

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Cristine Maso Jeusti Bof

**Conservação de queijo ralado através da aplicação de ozônio durante
a etapa de desidratação**

Passo Fundo

2019

Cristine Maso Jeusti Bof
Engenheira de Alimentos

**Conservação de queijo ralado através da aplicação de ozônio durante
a etapa de desidratação**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Christian Oliveira Reinehr
Coorientador: Marcelo Hemkemeier
Linha de pesquisa: desenvolvimento de
produtos e processos para a indústria de
alimentos.

Passo Fundo
2019

CIP – Catalogação na Publicação

- B673c Bof, Cristine Maso Jeusti
Conservação de queijo ralado através da aplicação de ozônio durante a etapa de desidratação / Cristine Maso Jeusti Bof. – 2019.
111 f. : il. color. ; 30 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr.
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2019.
1. Queijo - Indústria. 2. Ozônio. 3. Leveduras. 4. Queijo ralado. 5. Queijo - Desidratação. I. Reinehr, Christian Oliveira, orientador. II. Hemkemeier, Marcelo, coorientador. III. Título.

CDU: 637.3

Catálogo: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRE 10/1569

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Conservação de queijo ralado através da aplicação de ozônio durante a etapa de desidratação

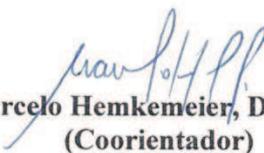
Elaborada por
Cristine Maso Jeusti Bof

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



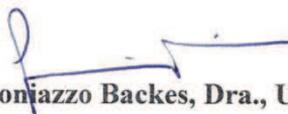
**Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



**Marcelo Hemkemeier, Dr., UPF
(Coorientador)**



Luciane Maria Colla, Dra., UPF



Geciane Tomazzo Backes, Dra., URI

**Passo Fundo, RS, Brasil
2019**

Ao meu marido Ricardo, minha filha Clara, aos meus pais Adriana e Ailton e minha irmã Camila, por todo apoio, incentivo, compreensão e paciência. A minha família e amigos, que de uma forma ou outra, fizeram parte desta etapa da minha vida.

A toda equipe Rasip por todo incentivo e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar e permitir concluir mais uma etapa na minha vida.

Agradeço a minha família, base fundamental, pela força, confiança, apoio e incentivo em mim depositados para a conclusão de mais uma etapa e por estarem presentes em todos os momentos.

Agradeço ao Gerente da Rasip Unidade Láctea Jiovani Foiatto e ao Coordenador Ronaldo Grosselli que me incentivaram e me deram todo o apoio para que eu conseguisse realizar o mestrado mesmo me ausentando da empresa uma vez por semana.

Agradeço a empresa Rasip por me apoiar e permitir a realização deste trabalho em suas dependências, fornecendo os equipamentos e matérias primas.

Agradeço a meu co-orientador prof. Dr. Marcelo Hemkemeier por ter me apresentado ao mestrado, por ter me sugerido os melhores caminhos a serem seguidos e pela oportunidade.

Agradeço a meu orientador prof. Dr. Christian Oliveira pela oportunidade, pela paciência, disponibilidade, pela orientação científica, incentivo e por mostrar sempre o melhor caminho durante esses anos.

Agradeço as laboratoristas e auxiliares Paola Borges, Evelyn Kaufmann, Amarildes Burin, Giovana Inês da Luz Moreira e Amanda Cevei pelo apoio e ajuda nas análises, que não mediram esforços na realização dos experimentos, pela ajuda e disponibilidade.

Agradeço aos colaboradores da produção de queijos ralados que estiveram sempre ao meu lado me ajudando durante a realização dos experimentos e nunca me deixaram desanimar, sempre acreditaram que daria certo.

Agradeço aos meus colegas/amigos da turma do mestrado por dividir momentos de alegrias e de dificuldades, pela união e apoio.

Agradeço a Universidade de Passo Fundo, em especial, o Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, o curso de Engenharia de alimentos, professores, alunos e funcionários, pela amizade, apoio e por todo o suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que convivi durante esses anos e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Todos estão guardados na minha memória e no meu coração, sou eternamente grata a vocês.

Muito obrigada!

***“A persistência é o menor
caminho para o êxito”.***

Charles Chaplin

RESUMO

Grande parte dos queijos ralados encontrados no mercado apresentam-se secos, salgados, ácidos, com pouco sabor e baixo teor de gordura. Estes fatores que prejudicam a qualidade sensorial do produto por outro lado ajudam a inibir o desenvolvimento de bolores e leveduras ao longo da vida de prateleira. Outro fator que inibe o crescimento de bolores e leveduras é o conservador ácido sórbico, porém, de acordo com a contagem de bolores e leveduras presentes no queijo ralado e atividade de água do produto o conservante pode não ser suficientemente eficaz para manter os padrões de qualidade ao longo da vida de prateleira. A ação do ozônio sobre bolores e leveduras é bastante efetiva, pois eles são facilmente atingidos em um menor período de tempo do que as bactérias, portanto a utilização do Ozônio no processamento de alimentos pode ser uma alternativa para as indústrias. Objetivou-se desenvolver um processo utilizando ozônio para a conservação de queijo Tipo Grana ralado e queijo Parmesão ralado buscando a redução da adição do conservador químico no produto. Este trabalho foi realizado em escala industrial e foi dividido em três etapas, sendo que na primeira etapa foi avaliada a concentração de ácido sórbico para a conservação dos queijos ralados, na segunda etapa foi avaliada a ação do ozônio sobre a conservação dos queijos ralados e na terceira e última etapa foi realizada a conservação dos queijos ralados com uso do ozônio e do ácido sórbico e ainda foram realizados testes sensoriais afetivos e descritivos. Na primeira etapa o conservador ácido sórbico foi adicionado nas concentrações 0, 0.05, 0.1, 0.15 e 0.20 %, porém a estabilidade microbiológica dos queijos ralados foi alcançada a uma umidade final média de 19 % somente com a adição do conservador ácido sórbico em concentração acima do limite permitido pela legislação. O ozônio foi aplicado nos queijos ralados durante 10 minutos do aquecimento nas concentrações 0, 9, 23, 31, 38 mg de ozônio / kg de queijo ralado desidratado e durante os 3 minutos do resfriamento nas concentrações 0, 3, 7, 9 e 11 mg de ozônio / kg de queijo ralado desidratado ambos no processo de desidratação. Foi determinado que a concentração de 9 mg de ozônio / kg de queijo ralado desidratado apresentou os melhores resultados com uma redução de bolores e leveduras de 98 % e em um menor tempo. O queijo ralado foi produzido com a combinação do conservador ácido sórbico e ozônio para avaliação da possibilidade de produzir queijos ralados a uma umidade de 19 % com estabilidade microbiológica ao longo da vida de prateleira. Para avaliação dos efeitos do ozônio sobre os experimentos, os produtos foram submetidos a análise de composição de ácidos graxos, rancidez oxidativa e também a análise sensorial com testes afetivos e descritivos. Quando analisada a composição de ácidos graxos e análise sensorial, foram encontradas diferenças significativas entre as amostras padrão e as amostras tratadas com ozônio, embora estas diferenças tenham sido pequenas. Constatou-se que a ação do ozônio sobre os queijos ralados causou danos mínimos ao produto, tanto químicos quanto sensoriais.

Palavras-chave: ozônio, queijo ralado, bolores e leveduras, CATA.

ABSTRACT

Most of the grated cheeses found on the market are dry, salty, acidic, with little taste and low in fat. These factors that impair the sensory quality of the product on the other hand help to inhibit the development of molds and yeasts over the shelf life. Another factor that inhibits the growth of molds and yeasts is the conservative sorbic acid, however, according to the count of molds and yeasts present in grated cheese and product water activity the preservative may not be effective enough to maintain the quality standards shelf life. The action of ozone on molds and yeasts is quite effective as they are easily achieved in a shorter period of time than bacteria, so using ozone in food processing may be an alternative for industries. The objective of this work was to develop a process using ozone for the conservation of grated Grana-type cheese and grated Parmesan cheese, seeking to reduce the addition of the chemical preservative in the product. This work was carried out on an industrial scale and was divided into three stages. In the first stage, the sorbic acid concentration was evaluated for the conservation of the grated cheeses. In the second stage the ozone action on the conservation of the grated cheeses was evaluated. third and last stage the conservation of grated cheeses with the use of ozone and sorbic acid was carried out and affective and descriptive sensorial tests were also carried out. In the first stage the conservative sorbic acid was added in the concentrations 0, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.20%, but the microbiological stability of the grated cheeses was reached at a mean final moisture of 19% only with the addition of the conservative sorbic acid in concentration above of the limit allowed by the legislation. Ozone was applied to the grated cheeses during 10 minutes of heating at the concentrations 0, 9, 23, 31, 38 mg ozone / kg dehydrated grated cheese and during the 3 minutes of cooling at concentrations 0, 3, 7, 9 and 11 mg of ozone / kg of grated cheese dehydrated both in the process of dehydration. It was determined that the concentration of 9 mg ozone / kg dehydrated grated cheese showed the best results with a reduction of molds and yeasts of 98% and in a shorter time. Grated cheese was produced with the combination of the preservative sorbic acid and ozone to evaluate the possibility of producing grated cheeses at 19% moisture with microbiological stability over the shelf life. To evaluate the effects of ozone on the experiments, the products were submitted to analysis of fatty acid composition, oxidative rancidity and also the sensorial analysis with affective and descriptive tests. When analyzing the composition of fatty acids and sensorial analysis, significant differences were found between the standard samples and the samples treated with ozone, although these differences were small. It was found that the action of ozone on grated cheeses caused minimal damages to the product, both chemical and sensorial.

Key words: ozone, grated cheese, molds and yeasts, CATA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido sórbico	33
Figura 2 - Fluxograma de produção de queijos ralados.....	35
Figura 3 - Estrutura molecular do O ₃	42
Figura 4 - Estruturas de ressonância da molécula de O ₃	44
Figura 5 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no projeto	58
Figura 6 - Esquema de sistema de geração de O ₃ por descarga por efeito corona	60
Figura 7 - Equipamento utilizado para a geração de O ₃	60
Figura 8 - Interior do equipamento gerador de O ₃	61
Figura 9 - Sistema de injeção de O ₃ no secador de queijo ralado.....	61
Figura 10 - Avaliação da estabilidade microbiológica do queijo Tipo Grana ralado ...	74
Figura 11 - Avaliação da estabilidade microbiológica do queijo Parmesão ralado.....	75
Figura 12 - Avaliação microbiológica de queijo Parmesão ralado antes e após tratamento com O ₃ na etapa da desidratação (10 minutos durante o aquecimento)	77
Figura 13 - Avaliação microbiológica de queijo Parmesão ralado antes e após tratamento com O ₃ na etapa de resfriamento (3 minutos finais durante resfriamento)	78
Figura 14 - Avaliação microbiológica de queijo Tipo Grana ralado antes e após tratamento com O ₃ na etapa da desidratação (10 minutos durante aquecimento).....	78
Figura 15 - Avaliação microbiológica de queijo Tipo Grana ralado antes e após tratamento com O ₃ na etapa de resfriamento (3 minutos finais durante resfriamento)	79
Figura 16 - Análise de bolores e leveduras queijo Tipo Grana Ralado	85
Figura 17 - Análise de bolores e leveduras queijo Parmesão ralado	85
Figura 18 - Índice de aceitabilidade (%).....	89
Figura 19 - Projeção dos atributos sensoriais para as amostras de queijo ralado a partir da análise CATA.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas do O ₃	42
Tabela 2 - Agentes oxidantes e seus potenciais de oxidação.....	43
Tabela 3 - Resumo dos diferentes métodos de geração de O ₃ , princípios de trabalho e campos de aplicação.	44
Tabela 4 - Quantidade de O ₃ aplicado nos queijos durante a o processo de desidratação	62
Tabela 5 - Formulações para produção de queijo Tipo Grana ralado.....	63
Tabela 6 - Formulações para produção de queijo Parmesão ralado	63
Tabela 7 - Formulação para produção de queijo Tipo Grana ralado	63
Tabela 8 - Formulação para produção de queijo Parmesão ralado	64
Tabela 9 - Resultados físico-químicos das matérias-primas.....	71
Tabela 10 - Composição e quantificação de ácidos graxos presentes no queijo Tipo Grana e Queijo Parmesão	71
Tabela 11 - Análise da concentração de ácido sórbico residual em queijos ralados	73
Tabela 12 - Análises físico-químicas dos queijos ralados	74
Tabela 13 - Análises físico-químicas para queijo Parmesão ralado e queijo Tipo Grana ralado	76
Tabela 14 - Análise de Rancidez Oxidativa em queijos ralados após o tratamento com O ₃	77
Tabela 15 - Análises físico-químicas queijos ralados.....	82
Tabela 16 - Análise de bolores e leveduras queijo Tipo Grana ralado	83
Tabela 17 - Análise de bolores e leveduras queijo Parmesão ralado.....	83
Tabela 18 - Análise físico-química queijos ralados.....	84
Tabela 19 - Análise de ácidos graxos saturados (%)	86
Tabela 20 - Análise de ácidos graxos insaturados (%)	87
Tabela 21 - Médias dos atributos utilizados para avaliar a aceitabilidade do consumidor para os queijos ralados.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios microbiológicos para a produção de queijo ralado.....	31
Quadro 2 - Aditivos autorizados para produção de queijo ralado	32
Quadro 3 - História do O ₃ : aplicação e regulamentação em alimentos	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CATA – (Check all that apply) – checar tudo o que se aplica

