízos ao processo de sinérese, podendo facilitar a transferência da água de dentro dos coágulos para o soluto pela diminuição da tensão superficial da água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DE INFORMAÇÃO EMBRAPA. **Agronegócio do leite**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em 13 de Agosto de 2019.

ALKHAZAN, M. M. K.; SADDIQ, A. A. N. The effect of magnetic field on the physical, chemical and microbiological properties of the lake water in Saudi Arabia. **Journal of Evolutionary Biology Research**, v. 2, n. 1, p. 7-14, 2010.

ALTAN, A., OZTOP, M. H., MCCARTHY, K. L., & 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, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos**. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 13 de agosto de 2019.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. **Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná**. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.v.47, 2009.

CALLAGHAN, P. T.; JOLLEY, K. W.; HUMPHREY, R. S. Diffusion of fat and water in cheese as studied by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance. **Journal of Colloid and interface Science**, v. 93, n. 2, p. 521-529, 1983.

CAROSIO, M. G., BERNARDES, D. F., ANDRADE, F. D., MORAES, T. B., TOSIN, G., & COLNAGO, L. A. Measuring thermal properties of oilseeds using time domain nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 173, p. 143-149, 2015.

CIÊNCIA DO LEITE. **Queijo Minas padronizado**, 2008. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/2818/queijo-Minas-padronizado>>. Acesso em: 18 de agosto de 2019.

CIÊNCIA DO LEITE. **O Rendimento na fabricação de queijos: Métodos para avaliação e comparação - Parte I**, 2008. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/2808/o-rendimento-na-fabricacao-de-queijos-metodos-para-avaliacao-e-comparacao--partei>> Acesso em: 18 de agosto de 2019.

CLARIDGE T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 1.ed; Pergamon: Oxford, UK, p. 10-20, 1999.

COHN, J., KAMILI, A., WAT, E., CHUNG, R. W., & TANDY, S. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. **Nutrients**, v. 2, n. 2, p. 116-127, 2010.

COSTA, M. R.; JIMENEZ-FLORES, RAFAEL; GIGANTE, MIRNA LUCIA. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 507-514, 2010.

CUNHA, Clarissa Reschke da et al. Efeito do fator de concentração do retentado o rendimento de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas**, v. 22, n. 1, p. 76-81, 2002.

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

DE PAULA, JUNIO CÉSAR JACINTO; DE CARVALHO, ANTÔNIO FERNANDES; FURTADO, MAURO MANSUR. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009

DE KRUIF, C. G., HUPPERTZ, T., URBAN, V. S., & PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, p. 36– 52, 2012.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 81, p. 597-608, 1998.

DUAN, R. D.; NILSSON, A. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 62-72, 2009.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário leite, 2018**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>> . Acesso em: 12 de agosto de 2019.

FARRELL JR., HM, MALIN, EL, BROWN, EM E QI, PX. Casein micelle estructure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, E., MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, J. A., MARTÍNEZ SUÁREZ, V., VILLARES, M., MANUEL, J., COLLADO YURRITA, L. R., & MORÁN REY, F. J. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 1, p. 92-101, 2015.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Infográfico da produção de leite e derivados mundial**, 2015. Disponível em : <<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/273893/>>. Acesso em: 29 de maio de 2019

FORATO, Lucimara Aparecida; VIEIRA, CE de M.; COLNAGO, Luiz Alberto. Imagem por ressonância magnética. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

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

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. **Aspen Publishers, Inc.** Gaithersburg, Maryland. 2000. 544 p.

FURTADO, M. M.; MAGALHÃES, J.P; NETO, L. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1a.ed, São Paulo: Pipemar, 1994.

FURTADO, M. M. **Arte e ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991.

GOFF, H. D. University of Guelph. **Dairy Science and Technology**. [online], 2009. Disponível em: <<https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/dairy-science-and-technology-ebook>>. Acesso em: 17 de Agosto de 2019.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.

HANSEN, C. L., RINNAN, Å., ENGELSEN, S. B., JANHØJ, T., MICKLANDER, E., ANDERSEN, U., & VAN DEN BERG, F. Effect of gel firmness at cutting time, pH, and temperature on rennet coagulation and syneresis: an *in situ* ¹H NMR relaxation study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 1, p. 513-519, 2009.

HARTMANN, P., SZABÓ, A., ERŐS, G., GURABI, D., HORVÁTH, G., NÉMETH, I., ... & BOROS, M. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. **European journal of pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 58-64, 2009.

HOHENDORFF, C. G.; SANTOS, DANIEL. Produção de queijos. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2006.

JUNIOR, M. R. F., ROCHA, N. R. A. F., & MOURA, A. A. O. Efeito do campo magnético no processo de coagulação para tratamento de água contaminada com LAS. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 2, n. 2, p. 116-124, 2016.

KRZEMIENIEWSKI, M.; DOBRZYNSKA, A.; JANCZUKOWICZ, W.; PESTA, J.; ZIELINSKI, M. Effect of constant magnetic field on the process of generating hydroxyl radicals in Fenton's reaction, **Chemist**, v. 1, p. 12, 2002.