CISPOA – Coordenadoria de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

DIPOA – Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal

EPA – (*Environmental Protection Agency*) – Agência de Proteção Ambiental

FDA – (Food and Drug Administration) – Administração de Alimentos e Drogas

GES – gordura no extrato seco

GRAS – (*Generally Recognized As Safe*) - Geralmente Reconhecido como Seguro

IDA – ingestão diária recomendada

JECFA – (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) – Comitê conjunto de peritos em aditivos alimentares

O₃ – Ozônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 QUEIJO RALADO.....	29
2.1.1 Padrões da qualidade para a produção de queijos ralados.....	30
2.1.2 Aditivos e coadjuvantes de tecnologia em queijo ralado	31
2.1.3 Processo de produção de queijo ralado	34
2.1.4 Qualidade higiênico-sanitária e fraudes em queijo ralado	36
2.2 OZÔNIO.....	38
2.2.1 Legislação para uso de O ₃	40
2.2.2 Propriedades químicas e físico-químicas do O ₃	41
2.2.3 Geração de O ₃	43
2.2.4 Mecanismo de ação do O ₃ sobre microrganismos.....	45
2.3 O₃ EM ALIMENTOS.....	46
2.3.1 Aplicação de O ₃ em produtos lácteos.....	47
2.3.2 Outras aplicações de O ₃	50
2.3.3 Principais alterações nos alimentos devido ao tratamento com O ₃	52
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS.....	57
3.1.1 Caracterização das matérias-primas	57
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	57
3.2.1 Etapa 1: Avaliação do efeito do ácido sórbico sobre a conservação do queijo ralado	59
3.2.2 Etapa 2: Avaliação do efeito do ozônio sobre a conservação do queijo ralado. .	59
3.2.3 Etapa 3: Conservação do queijo ralado com uso de O ₃ e ácido sórbico	63
3.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	64
3.3.1 Análise de bolores e leveduras	64
3.3.2 Análise do teor residual de ácido sórbico.....	65
3.3.3 Análise de gordura	65
3.3.4 Análise de umidade	66
3.3.5 Análise de atividade de água.....	66
3.3.6 Análise de rancidez oxidativa	66

3.3.7 Análise de ácidos graxos	67
3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS QUEIJOS RALADOS PRODUZIDOS COM A NOVA TECNOLOGIA.....	68
3.4.1 Tratamento dos dados	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	71
4.2 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO SÓRBICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO.....	73
4.3 ETAPA 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OZÔNIO SOBRE A CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO.....	76
4.4 ETAPA 3: CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO COM O USO DE O ₃ E ÁCIDO SÓRBICO	81
4.4.1 Análises físico-químicas	81
4.4.2 Análise de estabilidade microbiológica	82
4.4.3 Análises físico-químicas	84
4.4.4 Análise de estabilidade microbiológica	85
4.4.5 Análises de composição de ácidos graxos	86
4.4.6 Análise sensorial.....	88
5 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	107
APÊNDICE B – Ficha de cadastro para realização da análise sensorial.....	109
APÊNDICE C – Ficha de aceitabilidade e CATA para análise sensorial....	111
APÊNDICE D – Artigo Científico	113

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento muito antigo, e não há qualquer evidência conclusiva indicando onde a produção de queijo teve origem. Dentre os diversos formatos que os queijos podem ser apresentados, um deles é ralado. O queijo ralado é um produto com muitas superfícies de contato sendo assim um produto vulnerável a contaminação por microrganismos deteriorantes, especialmente bolores e leveduras.

O crescimento de bolores e leveduras em queijo ralado é um problema, pois além de serem contaminantes microbiológicos, alguns tipos de bolores produzem toxinas as quais são nocivas para a saúde, sendo assim um risco para o consumidor. Eles representam prejuízos para a indústria alimentícia, acarretando em devoluções e descarte de produtos, reclamações, penalizações, insatisfação dos clientes em relação ao produto e marca.

Grande parte dos queijos ralados encontrados no mercado apresentam-se secos, salgados, ácidos e com baixo teor de gordura. Estes fatores que prejudicam a qualidade sensorial do produto por outro lado inibem o desenvolvimento de bolores e leveduras ao longo da vida de prateleira. Outro fator que inibe o crescimento de bolores e leveduras é o conservador químico ácido sórbico o qual pode ser utilizado em concentração máxima de 0,1 % (BRASIL, 1997).

O ozônio é um gás que vem sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia, a fim de sanitizar equipamentos e utensílios e ainda diretamente sobre alimentos. O tratamento utilizando ozônio está entre as tecnologias emergentes de grande potencial para a indústria alimentar. Após a sua declaração como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) as promessas do tratamento de alimentos com ozônio tornaram-se ainda mais visíveis nos últimos anos. (FDA, 2001). A utilização do tratamento com ozônio em alimentos é em grande parte atribuída às propriedades físico-químicas da molécula de ozônio, tais como seu poder oxidativo.

Deve ainda ser ressaltado, que para queijos ralados poucos estudos sobre novas tecnologias de conservação foram publicados em periódicos científicos. São encontrados apenas estudos que verificaram produtos fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente e, também, impróprios para o consumo devido a contaminações de origem microbiana ou química (SALVADOR, 2001; MESQUITA, 2001; PIMENTEL, 2002; MALODONADO, 2006 e MOSQUIM, 1998).

De acordo com O'Donnell et al. (2012) os consumidores não estão somente preocupados com os ingredientes que contém os alimentos que eles consomem, mas também sobre os

processos que são empregados para produção. Várias pesquisas apontam que os consumidores estão cada vez mais conscientes sobre a cadeia de fornecimento de alimentos, que continuará a influenciar suas percepções de processos alimentares emergentes. Os consumidores estão buscando por alimentos que atendam seus desejos nutricionais e de sabor e que ainda requerem mínima preparação. Entender e abordar questões de consumo relacionadas a qualquer novo processo alimentar são alguns dos desafios mais importantes para os desenvolvedores de produtos alimentares inovadores.

A fim de atender a demanda por alimentos saudáveis e a necessidade da indústria em explorar as diferentes tecnologias para a produção e conservação deste tipo de alimento são necessários maiores estudos, tais como o emprego do ozônio para conservação e melhoria da vida de prateleira do queijo ralado e consequente redução do conservador químico.

Neste contexto, o presente projeto enquadra-se na linha de pesquisa de processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes, desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos. O presente estudo visou melhorar a qualidade microbiológica e sensorial de queijo ralado. Este projeto é de grande interesse para as indústrias produtoras de queijo ralado por ser uma grande inovação tecnológica para este tipo de produto.

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver um processo utilizando a aplicação do ozônio para a conservação de queijo ralado em escala industrial, sendo os objetivos específicos: a) avaliar a conservação de queijos ralados frente a adição do conservador químico ácido sórbico; b) determinar a concentração de ozônio para aplicação em queijo ralado durante o processo de desidratação para redução de bolores e leveduras; c) avaliar a conservação dos queijos ralados e danos químicos frente a aplicação de ozônio e adição do conservador químico ácido sórbico; d) avaliar o efeito da aplicação de ozônio sobre as características sensoriais do produto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO RALADO

No Brasil a Portaria N° 357, de 4 de setembro de 1997 regulamenta o padrão de identidade e qualidade de queijo ralado. O queijo ralado pode ser definido como um produto obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos de baixa umidade aptos para o consumo humano. O produto classifica-se como desidratado ou não e/ou pela variedade de queijo utilizado, podendo ser elaborado com uma única variedade de queijo de baixa umidade ou com queijo de média umidade, deve apresentar aspecto e textura de grânulos ou filetes mais ou menos finos, cor branco amarelado a amarelo e odor característico de acordo com a variedade de queijos das quais provenha (BRASIL, 1997).

Dentre os tipos de queijos existentes, tem-se o queijo Parmesão e o queijo Tipo Grana Padano que são classificados como queijos maturados. Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo. Os queijos podem ser classificados de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco e também de acordo com o conteúdo de umidade (BRASIL, 1996).

A deterioração dos alimentos de origem animal deve-se a uma vasta gama de reações, destacando-se as de origem microbiológica. O processo industrial de maturação promove alterações sensoriais a partir de reações bioquímicas e bacteriológicas como proteólise, lipólise e fermentação, resultando em melhorias do sabor, palatabilidade e conservação do produto. Embora não substitua a aplicação das boas práticas de fabricação (BPF), a maturação é frequentemente uma forma de prevenir a ascensão de microrganismos patogênicos e deterioradores sem a utilização abusiva de conservantes químicos (SCHULZ et al., 2009). Infelizmente, somente um processo de fabricação natural como a maturação, não é eficaz na conservação e longevidade dos produtos comerciais industrializados.

De acordo com Hoffmann et al. (2005) o queijo é um produto alimentício que, pelo seu alto valor nutritivo, ocupa lugar de destaque entre os alimentos chamados de complexos, apresenta consumo elevado e vários empregos na culinária mundial, sendo muito comum na dieta populacional, abrangendo, na totalidade todas as classes sociais.

2.1.1 Padrões da qualidade para a produção de queijos ralados

De acordo com o Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado, os queijos utilizados na elaboração deverão ser previamente tratados (retirada da embalagem, higienização com água e toaletagem) para adequá-los higienicamente ao processo de ralagem e é proibida a utilização de queijos não aptos para o consumo humano. Só se admitirão os queijos adequados para a venda ao público tais como aqueles que apresentem falhas morfológicas ou de apresentação comercial, desde que não afetem a qualidade do produto final (BRASIL, 1997).

A qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores em todo o país pode estar comprometida, visto que, a legislação estabelece poucos requisitos para a caracterização dos produtos nos regulamentos técnicos de identidade e qualidade que são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A multiplicação de fungos é um agravante no produto queijo ralado, pois, além de serem deteriorantes e indicadores de más condições higiênicas, podem reduzir a acidez do alimento favorecendo o desenvolvimento de bactérias patogênicas (SOFOS; BUSTA, 1993; SALAVESSA, 2009).

Os fungos são microrganismos filamentosos conhecidos por seu potencial em alterar o sabor e qualidade de alimentos (MAZIERO, BERSOT, 2010). A ação deteriorante de leveduras pode gerar deformação de embalagens pela produção de elevada quantidade de gás, formação de películas, ligeiro odor de fermentação e perda do sabor (LOUREIRO; QUEROL, 1999).

Sabe-se que alguns fatores podem influenciar a composição final do queijo, como as características da matéria-prima, teor de proteína e gordura, bem como os demais ingredientes utilizados e a tecnologia de fabricação empregada. Ou seja, queijos procedentes de diferentes indústrias ou até mesmo de diferentes lotes de uma mesma indústria podem apresentar diferenças físicas e químicas significativas (SALAVESSA, 2009).

Em se tratando de critérios macroscópicos e microscópicos o queijo ralado não deverá conter substâncias estranhas macro e/ou microscópicas de qualquer natureza. Para os critérios microbiológicos tem-se os critérios de aceitação estabelecidos conforme a classificação do queijo, conforme Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios microbiológicos para a produção de queijo ralado

Variedade de baixa umidade	
Microrganismo	Critério de aceitação
Coliformes/g (30°C)	n = 5, c = 2, m = 200, M = 1000
Coliformes/g (45°C)	n = 5, c = 2, m = 100, M = 500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva / g	n = 5, c = 2, m = 100, M = 1000
Bolores e Leveduras / g	n = 5, c = 2, m = 500, M = 5000
Salmonella spp / 25 g	n = 5, c = 0, m = 0
Variedade de média umidade	
Coliformes/g (30°C)	n = 5, c = 2, m = 1000, M = 5000
Coliformes/g (45°C)	n = 5, c = 2, m = 100, M = 500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva / g	n = 5, c = 2, m = 100, M = 1000
Bolores e Leveduras / g	n = 5, c = 2, m = 500, M = 5000
<i>Salmonella</i> spp / 25 g	n = 5, c = 0, m = 0
<i>Listeria monocytogenes</i> / 25g	n = 5, c = 0, m = 0

n = número de unidades retiradas de um lote que serão analisadas independentemente (unidades amostrais); **c** = número máximo aceitável de unidades do lote em que as contagens microbianas estão acima do limite mínimo (**m**) e abaixo do limite máximo tolerado (**M**) para o microrganismo investigado.

Fonte: BRASIL (1997)

2.1.2 Aditivos e coadjuvantes de tecnologia em queijo ralado

Na produção de queijos ralados é admitida a presença dos aditivos autorizados no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Portaria nº 146 de 1996) para os queijos utilizados como matéria-prima, sua concentração no produto deverá corresponder aos limites máximos autorizados na RDC 357/1997 (Regulamento para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado) conforme mostra o Quadro 2.

Admite-se, além disso, em sua elaboração o uso de aditivos que indicam a continuação do processo não podendo superar as concentrações máximas indicadas no produto final independentemente da concentração dos referidos aditivos neles ou nos queijos utilizados como matéria-prima (BRASIL, 1996, 1997).

O uso dos conservantes natamicina e ácido sórbico é indicado principalmente para a inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes, tais como bolores e leveduras. Tais limites são estabelecidos seguindo as recomendações do Comitê Conjunto de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA, para uso seguro de aditivos em alimentos (WHO, 1997), já que,

mesmo possuindo baixa toxicidade, o ácido sórbico é uma substância que pode causar alergias, problemas gástricos e até câncer quando ingerido em concentrações não recomendadas (FERRAND, 2000). O ácido sórbico foi considerado seguro para o consumo humano com ingestão diária aceitável (IDA) de 25 mg/kg por peso corpóreo (JECFA, 2002).

Quadro 2 - Aditivos autorizados para produção de queijo ralado

Aditivo	Função	Concentração máxima
Ácido Sórbico e seus sais de Sódio, Potássio e Cálcio	Conservador	1000 mg/kg isolados ou em combinação, expressas em ácido sórbico.
Natamicina	Conservador	5 mg/kg
Celulose Microcristalina	Antiaglutinante	b.p.f
Dióxido de Silício	Antiaglutinante	5 g/kg

Fonte: BRASIL (1997)

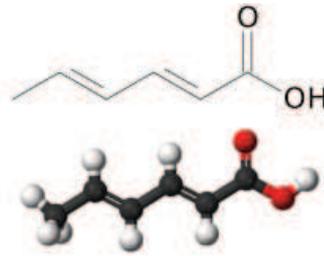
Podem ser utilizados também os coadjuvantes de tecnologia/elaboração, tais como o Nitrogênio, Dióxido de Carbono e/ou gases inertes não envasados.

2.1.2.1 Conservador ácido sórbico

O ácido sórbico, ou ácido 2,4-hexadienóico, é um composto orgânico encontrado na natureza e utilizado como conservante alimentar. É um sólido incolor, pouco solúvel na água e facilmente sublimável. Foi isolado pela primeira vez a partir dos frutos imaturos da sorveira ou tramazeira (*Sorbus aucuparia*), de onde provém seu nome. Sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 1 (ASHFORD, 2011).

De acordo com Luck et al. (2000), o ácido sórbico foi isolado em 1859 pela destilação do óleo de Tamazeira por A.W. von Hofmann. Este procedimento fornece a lactona do ácido sórbico, que foi subsequentemente convertida ao ácido sórbico por hidrólise. Suas propriedades antimicrobianas foram descobertas nas décadas de 1930 e 1940 e seu uso comercial propagou-se nas décadas de 1940 e 1950. A partir dos anos 80, o ácido sórbico e seus sais, os sorbatos passaram a ser utilizados em conservas de carnes como inibidores do *Clostridium botulinum*, para reduzir a necessidade do uso de nitritos que podem dar origem às nitrosaminas.

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido sórbico



Fonte: Ashford (2011)

O ácido sórbico e o seu sal de potássio mais solúvel, o sorbato de potássio, são considerados entre os conservantes mais versáteis e seguros de hoje em dia, por serem inibidores altamente eficientes contra os microrganismos mais comuns responsáveis pela degradação dos alimentos. O ácido sórbico apresenta-se como grânulos brancos cristalinos que fluem livremente, com um odor ligeiro que é característico. Esses conservantes são utilizados atualmente numa vasta variedade de aplicações na indústria alimentícia e das bebidas, incluindo o pão e outros produtos de padaria, produtos lácteos, geleias, xaropes, vinhos e outras bebidas. Devido à alta estabilidade do ácido sórbico e dos sorbatos a temperaturas elevadas (ponto de fusão de 134 °C, ponto de ebulição de 228 °C), ambos podem ser utilizados em alimentos aquecidos. É muito utilizado na indústria de alimentos, evitando o crescimento de microrganismos, tais como bolores e leveduras (NAIDU, 2000).

O ácido sórbico e seus sais de Ca e K tem apresentado efeitos inibitórios sobre leveduras, fungos filamentosos e uma vasta gama de bactérias (LIICK, 1976; SOFOS, 1995; RAJCHL et al., 2010; MORAES et al., 2007).

A principal ação inibitória dos sorbatos é contra leveduras e bolores, onde pequenas concentrações já causam efeito antifúngico (MORAES et al., 2007). Em leveduras, é necessária uma maior quantidade do conservante para que seja eficiente. Estudos reportaram que a dose mínima letal para *Saccharomyces cerevisiae* foi de 1,6 g/kg (KUBO; LEE, 1998) e que sua ação foi eficaz na redução de fungos filamentosos e leveduras em experimentos realizados com produtos lácteos (MORAES et al., 2007). Apesar dos sorbatos serem mais efetivos na inibição de fungos e leveduras, eles também são capazes de inibir algumas bactérias, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e bactérias psicrótróficas deteriorantes, como as *Pseudomonas* sp.

O mecanismo de ação do ácido sórbico sobre as bactérias ainda não está totalmente elucidado, porém podem causar modificações na morfologia de células microbianas, alterações nas funções da membrana celular inibindo funções de transporte e da atividade metabólica

(SOFOS, 1986). Já estudos relacionados ao mecanismo de defesa em fungos filamentosos, relatam a redução da assimilação de carbono, e substratos de glicose, acetato, succinato, lactato e enzimas vitais, tais com: malato, isocitrato, α -cetogluturato, desidrogenase, fumarase e aspartase, entre outras. A inibição da desidrogenases, interferindo na assimilação oxidativa também foi observada (SOFOS, 1986; LIICK, 1976; MORAES et al., 2007;).

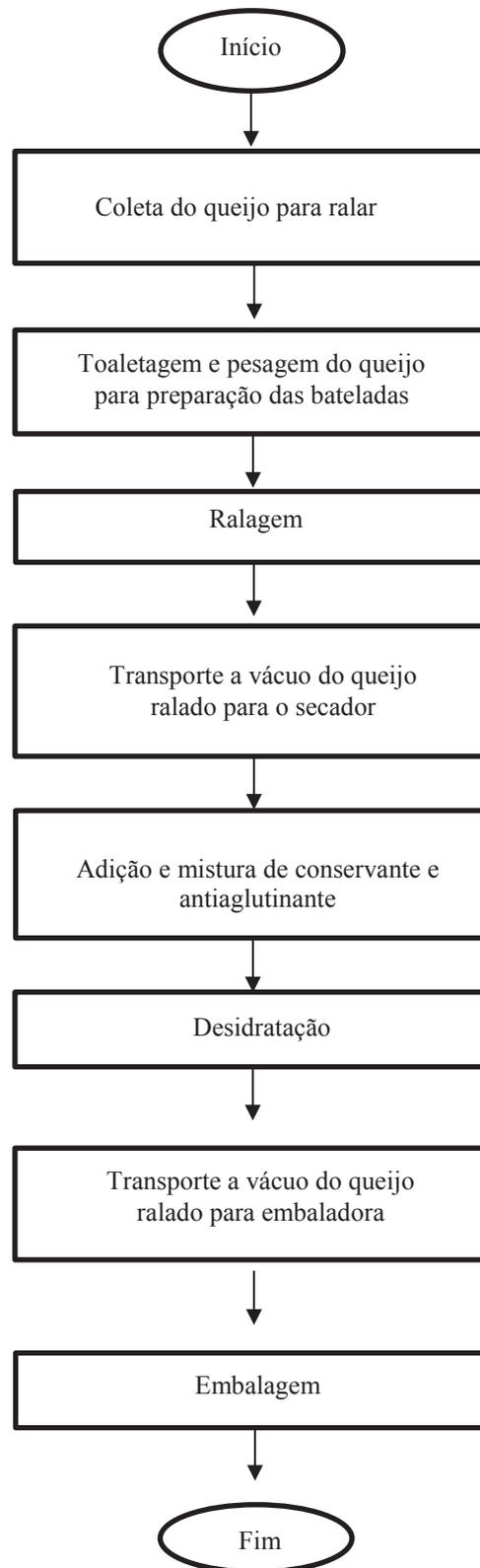
De acordo com dados disponíveis no Codex Stan 192- 1995 (revisado em 2017) não são esperados efeitos adversos à saúde pelo consumo de produtos lácteos contendo baixos níveis de ácido sórbico. Porém, investigações toxicológicas extensivas foram realizadas com o ácido sórbico e seus sais, incluindo os testes de toxicidade aguda e crônica, estudos sobre carcinogenicidade (GAUNT, 1975; HENDY et al, 1976), teratogenicidade e mutagenicidade também foram relatados (FDA, 1975). Apesar dos sorbatos apresentarem baixa toxicidade nos estudos, foram reportados casos de intolerância idiossincrática, urticárias e pseudo alergias em pessoas sensibilizadas a esse composto (DEUEL et al., 1954; HANNUKSELA, HAAHTELA, 1987; JUHLIN, 1981; WALKER, 1990; MOLOGNONI, 2015).