LEBKOWSKA, M. Effect of Constant Magnetic Field on the Biodegradability of Organic Compounds, **Publishing House of War saw University of Technology**, Warsaw, v. 51, 1991.

LI, R.; CARPENTER, J. A.; CHENEY, R. Sensory and instrumental properties of smoked sausage made with Mechanically Separated Poultry (MSP) meat and wheat protein. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, 1998.

LOGUERCIO, A.P., ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p.1537-43, 2003.

MARSHA, R. J. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. **J. Dairy Res.**, v.49, p.349-336,1982.

MARKUS, C. R.; OLIVER, B.; DE HAAN, E. H. F. Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 1051-6, 2002.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modifies spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **The Review of Scientific Instruments**, v.29, p.93, 1958.

MISTRY, Vikram V. **Low fat cheese technology. International dairy journal**, v. 11, n. 4-7, p. 413-422, 2001.

NAGAI, K. Bovine milk phospholipid fraction protects Neuro2a cells from endoplasmic reticulum stress via PKC activation and autophagy. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 466-471, 2012.

NORDON, ALISON; MCGILL, COLIN A.; LITTLEJOHN, DAVID. Process NMR spectrometry. **Analyst**, v. 126, n. 2, p. 260-272, 2001.

ORDONES, J. A. et al. Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. Porto Alegre: **Artmed**, v. 2, p. 41, 2005.

ÖZILGEN, MUSTAFA; KAUTEN, ROBERT J. NMR analysis and modelling of shrinkage and whey expulsion in rennet curd. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 373-379, 1994.

PAYNE, F. A.; HICKS, C. L.; MADANGOPAL, S.; SHEARER, S. A. Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. **Transactions of the ASAE**, v. 36, n. 3, p. 841-847, 1993.

PINHEIRO, M. V. S.; PENNA A. L. B. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 175-186, 2004.

PIRES, MARIA COELI SIMÕES. **Memória e Arte do Queijo do Serro: o saber sobre a mesa**. Editora UFMG, 2013.

PEREIRA, F. M. V.; COLNAGO, L. A. Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Chemometrics for Determination of Fat Content in Commercial Products of Milk Powder. **Journal of AOAC International**, p. 330-334, 2017.

PETERS, J. P., VERGELDT, F. J., VAN AS, H., LUYTEN, H., BOOM, R. M., & VAN DER GOOT, A. J. Time domain nuclear magnetic resonance as a method to determine and characterize the water-binding capacity of whey protein microparticles. **Food Hydrocoll**, v. 54, p. 170–8, 2016.

RODRÍGUEZ, J. Recent advances in the development of low-fat cheeses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 249-254, 1998.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-Minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SANTOS, P. M., PEREIRA-FILHO, E. R., COLNAGO, L. A. Detection and quantification of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). **Microchemical Journal**, v. 124, p. 15-19, 2016.

SANTOS, P. M., KOCK, F. V. C., SANTOS, M. S., LOBO, C. M. S., CARVALHO, A. S., & COLNAGO, L. A. Non-Invasive Detection of Adulterated Olive Oil in Full Bottles Using Time-Domain NMR Relaxometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 385-390, 2017.

SCHMELZ, E. M. Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 9, p. 2632-2639, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHANNON, L. K.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K.; LÖNNERDAL, B. Glycomacropeptide and alfa- lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1261-8, 2003.

SILVA, Fernando Teixeira. **Queijo Minas frescal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005., 2005.

SILVA, C.B.S. Processamento de Sinais de Ressonância Magnética Nuclear Usando Classificador Neural para Reconhecimento de Carne Bovina. 2007. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica**, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SILVEIRA, Patricia Rodrigues da; ABREU, Luiz Ronaldo de. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciência e agrotecnologia**, p. 1340-1347, 2003.

STRASAK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria Escherichia coli. **Bioelectro-Chemistry**, v.55, p.161-164. 2002.

SZCZYPIORKOWSKI, A.; NOWAK, W. Studies on application of a magnetic field to the intensification of waste water treatment processes, **G.W.T.S.** v.2, p.31–36, 1995.

TELLIER, C., MARIETTE, F., GUILLEMENT, J. P., & MARCHAL, P. Evolution of water proton nuclear magnetic relaxation during milk coagulation and syneresis: structural implications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2259-2266, 1993.

VALLE, J. L. E. D., CAMPOS, S. D. D. S., YOTSUNAGI, K., & SOUZA, G. D. **Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella**. Food Science and Technology, v. 24, n. 4, p. 669-673, 2004.

VELOSO, ANA CRISTINA ARAÚJO ET AL. **Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE**. 2001..

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELEMA, A. VAN BOEKEL, M. A. J. S.; Dairy technology: principles of milk properties and processes. **Food science and technology**. Marcel Dekker, Inc. New York – Basel. 727p. 1999.

WALSTRA, P., VAN DIJK, H. J. M.; Geurts, T. J., The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review. **Neth. Milk Dairy J.**, v.39, p.209-46, 1985.