2.1.3 Processo de produção de queijo ralado

O queijo ralado é um alimento muito consumido pela população brasileira por se tratar de um produto pronto para o consumo, porém, pode oferecer alguns riscos microbiológicos e químicos à saúde da população uma vez que, durante a sua produção, ocorrem várias etapas de processamento até a obtenção do produto final, conforme pode ser observado na Figura 2 o fluxograma de produção de queijos ralados.

A matéria-prima inicialmente é coletada, passa por um processo de toaletagem que consiste na limpeza e preparação dos queijos que após são enviados para o processo de ralagem em forma de bateladas, ou seja, cada batelada é composta por 100 kg de queijo. Finalizada a ralagem o queijo é enviado para o secador através de transportadores à vácuo com tubulações fechadas. No secador ocorre a adição e mistura do conservador ácido sórbico e antiaglutinante. Após esta mistura, inicia-se o processo de desidratação do queijo ralado, onde é necessário reduzir a umidade do produto à no máximo 20% de acordo com Regulamento Técnico de Identidade e qualidade de queijo ralado (BRASIL, 1997). Quando o produto atingir o padrão de umidade desejado, é enviado para o processo de embalagem primária e secundária.

Figura 2 - Fluxograma de produção de queijos ralados



Fonte: Elaborado pelo autor

2.1.4 Qualidade higiênico-sanitária e fraudes em queijo ralado

Sabe-se que as BPF são procedimentos necessários para a obtenção de alimentos seguros. Portanto, para obter produtos isentos de contaminação microbiológica as indústrias devem adotar procedimentos de higiene geral, desinfecção de instalações e equipamentos, verificar as condições de saúde dos manipuladores, utilização de água de boa qualidade, realizar a verificação da procedência da matéria prima entre outras práticas (PUGA et al., 2008).

Com a finalidade de investigar a qualidade higiênico-sanitária de queijos ralados no Brasil vários estudos foram conduzidos por Salvador (2001), Mesquita (2001), Pimentel (2002), Maldonado (2006) e Mosquim (1998) e estes autores constataram que o queijo ralado é um dos produtos mais fraudados, porém são poucos os trabalhos disponíveis na literatura científica que tratam sobre a sua qualidade e melhorias na tecnologia de fabricação e conservação de queijos ralados. Os tipos de fraudes mais comuns encontradas em queijos ralados são: adição de amido para ganho em rendimento, uso de conservadores não permitidos e uso do conservador ácido sórbico acima do limite permitido pela legislação.

Quanto maiores as contagens desta classe de deteriorantes, maiores são as deficiências de higiene na planta de processamento. A presença de bolores e leveduras viáveis em um índice muito elevado nos alimentos pode indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva. Para controle de bolores e leveduras é necessária excelente higiene da planta de processamento, pois estes deteriorantes são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente (ZACARCHENCO, 2011).

Segundo Feitosa et al. (2003), esse tipo de contaminação compromete a qualidade e a vida de prateleira do produto, uma vez que bolores e leveduras são potenciais deterioradores de produtos lácteos. As altas contagens de bolores e leveduras encontradas sugerem que se faz necessário um controle maior da produção, em todo o processo, a fim de diminuir esses microrganismos no produto, que diminuíssem a sua vida útil consideravelmente.

As fraudes em alimentos e as práticas enganosas, realizadas por produtores sem escrúpulos orientados exclusivamente para a falsa representação sempre foram um problema sério por causa das vantagens econômicas derivadas da substituição parcial de ingredientes de alto preço por produtos de baixo custo. Em particular, para os gêneros alimentícios produzidos, processados e preparados em uma área geográfica específica, utilizando métodos reconhecidos, informações objetivas de autenticidade alimentar, é a principal preocupação para produtores de alimentos, varejistas e consumidores, contra práticas fraudulentas (CEVOLI, 2013). O queijo

ralado Parmesão e Tipo Grana podem ser facilmente misturados com queijos de baixa qualidade (REGATTIERI, 2007).

A legislação brasileira define que os aditivos utilizados no produto devem ser declarados na lista de ingredientes do rótulo, sendo permitida somente a adição dos queijos que se pretende trabalhar e que está na denominação de venda do produto, o conservador ácido sórbico e antiaglutinantes (BRASIL, 1997). Quaisquer outros produtos adicionados e que permaneçam na composição final do produto queijo ralado apesar de não causar danos à saúde do consumidor, não faz parte da tecnologia de fabricação do produto, ficando a sua adição como fraude.

No estudo de Marques (2016), foram analisadas 10 amostras de queijo Parmesão ralado adquiridas no comércio local de Caxias do Sul, RS. Em 50 % das amostras foi detectada a presença de *E. coli*, resultado que representa baixa qualidade higiênico-sanitária nos produtos. Em relação à análise da presença de amido 10% das amostras estavam em desacordo com a legislação, ficando caracterizada fraude e a exposição dos consumidores a produtos de qualidade contenciosa.

Martins et al. (2011) analisaram 40 amostras de queijo ralado e 22 (55%) foram positivas para *E. Coli*. Os autores associam a contaminação microbiológica ao processo de fabricação, comercialização e armazenamento do produto. Oliveira et al. (2012) também relatam que a contaminação por *E. Coli* em queijos ralados pode estar associada a falhas na higienização das mãos dos manipuladores durante o processamento ou à utilização de matérias primas contaminadas.

O ácido sórbico foi determinado em diferentes tipos de alimentos processados disponíveis no mercado brasileiro e apenas produtos lácteos especificamente queijos ralados não estavam de acordo com a legislação quanto ao limite recomendado do antimicrobiano (TFOUNI, TOLEDO, 2002).

Qualquer queijo que passa por uma salga pesada acaba ganhando consistência para ser ralado. Os produtos clandestinos produzidos com leite cru, sem o processo de pasteurização, ou seja, sem aquecimento e alterações, também podem ser ralados, após o processo de salga. Sujeiras no produto, até mesmo baratas, além de contaminações de inseticidas e raticidas, também podem estar no queijo produzido em local clandestino, sem a devida higienização. Adição de amido de milho e uso de leite rejeitado pelas indústrias por estar vencido ou fora de qualidade também ocorrem em produções fraudulentas (SFAGRO, 2017).

Em relatório feito pelo FDA foi descoberto que algumas marcas norte-americanas estão sendo processadas, pois podem não ter nenhum vestígio de queijo, e sim entre outras coisas madeira. De acordo com Arthur Schuman, presidente da *Neil Schuman's*, a maior distribuidora

de queijos italianos nos Estados Unidos, apenas 40% dos queijos ralados podem ser considerados realmente queijos. “*Os consumidores são inocentes e não percebem isso*”, disse ele em um relatório publicado pela agência de notícias *Bloomberg*, que realizou os próprios testes a partir de produtos encontrados nos mercados (JORNAL DA CIÊNCIA, 2017).

Nos trabalhos de Ribeiro et al., (2012) de oito amostras de queijo ralado analisadas, uma apresentou resultado positivo para presença de amido. Duarte et al., (2006) analisaram 120 amostras e 6 foram positivas para a presença de amido, caracterizando fraude no produto.

No estudo de Cevoli et al. (2013) foi avaliada a autenticidade de 400 amostras de queijo ralado Parmigiano Reggiano por meio da espectroscopia infravermelha, uma vez que a confirmação da autenticidade dos queijos de alto valor representa um tópico emergente no setor de alimentos e a demanda por técnicas analíticas rápidas e de baixo custo para o controle da qualidade em ambientes industriais está recebendo grande atenção.

O queijo Parmigiano Reggiano, bem como o queijo Tipo Grana podem ser vendidos como peças embaladas ou raladas. No primeiro caso o queijo é facilmente reconhecido porque possui os emblemas de origem protegida em sua casca. No entanto, quando ralado, pode haver alguma dúvida sobre a composição e autenticidade, portanto é necessário ter um meio analítico que verifique se a origem de um queijo ralado corresponde ao que diz em sua rotulagem (GORI et al., 2012).

2.2 OZÔNIO

O ozônio (O_3), um gás natural encontrado na atmosfera e formado a partir do oxigênio do meio ambiente, é popularmente conhecido por formar uma camada que filtra os raios ultravioletas. O O_3 é gerado pela reação de radicais livres de oxigênio com oxigênio diatômico. É uma forma alotrópica de oxigênio, com propriedades antimicrobianas muito boas. Foi em 1840, quando Christian Friedrich Schönbein, químico alemão-suíço, denominou a substância O_3 , com base na palavra grega *ozein* para "cheiro" (KOGELSCHATZ, 1988).

Comercialmente para o tratamento de águas em bebidas desde 1906 em Nice na França (HILL AND RICE, 1982) e o seu emprego nas indústrias de alimentos tem aumentado para produzir uma preservação e sanitização das superfícies de contato com alimentos. Pode-se observar a história do O_3 no Quadro 3.

Quadro 3 - História do O₃: aplicação e regulamentação em alimentos

Ano	Acontecimento
1839	Schonbein descobre o O ₃ .
1885	Soret determina a fórmula molecular do O ₃ .
1886	O potencial do O ₃ como desinfetante de água poluída é reconhecido na Europa.
1891	Resultados de testes na Alemanha mostraram que o O ₃ era efetivo contra bactérias.
1893	Primeira aplicação em larga escala usando O ₃ em água para consumo na Holanda.
1906	Comissão da França faz sua primeira planta municipal aplicando O ₃ na água para consumo.
1909	O ₃ é empregado para preservação de carne na Alemanha.
1936	O ₃ é utilizado para purificar marisco na França.
1939	O ₃ é utilizado para evitar a fermentação e crescimento de mofo durante o armazenamento de frutas.
1942	O ₃ é utilizado em câmaras de armazenamento de ovos e queijos nos EUA.
1964	A floculação espontânea em câmaras de contato com O ₃ leva a França a construir uma planta de O ₃ para aumentar a remoção de partículas.
1970	O ₃ é explorado para controle de algas na França.
1982	O FDA (Food and Drug Administration - Administração de Comidas e Remédios) dá a concessão de status GRAS (geralmente reconhecido como seguro) para a desinfecção de O ₃ em água engarrafada.
1987	Planta de ozonização entra em linha em Los Angeles após sete anos de teste piloto.
1997	Painel de peritos convocado pelo Electric Power Research Institute (EPRI) afirma o O ₃ como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) para contato direto com alimentos. O FDA (Food and Drug Administration - Administração de Comidas e Remédios) não se opõe a esta afirmação de GRAS.
1999	O Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) rejeita um protocolo de O ₃ para aplicação de carne, citando a declaração de 1982 GRAS para a desinfecção de água engarrafada em que o FDA declarou que qualquer outro uso deve ser regulado por uma petição de aditivo alimentar.
2000	Uma petição de aditivo alimentar (FAP) é anexada pelo EPRI requerendo ao FDA a aprovação do O ₃ para uso em contato direto em alimentos.
2001	FDA aprova o O ₃ como um aditivo alimentar de uso direto secundário, como agente antimicrobiano. (Registro Federal, Vol. 66, n 123, Junho) (FDA, 2001).
2004	O FDA emite orientações industriais e recomendações para processadores de suco de maçã ou cidra sobre o uso de O ₃ para fins de redução de patógenos (FDA, 2004).

Fonte: O'DONELL et al., (2012)

As reações químicas do O₃ são indiretas (mecanismo de reação em cadeia que leva à produção de radicais livres de hidroxila) ou direto (com substâncias presentes na matriz) (CULLEN et al., 2010; O'DONELL et al., 2012).

No entanto, o gás também é um excelente bactericida, fungicida e viricida, reconhecido como o mais seguro e eficaz método de tratamento de água do mundo. Suas vantagens são

aplicadas na indústria, piscinas, estações de tratamento de água e esgoto, medicina, odontologia e agricultura. Utilizado com sucesso na conservação de frutas, vegetais, peixes e ovos, o O₃ também chegou às propriedades dos produtos de leite e indústrias de laticínios do Rio Grande do Sul (LEITE E QUEIJOS, 2017).

A demanda por novas abordagens de preservação surge da crescente preferência dos consumidores por alimentos minimamente processados, por surtos relacionados com a alimentação, identificação de novos patógenos alimentares e a aprovação da legislação que governa a qualidade e segurança de alimentos. A Organização Mundial da Saúde identifica que doenças alimentares são consideradas uma ameaça para a saúde humana e que a economia global requer um esforço concentrado por parte de três parceiros principais: governo, a indústria alimentícia e os consumidores. Para as aplicações de sanitização, o O₃ pode ser preferido aos sanitizantes convencionais tais como o cloro, porque a taxa de inativação relativamente baixa do cloro em concentrações que são limitadas pela regulamentação, combinada pela preocupação dos consumidores sobre resíduos químicos e impactos no meio ambiente (O'DONNELL et al., 2012).

2.2.1 Legislação para uso de O₃

De acordo com O'donnell et al. (2012), enquanto que a garantia da segurança alimentar é uma preocupação global, o status da regulamentação do O₃ para o processamento e aplicação em alimentos ainda está evoluindo, e em alguns países ainda não se tem conhecimento.

Em alguns países como Alemanha, Canadá, França e Estados Unidos, o O₃ é usado há mais de 100 anos. Sua aplicação é aprovada por órgãos de saúde de várias partes do mundo, entre eles o FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, inclusive em lavagem de alimentos para o consumo humano (LEITE E QUEIJOS, 2017).

A legislação que governa o O₃ para tratamento, manipulação, processamento e armazenamento de alimentos, desenvolveu-se tipicamente em resposta à evolução do uso do O₃ para aplicações inicialmente em tratamento de água, limpeza da superfície de equipamentos, lavagens dos alimentos e finalmente para uso diretamente em alimentos como um aditivo.

O uso do O₃ no processamento de alimentos está se tornando cada vez mais importante como resultado para a afirmação de que o O₃ é um GRAS (Generally Recognised as Safe - Geralmente reconhecido como seguro) (GRAHAM et al., 1997) e subsequentemente aprovado pelo FDA como um aditivo antimicrobiano para contato direto com alimentos de todos os tipos (FDA, 2001).

O uso do O_3 no processamento de alimentos vem sendo aprovado em várias etapas de produção de alimentos e em muitos países incluindo os EUA, Japão, Austrália, França e Canadá. Dada à complexidade das matrizes dos alimentos e da quantidade de alimentos produzidos, demonstrar a validação de processos é um desafio para a indústria.

A ozonização passou a ser utilizada no Brasil como alternativa aos métodos convencionais de pré-cloração e pré-aeração no tratamento de águas superficiais a partir de 1983 (LAPOLLI et al., 2003). Existem diversos trabalhos publicados com o emprego da ozonização no tratamento de efluentes, água, odontologia, medicina e agricultura.

Na área de alimentos poucas pesquisas têm sido realizadas no Brasil e ainda não existe legislação específica que oriente aplicações nesta área. Dentro do processo de normatização da produção orgânica, a Instrução Normativa 18 de 2009 trata das normas de processamento tanto de alimentos de origem animal como vegetal. Nesta normativa, é permitido o uso do O_3 seja para a higienização ou até mesmo para entrar em contato direto com os alimentos orgânicos (BRASIL, 2009).

A Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, por meio da Coordenadoria de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (CISPOA), embora nunca tenha recebido informação sobre o uso de O_3 no processo de higienização ou produção de produtos de origem animal, recomenda que seja feito um comunicado ao serviço de inspeção local via ofício, solicitando a autorização para a utilização da nova tecnologia. O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) confirma que o uso de O_3 em câmaras de queijos já foi aprovado pelo órgão Ministério da Agricultura, porém qualquer aplicação em outras formas que não em câmara de maturação de queijos deve ser feita uma solicitação junto ao Ministério da Agricultura (LEITE E QUEIJOS, 2017).

2.2.2 Propriedades químicas e físico-químicas do O_3

A forte reatividade do O_3 é devida à estrutura da molécula. A molécula de O_3 consiste em três átomos de oxigênio. Na valência de cada átomo de oxigênio tem-se dois elétrons não emparelhados, cada um ocupando um orbital 2p. Isso significa que, durante a sua formação, três átomos de oxigênio são combinados, com o oxigênio central rearranjado em um plano sp^2 para 2s e dois 2p átomos orbitais na valência da banda. Com este novo rearranjo três novas orbitais híbridas sp^2 formam um triângulo com o núcleo de oxigênio no centro com um ângulo de $116,8^\circ$, como pode ser observado na Figura 3 (O'DONNELL et al., 2012).

O O₃, que se apresenta na forma triatômica do oxigênio (O₃), é um gás extremamente instável e parcialmente solúvel em água. Possui odor penetrante e é facilmente detectável em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05 mg/L) (LAPOLLI et al., 2003; RICE et al., 1981). Quando comparado a outros agentes oxidantes, o O₃ se destaca pelo elevado potencial de oxidação (2,07 m V). O O₃ é o segundo mais poderoso agente oxidante, perdendo apenas para o flúor (3,06 m V) (LAPOLLI et al., 2003; RUSSEL et al., 1999).

Figura 3 - Estrutura molecular do O₃



Fonte: O'Donnell et al. (2012)

O O₃ a temperatura ambiente e em baixas concentrações, apresenta-se como um gás incolor, já em altas concentrações adquire uma coloração azulada. Com o aumento da temperatura, o O₃ tem sua solubilidade em água reduzida, tornando-se menos estável. Porém o aumento na temperatura não altera expressivamente a taxa de desinfecção do O₃, com isso percebe-se que a desinfecção é relativamente independente da temperatura (SILVEIRA, 2004; LAPOLLI et al., 2003; USEPA, 1999).

O O₃ apresenta massa molar de 48 Da e condensa a -111,9 °C (RUSSEL et al., 1999). A Tabela 1 apresenta as principais propriedades físico-químicas deste gás.

Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas do O₃

Propriedades físico-químicas	
Massa Molar	48 Da
Massa específica (0°C e 101,3 kPa)	2,154 kg/m ³
Ponto de ebulição	-111,9 ± 0,3 °C
Ponto de fusão	-192,5 ± 0,3 °C
Solubilidade em água a 0 °C	20 g/m ³
Solubilidade em água a 30 °C	1,5 g/m ³
Temperatura crítica	-12,1 °C
Pressão crítica	5,53 MPa

Fonte: Vidal (2003).

Um valor de pH elevado favorece a decomposição do O_3 e a formação de diferentes tipos de compostos oxidantes com reatividades diferentes, como radicais livres hidroxila (elevado poder de oxidação). O O_3 é relativamente instável em solução aquosa e apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 minutos em água destilada a $20^\circ C$. Já em fase gasosa, o O_3 é mais estável, sua meia-vida no ar atmosférico, medida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, é na ordem de 12 horas (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; VIDAL, 2003; RUSSEL et al., 1999; GRAHAM 1997; WICKRAMANAYAKE, 1991; RICE et al., 1981).

O O_3 é o segundo mais poderoso agente oxidante comum, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Agentes oxidantes e seus potenciais de oxidação

Agente oxidante	Potencial de oxidação
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido hipocloro	1,49
Gás de Cloro	1,36

Fonte: Manley e Niegowski, 1967.

2.2.3 Geração de O_3

Na ozonização, tem-se a atuação de dois oxidantes, o O_3 molecular e os radicais OH. Para diferentes aplicações de O_3 em plantas de tratamento, as duas espécies diferem em sua importância. Enquanto a desinfecção ocorre predominantemente pela atuação do O_3 , nas reações de oxidação há contribuição de ambos os oxidantes. O O_3 é um gás instável, e existem diferentes métodos para a sua geração, algumas tecnologias estão apresentadas na Tabela 3, bem como seus princípios e campo de aplicação. O O_3 pode ser produzido a partir do ar, do oxigênio puro e da água altamente pura (DEZOTTI, 2008).

Os dois principais métodos de geração de O_3 utilizados em experimentos de laboratório ou em escala real são: descarga elétrica (também conhecido por descarga por efeito corona) e eletrólise, sendo o método mais difundido a descarga elétrica no ar ou oxigênio puro. De acordo com Dezotti (2008) as Equações 1 e 2 mostram como o O_3 é gerado por esta tecnologia.

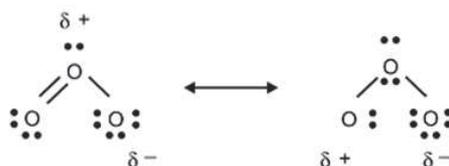
Tabela 3 - Resumo dos diferentes métodos de geração de O₃, princípios de trabalho e campos de aplicação.

Método de geração de O ₃	Princípio de trabalho	Fonte de O ₃	Campo de aplicação
Elétrico	Descarga elétrica	Ar e O ₂	Utilizada em laboratório e escala real
Eletroquímico	Eletrólise	Água	Predominante para aplicações com água pura, em escala de laboratório e pequena escala industrial
Fotoquímico (λ = 185 nm)	Irradiação (abstração de elétrons)	O ₂ (ar) e água	Nova tecnologia, para laboratório e escala real
Radiação química	Raios – X	Água	Raramente utilizado, somente em escala experimental
Térmico	Ionização de arco de luz	Água	Raramente utilizado, somente em escala experimental

Fonte: Dezotti (2008)



Nos geradores de O₃ do tipo descarga por efeito corona, a fonte de gás de alimentação utilizado, ar ou oxigênio, determina a concentração de O₃ na fase gás. As propriedades químicas do O₃ dependem de sua estrutura molecular, duas formas das estruturas de ressonância podem ser expressas como apresentado na Figura 4. Devido a sua estrutura, o O₃ molecular pode ser um agente dipolo, eletrofílico ou nucleofílico.

Figura 4 - Estruturas de ressonância da molécula de O₃.

Fonte: Dezotti, 2008.

2.2.4 Mecanismo de ação do O₃ sobre microrganismos

O O₃ é um poderoso agente oxidante, eficaz na inativação de bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, inclusive formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes (SOUZA, 2006; LAPOLLI et al., 2003; USEPA, 1999). O O₃ inativa diversas bactérias, incluindo Gram-negativas e Gram-positivas, células vegetativas e formas esporuladas, além de componentes do envoltório celular, esporos fúngicos ou cápsides virais, em concentrações relativamente baixas e em reduzido tempo de contato (KIM et al., 1999). A redução ou a inativação da população microbiana devido a ozonização depende da concentração de O₃, do tempo de aplicação e do microrganismo envolvido (SILVA, 2011; RUSSEL et al., 1999).

A inativação de microrganismos pelo O₃ é menos efetiva quando aplicada diretamente sobre a superfície do alimento do que o O₃ em demanda líquida. A inativação da microbiota em alimentos por O₃ depende muito da natureza e da composição da superfície dos alimentos, do tipo de contaminação microbiana, bem como o grau de associação de microrganismos com alimentos (KIM et al., 1999).

O O₃ atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolípideos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O O₃ ataca também grupos sulfidríla de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disso, sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos, como ocorre com alguns vírus, onde o O₃ destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas do cápsideo proteico (SILVEIRA, 2004; HUNT; MARIÑAS, 1999).

Sabe-se que a taxa de destruição de microrganismos aumenta com o aumento da temperatura. De acordo com a teoria de van't Hoff-Arrhenius, a temperatura determina, em parte, a taxa à qual o desinfetante se difunde através da superfície do microrganismo e a sua taxa de reação com o substrato (LANGLAIS et al., 1991). Quando ocorre um aumento na temperatura, o O₃ torna-se menos estável em água, porém a taxa de reação com o substrato orgânico dos microrganismos aumenta (LAPOLLI et al., 2003).

Os fungos são contaminantes comuns em alimentos e são responsáveis por perdas financeiras industriais e comerciais. A ozonização é bastante efetiva contra fungos e micotoxinas, porém os fungos tentem a ser mais resistentes que as bactérias na forma vegetativa (RUSSEL et al., 1999). Ainda assim, Wickramanayake (1991) relata que os fungos são mais

facilmente atingidos pela ação do O₃ e em menor período de tempo do que as bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus* spp.

Ames et al. (2013) estudaram a germinação de conídios fúngicos expostos a baixas concentrações de O₃, a 150 nL / L por 100d a 2°C. Cerca de 50% dos conídios não germinaram após 3-4 semanas, enquanto que 95% não germinaram após 2-3 meses. As colônias de *Conidia* mais antigas foram mais tolerantes ao O₃ do que as colônias mais jovens.

A inativação das bactérias pelo O₃ pode ser considerada uma reação de oxidação de vários constituintes celulares. O primeiro alvo da oxidação é a membrana celular, mas há evidências de que o O₃ aja também, sobre a atividade enzimática das bactérias. A oxidação e a inativação pelo O₃ são muito rápidas, além de não específicas em relação aos constituintes celulares, existindo dados que evidenciam a ação do O₃ sobre as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos da *Escherichia coli* (LAPOLLI et al., 2003).

2.3 O₃ EM ALIMENTOS

A ozonização é um processo não térmico inovador e com aplicações potenciais na moderna indústria de alimentos (JEONG et al., 2007; CULLEN et al., 2010; PIACHIN AND TRACHOO, 2011; CARDENAS et al., 2011; SHAH et al., 2011; BLOGOSLAWSKI AND STEWART, 2011; FRATAMICO et al., 2012).

Muitos processos da indústria de alimentos são propícios à utilização do O₃. São exemplos de aplicações a ozonização de produtos agrícolas durante o armazenamento e transporte e a sanitização da água de lavagem dos alimentos, equipamentos e materiais de embalagem (GRAHAM, 1997). Como um agente oxidante forte, o O₃ tem sido usado há muito tempo na indústria de alimentos; tem efeitos não térmicos letais sobre microrganismos devido à permeabilização e ao dano da membrana celular (PATIL, 2009).

O'Donnell et al. (2012), relata que o interesse pelo O₃ tem crescido muito nos últimos anos, em resposta às demandas dos consumidores por aditivos alimentares mais saudáveis e tem aumentado a aceitação e regulamentação para que o O₃ seja um deles. A multifuncionalidade do O₃ faz com que este seja um agente promissor no processamento de alimentos. O O₃ se decompõe rapidamente produzindo oxigênio e não deixa nenhum resíduo no alimento. Em particular, o FDA (Food and Drug Administration) salienta que o uso do O₃ em alimentos tem resultado num aumento do interesse para potenciais aplicações em alimentos por todo o mundo. O O₃ é um oxidante usado para tratamento em águas, sanitização, lavagem

e desinfecção de equipamentos, remoção de odores, processamento de frutas, vegetais, carnes e frutos do mar.

As abordagens de tratamento de alimentos incluem aplicações de O₃ tanto na forma gasosa ou aquosa. Lavagens com água ozonizada, o armazenamento em atmosferas ricas em O₃ e a adição direta de O₃ em alimentos fluidos estão sendo estudados. A eficácia do O₃ para o controle contra microrganismos presentes nos alimentos depende de uma série de fatores incluindo a quantidade de O₃ aplicada, o residual de O₃ no meio e vários fatores ambientais, tais como pH do meio, temperatura, umidade relativa, aditivos e a quantidade de matéria orgânica em torno da célula (O'DONNELL et al., 2012).

De acordo com O'donnell et al., (2012) as propriedades sensoriais são consistentemente avaliadas como sendo um dos fatores mais importantes que levam o consumidor a repetir a compra de produtos alimentícios. O O₃ é um forte agente oxidante e seu efeito deve ser considerado antes de qualquer potencial aplicação alimentar. Os efeitos dependerão da forma de aplicação, a dose, a composição do alimento e assim por diante.

2.3.1 Aplicação de O₃ em produtos lácteos

2.3.1.1 Queijos e iogurtes

Serra et al. (2003) utilizaram O₃ em uma câmara de maturação de queijos, mantida a 5 °C e umidade relativa até 80 % durante 3 meses. Os autores empregaram uma taxa de geração de O₃ de 8 g/h nos primeiros 5 dias, seguida por 4 g/h nos próximos 5 dias e 8 g/h a cada 40 minutos por período de uma hora durante o restante da maturação. Foi detectada uma redução efetiva de bolores no ambiente de maturação, porém a redução da contaminação nas superfícies da câmara somente ocorreu quando métodos de limpeza combinados com a ozonização foram utilizados.

Lanita e Silva (2008) observaram um bom desempenho no controle da biota contaminante durante o processo de maturação de queijo parmesão com aplicação de O₃ na concentração de 0,03 ppm em câmara mantida a 11 °C e umidade relativa entre 80 – 85 % por 60 dias. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o O₃ conseguiu reduzir a contagem de bolores e leveduras do ar da câmara de maturação. A ozonização propiciou uma redução de 2,8 x 10⁴ para 9,0 UFC/cm² na contagem de bolores e leveduras na superfície de queijos, quando foi combinada com duas operações de lavagem superficial das peças. Uma redução ligeiramente

menor também foi conseguida com o emprego de ozonização, uma lavagem inicial e aplicação de natamicina.

A Cooperativa de Laticínios General Neto, localizada no município de Barão, Rio Grande do Sul, é umas das pioneiras do Estado no uso durante o processo de industrialização. A cooperativa utiliza a tecnologia no ar durante o processo de maturação dos queijos, para redução de fungos, e custos com mão de obra. Os três aparelhos de O₃ que empresa possui geram 3g de O₃ cada, e eles ficam ligados de 6 a 7 horas por dia em média, e isso é suficiente para deixar o ar mais seco nas câmaras de maturação (LEITE E QUEIJOS, 2017).

Pinto et al. (2007) estudaram a eficiência do gás O₃ aplicado ao ar da câmara de maturação de queijos Parmesão e Tipo Grana no controle de fungos em suspensão, na superfície das prateleiras e queijos em maturação. O O₃ mostrou-se efetivo no controle de fungos ambientais e de superfícies, durante o processo de maturação dos queijos. Ao final do período, observou-se redução significativa de carga fúngica em 0,74 log₁₀ na superfície dos queijos, 0,91 log₁₀ na superfície das prateleiras e de 1,5 log₁₀ no ar.

Alexopoulos et al. (2017) utilizaram O₃ para controlar microrganismos deteriorantes durante a produção de produtos lácteos tais como iogurte e queijo. No iogurte ozonizado houve uma redução na contagem de mofo em 0,6 log UFC/g (25,1 %) no final do período em comparação com a amostra controle. No queijo, com salmoura ozonizada (1,3 mg/L O₃, NaCl 5 %) não houve grande diferença se comparado com o padrão somente com salmoura. Os autores concluíram que se os fatores de tempo e concentração de O₃ estiverem configurados corretamente, a ozonização pode ser uma abordagem promissora salvaguardando a produção de alguns produtos lácteos.

Segat et al., (2014) verificaram que pela primeira vez na literatura foi utilizado O₃ na cadeia de produção de queijo Mozzarella de alta umidade. Os resultados mostraram que o O₃ não pode ser aplicado para a recuperação do produto se ele já possui alta carga microbiana. Concluíram que para o queijo Mozzarella a melhor aplicabilidade do O₃ está em ozonizar a água que é utilizada para o resfriamento do queijo.

Existem estudos sobre a eficácia da ozonização em contagens microbianas em salmouras utilizadas para a fabricação de queijos, pois devido ao seu uso prolongado, as salmouras de queijo são progressivamente enriquecidas com substâncias orgânicas, o que permite que os microrganismos provenientes da coalhada se desenvolvam a altas concentrações. Marino et al. (2015) estudaram a viabilidade do uso do O₃ para reduzir a contaminação microbiana das salmouras. Os autores relatam que o efeito do O₃ aumenta com o aumento da concentração e do tempo do tratamento, reduzindo a contagem total de bactérias

a 4,61 log ufc / ml, staphylococcus a 3,37 log ufc / mL e leveduras 2,70 log ufc / mL, nos tratamentos mais fortes. O efeito antimicrobiana do O₃ foi influenciado pelo teor proteico da salmoura, no entanto na salmoura que continha altas quantidades de proteína o efeito da inativação dos microrganismos pelo O₃ ainda foi significativo. O modelo de Weibull estimou com precisão a faixa de inativação dos microrganismos, através das curvas de sobrevivência para cada tratamento realizado, sendo o melhor 0,40 mg / L de O₃ durante 240 minutos.

2.3.1.2 Leite em pó

Os estudos de Torlak & Sert (2013) mostraram que as contagens iniciais de Cronobacter podem ser reduzidas consideravelmente pelo tratamento com O₃ gasoso sem causar aumentos significativos nos níveis de oxidação lipídica no leite em pó. Os pesquisadores avaliaram a inativação de Cronobacter por O₃ gasoso em leite em pó com diferentes teores de gordura, as amostras foram expostas a uma corrente contínua de concentrações constantes de O₃ de 2,8 e 2,3 mg/L por até 120 minutos, houve redução de 2,71 e 3,28 log respectivamente. O tratamento com O₃ gasoso foi considerado pelos autores um método promissor para a redução de Cronobacter.

Mas não é apenas na captação da matéria prima que o O₃ mostra bons resultados, a tecnologia também se mostrou uma grande aliada no processo de produção. Na Dielat Laticínios, com indústria em Taquara, Rio Grande do Sul, o gás O₃ é utilizado na produção de leite em pó. Utilizam no transporte do leite em pó nas tubulações, através do sistema de ar, antes do ensacamento, tendo uma redução significativa na contagem microbiana (LEITE E QUEIJOS, 2017). Apesar da aprovação de produtores e empresários da indústria, ainda existem muitas dúvidas e falta de informação sobre essa revolucionária tecnologia já utilizada há muitos anos em outros países.

2.3.1.3 Processos de ordenha

Em reportagem na revista Leite de Queijos, com publicação em agosto de 2017, mostra como o O₃ pode auxiliar produtores na indústria e higienização. Em Carlos Barbosa, Rio Grande do Sul, o gás O₃ vem sendo empregado com excelentes resultados na propriedade da família Simon, que utiliza a tecnologia na higienização do sistema de ordenha. Além da economia com a redução de outros produtos de limpeza, melhorou a qualidade do leite e eliminação de resíduos químicos encontrados na água após a limpeza das ordenhadeiras.

Outra indústria que vem colhendo bons resultados com o uso do O₃ é o Laticínio Lacmax, no município de Marques de Souza localizada no Rio Grande do Sul. A empresa vem utilizando há cerca de seis meses tecnologia na higienização e limpeza dos utensílios envolvidos no processo produtivo e também na descontaminação do ar, ajudando muito na redução de bolores e leveduras (LEITE E QUEIJOS, 2017).

2.3.2 Outras aplicações de O₃

2.3.2.1 Aplicação de O₃ em farinhas e massas

Li et al. (2017) avaliaram os efeitos do tratamento de O₃ na inativação de microrganismos e alterações físico-químicas na farinha de trigo durante o armazenamento. A farinha de trigo foi colocada em um frasco de evaporação rotativa automática para garantir um contato homogêneo entre farinha e O₃ durante a reação e tratou-se por 5 min, 10 min, 15 min, 20 min e 30 min, respectivamente. A taxa de fluxo de ar foi ajustada em 5 L / min. A contagem total de microrganismos foi ligeiramente reduzida logo após o tratamento com O₃, mas mais significativamente diminuiu nos primeiros dias de armazenamento. Além disso, foram avaliados os efeitos prolongados da vida útil de noodles frescos e macarrão produzidos a partir da farinha tratada com O₃.

Os resultados deste estudo indicaram que o tratamento com O₃ pode não resultar em um efeito letal imediato nos microrganismos na farinha de trigo, que pode ser devido a compostos orgânicos como o amido e as proteínas na farinha de trigo que competem com microrganismos para reagir com o O₃, o que reduziu seu efeito de esterilização. Assim como a situação relatada por Jaeger et al. (2009) pelo efeito protetor dos constituintes do leite em *Lactobacillus rhamnosus* durante a inativação PEF. No entanto, causaram danos irreparáveis nas células vivas, assim eles foram finalmente dissolvidos e mortos.

Bai et al. (2017) avaliaram a extensão da vida útil de macarrão de trigo sarraceno semi-seco com a combinação de tratamento com O₃ aquoso e com embalagem em atmosfera modificada. Os resultados microbiológicos indicaram que adicionar 2,21 mg / L de O₃ a água, resultou em uma redução de 1,8 log 10 ufc / g das cargas microbianas iniciais no macarrão, além disso houve redução nas taxas de acidificação e deterioração. Foi possível estender a vida útil a 9 dias, enquanto que as características texturais e sensoriais foram mantidas.

2.3.2.2 Aplicação de O₃ em carnes

De acordo com os trabalhos de Kim et al. (1999), o tratamento com O₃ diminuiu a contagem de mesófilos aeróbios, coliformes e clostrídios sulfito redutores em carne transportada, além de melhorar a qualidade de armazenamento. Carcaças tratadas por 9 dias com 0,03 ppm de O₃ a 1,6 °C e 95 % de umidade relativa, não apresentaram crescimento bacteriano na superfície das peças.

Gertzou et al. (2017) avaliaram o efeito da combinação da ozonização e embalagem à vácuo na extensão da vida de prateleira em coxas de frango frescas durante o armazenamento sob refrigeração e consideraram este processo como inovador. Conseguiram estender em seis dias a vida útil do produto, utilizando 6 mg/L de O₃ e embalagens à vácuo e as propriedades sensoriais das coxas de frango não foram alteradas negativamente pela ozonização.

Paissoni et al. (2017) investigaram os possíveis efeitos físico-químicos indiretos na composição fenólica de vinho produzido a partir de uvas (*Vitis vinifera* L.) tratadas com O₃ logo após a colheita para redução da microbiota. Concluíram que o uso do O₃ como sanitizante em uvas antes do processo de fabricação do vinho pode ser considerado, pois não causou nenhum efeito negativo na extração de antocianinas e flavonoides.

O estudo de Subramanyam et al. (2017) avaliou a eficácia do O₃ contra insetos adultos de *Rhyzopertha dominica* em trigo e chegou-se a conclusão de que os insetos tendem a ser mais suscetíveis quando expostos a uma baixa concentração de O₃ por maiores períodos de tempo.

No estudo de Han et al., (2017) foram investigados os efeitos do mecanismo de ação da aplicação de O₃ a 2 ppm aliado ao tratamento de pré-resfriamento em amoras durante o armazenamento. Os resultados revelaram que os frutos da amoreira submetidos ao tratamento com O₃ e pré-resfriamento apresentaram níveis mais altos de acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais, melhor firmeza e cor em comparação com o controle, sendo possível aumentar a vida útil do produto durante o armazenamento.

No estudo recente de Brié et al. (2018), foi relatado que ainda pouca informação está disponível sobre o efeito do O₃ gasoso em vírus em matrizes de alimentos. Os autores realizaram uma comparação do efeito do O₃ sobre o norovírus murinho (MNV-1) e o vírus da Hepatite A (HAV) adsorvido em framboesas frescas, pois as framboesas são produtos vulneráveis para os quais as soluções de tratamento industrial que garantem segurança alimentar e qualidade sensorial não são facilmente aplicáveis. As framboesas foram associadas a numerosos surtos de alimentos nas últimas décadas. Em conclusão, os autores relatam que o O₃ pode ser visto como um método alternativo e prospectivo para a desinfecção e descontaminação de framboesas.

2.3.2.3 Aplicação de O₃ em milho

Mylona et al. (2014) estudaram a eficácia do gás O₃ na germinação de esporos, crescimento e produção de fumosina por *Fusarium verticillioides* in vitro e in situ em milho em concentrações de O₃ de 100 e 200 ppm, aplicado por 30 ou 60 minutos (taxa de fluxo de 6 L / min) em diferentes condições de atividade de água. Os autores relatam que a germinação pareceu ser completamente inibida imediatamente após o tratamento (24 h), independentemente do nível de exposição ao O₃ e atividade de água, porém o armazenamento do milho resultou na recuperação da germinação dos esporos durante 8 a 10 dias de incubação. Ainda precisam ser estudadas as implicações e limitações do uso do O₃ gasoso como estratégia para o controle da contaminação em cereais.

2.3.2.4 Aplicação de O₃ em pimentões

Alexandre et al. (2011) fizeram uma modelagem da redução da carga microbiana em alimentos analisando o impacto do uso do O₃. Avaliaram o impacto do O₃ sobre *Listeria innocua* em pimentões vermelhos, mesófilos totais em morangos e coliformes totais em agrião. A lavagem de frutas e vegetais em água ozonizada são mais eficazes na redução de cargas microbianas quando comparado ao mergulho simples em água.

2.3.3 Principais alterações nos alimentos devido ao tratamento com O₃

O O₃ não pode ser considerado universalmente benéfico aos alimentos, pois em altas concentrações, pode promover a degradação oxidativa, alterando o sabor e a coloração do produto alimentício (KIM et al., 1999).

A desvantagem da utilização de O₃ como desinfetante é sua instabilidade. O grande desafio é prever como o O₃ reage com a matéria orgânica, o gás pode oxidar o composto, ou espontaneamente, decompor-se em oxigênio e radicais livres. Os mecanismos de decomposição do O₃ são processos complexos, que dependem de fatores como os tipos de radicais formados em solução e o tipo de matéria orgânica presente. Portanto, é difícil generalizar que uma dada concentração particular de O₃ num determinado percentual será efetiva para a inibição dos microrganismos presentes nos produtos alimentícios (LANGLAIS et al., 1991). De acordo com

Oskan et al. (2011), é possível obter maior eficiência na mistura à medida que se eleva a umidade relativa da mistura gasosa que contém O₃.

Estudos mostraram que o O₃ diminuiu o ácido ascórbico em brócolis e conteúdo de tiamina em farinha de trigo. O O₃ teve um efeito negativo na qualidade sensorial de alguns produtos como grãos, especiarias e leite em pó, devido à oxidação de lipídios. Porém, outros investigadores demonstraram que o tratamento com O₃ melhorou a qualidade sensorial em carne de boi e de ovos e não alterou significativamente a qualidade sensorial de algumas frutas e legumes (KIM et al., 1999).

Lanita e Silva (2008) não constataram o surgimento de processos adicionais de rancidez oxidativa em queijo parmesão submetido à ação do O₃ durante a maturação.

Isikber et al. (2015) relatam que apesar dos efeitos antimicrobianos que o O₃ possui sobre alimentos, em alguns casos pode promover a oxidação e degradação de constituintes químicos e que o uso do gás O₃ em altas concentrações por longos períodos de exposição pode ocasionar a oxidação superficial, descoloração ou desenvolvimento de odores indesejáveis nos alimentos.

Marino et al. (2015) relatam que em sua pesquisa sobre a inativação de microrganismos em salmoura a inativação microbiana diminuía à medida que a concentração de proteína na salmoura foi aumentada.

Efeitos químicos, estruturais e funcionais resultantes da aplicação de O₃ em proteína de soro isolada foram estudados por Segat et al. (2014), onde foi utilizada uma alta concentração de O₃ gasoso para tratar o pó de proteína de soro de leite isolada em diferentes tempos, variando de 30 a 480 minutos. Os resultados mostraram uma redução de grupos livres sulfidrilo e um aumento da hidrofobia superficial, indicando um auto rearranjo na estrutura proteica após a ozonização assim, a ozonização permite a criação de uma estrutura mais flexível e sem a formação de uma forte rede de ligações dissulfureto ou agregações. Altas concentrações de O₃ geraram efeitos oxidativos moderados, dependendo da duração dos tratamentos utilizados. Os resultados deste estudo indicaram a viabilidade do processamento de O₃ como um novo método para desenvolver proteínas de soro com funcionalidades específicas.

Mendez et al. (2003), estudaram o efeito do O₃ sobre a qualidade de grãos expostos a altas concentrações de O₃ e observaram que a casca do arroz tornou-se mais escura e com odor de vinagre, a exposição ocorreu a 50 ppm durante 30 dias. No entanto, no processo de moagem estas imperfeições formadas pelo O₃ foram removidas. Neste mesmo estudo, o tratamento de grãos a 50 ppm por 30 dias, não teve nenhum efeito prejudicial em pipoca, em soja quanto aos

ácidos graxos e composição de aminoácidos, em trigo e milho referente as características de moagem, no trigo quanto as características de cozimento e no arroz quanto a sua viscosidade.

De acordo com Nascimento et al. (2008) devem ser estudados, compreendidos e ajustados os efeitos sobre os vários parâmetros da qualidade dos alimentos tratados com O₃. Os autores utilizaram O₃ e ultrassom como um processo alternativo para o tratamento de café despulpado. O tratamento com O₃ e ultrassom alteraram os valores de sólidos solúveis totais no café, porém não de forma acentuada que pudesse influenciar na bebida. Já para os açúcares redutores e não redutores foi verificada uma redução significativa em após o tratamento com O₃, já que o O₃ tem a capacidade de hidrolisar parte da celulose da parede celular a açúcares, bem como de outros polissacarídeos. A análise de compostos fenólicos apresentou elevação estatisticamente significativa, onde o que contribuiu para o aumento do teor destes compostos nas amostras tratadas com O₃ seria a degradação de polímeros fenólicos, como a lignina. De fato, Quesada et al. (1998) e Wiese e Pell (2003) apresentaram resultados de degradação de lignina por O₃, formando vários compostos, entre eles, fenólicos mais simples, como derivados de ácido benzoico e cinâmico.

No mesmo estudo de Nascimento et al. (2008), foi avaliada a condutividade elétrica após o tratamento do café com O₃, houve uma redução estatisticamente significativa. Sabe-se que a condutividade elétrica aumenta com os danos causados à integridade das membranas celulares, sendo considerado um indicador consistente desta integridade (RIBEIRO, 2003). A ação do O₃ pode aumentar a concentração de fenóis, que apresentam uma grande capacidade de complexação com íons metálicos.

Sabe-se que o O₃ produz radicais hidroxila e peróxido, que provocam cisão de polissacarídeos (QUESADA, 1998), podendo ser considerado um mecanismo alternativo não enzimático para a despolimerização ou solubilização dos mesmos. Sugere-se que o O₃ agindo em amostras de café poderiam ter degradado parte da pectina, formando polissacarídeos menores e mais acessíveis à poligalacturonase, possivelmente aumentando a sua ação. Em aplicação de O₃ em café, houve redução da enzima pectinametilesterase e para as enzimas polifenoloxidase e pologalacturonase não houve diferença significativa após o tratamento (NASCIMENTO, 2008).

No estudo de Nascimento et al. (2008) não houve diferenças significativas para os parâmetros de acidez titulável pH, açúcares totais em café submetido ao tratamento com O₃.

Um fator negativo do O₃ é que a aspiração direta é extremamente perigosa, por sua alta toxicidade ao ser humano. No entanto, a ingestão por intermédio de água ozonizada ou

alimentos ozonizados não apresenta perigo, pois a meia-vida do O₃ é relativamente curta (LAPOLLI et al., 2003).

Roberto et al. (2016) avaliaram amendoim tratado com O₃, e neste estudo o percentual de ácidos graxos livres do óleo bruto permaneceu na faixa desejada nas diferentes combinações de concentração do O₃ e altura da coluna de grãos. Com relação ao índice de peróxido do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim os autores não verificaram variação significativa em decorrência das diferentes combinações de concentração do O₃ e altura da coluna de grãos.

No estudo de Roberto et al. (2016) os valores médios de índice de peróxido do óleo bruto de amendoim permaneceram na faixa aceitáveis, entretanto, Sanchez et al. (2016) avaliaram a qualidade de amendoim ozonizado na concentração de 2,77 mg / L, por 12 horas, em diferentes pontos de coluna de 0,75 m de grãos. Os autores observaram maiores valores de índice de peróxido nas camadas mais próximas à base da coluna de grãos.

Akbas e Ozdemir (2008) não observaram aumento do percentual de ácidos graxos livres no óleo bruto extraído de pistaches ozonizados nas concentrações de 5,0, 7,0 e 9,0 mg / L, por períodos de exposição de até 420 min.

Alencar et al. (2011) também não observaram variação no percentual de ácidos graxos livres em óleo bruto extraído de grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg / L, por até 96 horas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento prático deste trabalho a empresa Rasip Alimentos LTDA, Unidade Láctea cedeu os seus equipamentos, matérias-primas e laboratórios. A Rasip Alimentos LTDA está localizada na cidade de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.1 MATÉRIAS-PRIMAS

O queijo ralado foi produzido a partir de dois queijos, o queijo Tipo Grana, o qual tem peso aproximado de 35 kg e maturação mínima de 12 meses e o queijo Parmesão, o qual possui peso aproximado de 7 kg e maturação mínima de 6 meses. Os queijos foram ralados em dois tipos de formulações, conforme seguem abaixo:

- a) **Queijo Tipo Grana Ralado:** formulação 100% queijo Tipo Grana produzido na própria empresa.
- b) **Queijo Parmesão Ralado:** formulação 75% queijo Parmesão e 25% de queijo Tipo Grana ambos produzidos na própria empresa.

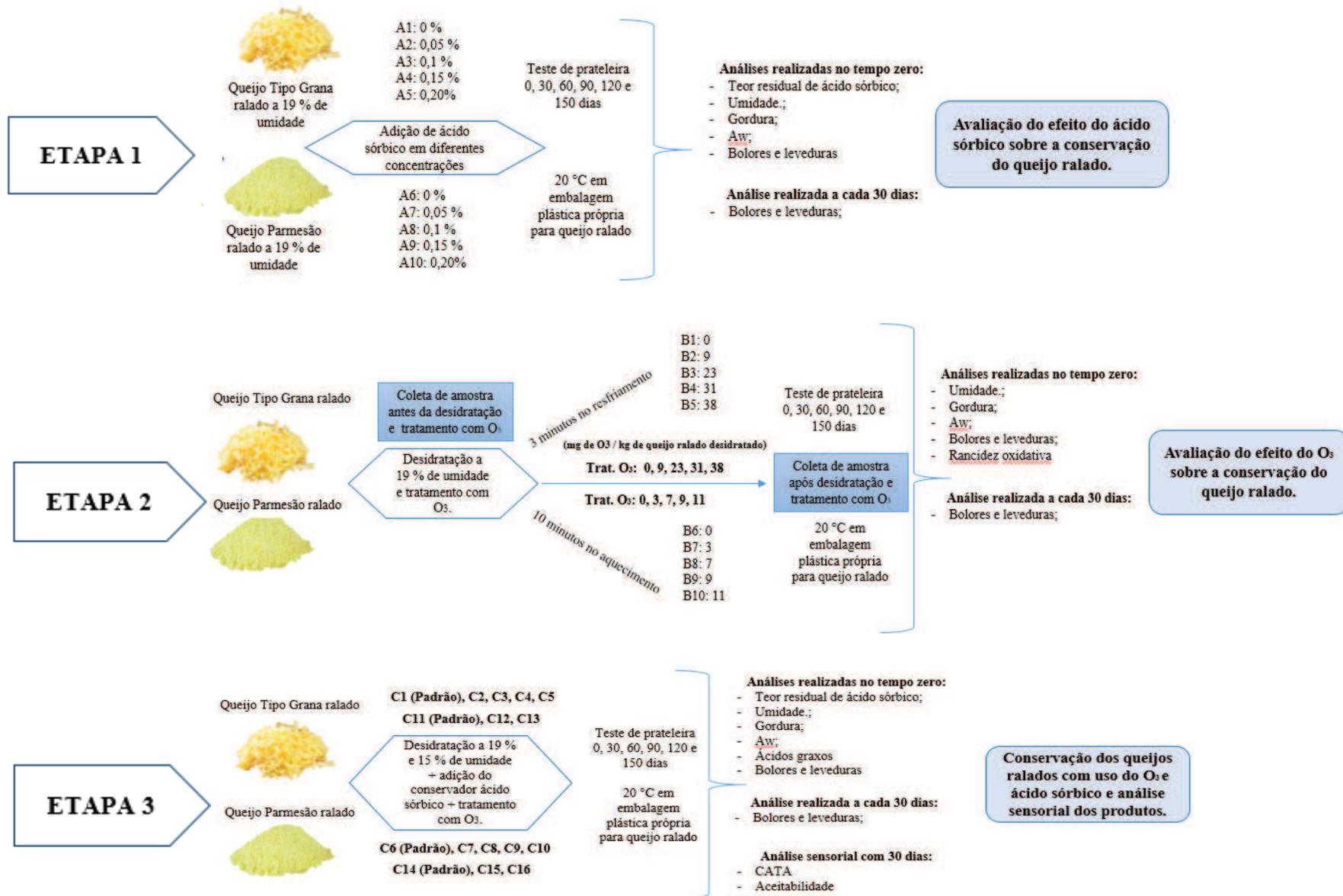
3.1.1 Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas queijo Tipo Grana e queijo Parmesão, que foram utilizadas para as análises, foram caracterizadas, onde realizaram-se análises de gordura, umidade, atividade de água, pH, gordura no extrato seco e composição de ácidos graxos.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa está estruturada em três etapas (Figura 5). Na etapa 1 foi realizada uma avaliação preliminar do efeito do ácido sórbico sobre a conservação do queijo ralado. Na etapa 2 foi realizada uma avaliação preliminar do efeito do ozônio sobre a conservação do queijo ralado. Na etapa 3 foram combinados os resultados da etapa 1 e etapa 2 e realizada a produção de queijos ralados com a utilização do conservador ácido sórbico e O₃. Ainda na etapa 3, foi realizada a análise sensorial dos experimentos utilizando as escalas de aceitabilidade e ainda a aplicação da metodologia CATA (*Check All That Apply*), ou marque tudo que se aplica ao produto.

Figura 5 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no projeto



3.2.1 Etapa 1: Avaliação do efeito do ácido sórbico sobre a conservação do queijo ralado

Os queijos foram ralados em raladores industriais com chapa de ralo de diâmetro de 1,5 mm, após ralados foram transferidos através de tubulações à vácuo para o secador, local onde ocorre o processo de desidratação, onde os queijos ralados foram desidratados a uma umidade média $19 \% \pm 1 \%$. Finalizado o processo de desidratação foram coletadas as amostras em porções de 20 kg cada e distribuídas em porções menores de 200 g. Em triplicata, foram realizados 10 experimentos, adicionando-se o conservador ácido sórbico a cada porção nas concentrações: 0 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,15 % e 0,20 %, experimentos A1, A2, A3, A4 e A5 respectivamente para o queijo Tipo Grana ralado e A6, A7, A8, A9 e A10 para o queijo Parmesão ralado.

O queijo ralado foi acondicionado em embalagens plásticas padrão para queijo ralado, seladas em máquina embaladora específica. As porções foram armazenadas em câmara de estocagem própria para produtos lácteos em uma temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 150 dias. Nesta etapa foram realizadas análises no tempo zero: teor residual de ácido sórbico, umidade, gordura e atividade de água. Também foi realizada a análise de bolores e leveduras a cada 30 dias decorridos do tempo de armazenamento até completar 150 dias.

O objetivo desta etapa foi realizar uma avaliação preliminar do efeito do ácido sórbico sobre a conservação dos queijos ralados, para que quando o conservante químico for aliado ao O_3 possa ser iniciado o novo teste na menor concentração de ácido sórbico necessária para a conservação do queijo ralado.

3.2.2 Etapa 2: Avaliação do efeito do ozônio sobre a conservação do queijo ralado.

3.2.2.1 Geração de O_3

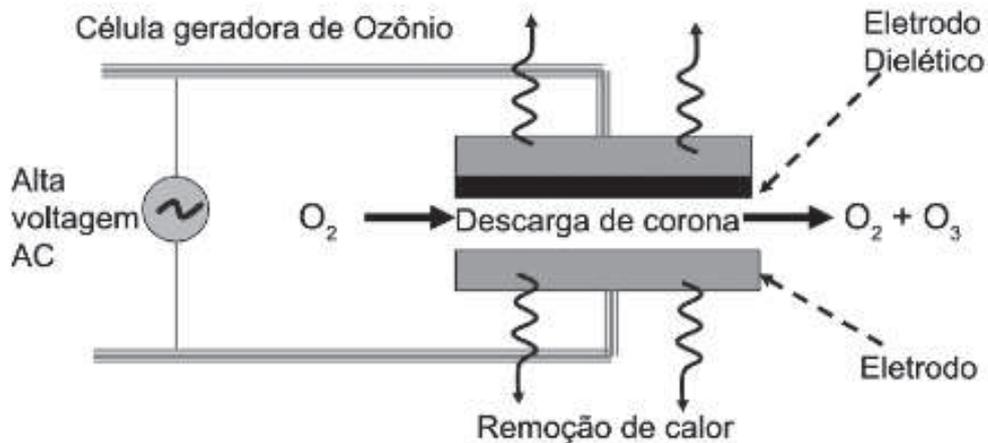
O equipamento que foi utilizado para os testes é um gerador de O_3 modelo IDP 20, da marca O3R. O abastecimento de ar ao equipamento ocorre através de compressores, os quais geram ar mais puro.

O ar passa pelos dois concentradores de oxigênio (PSA RADIAL), melhorando a qualidade do ar que entra para a geração de O_3 , onde passa a ter 89 % de Oxigênio, sendo assim

considerado um ar de alta qualidade para a geração de O_3 , já que o ideal é de 70 % a 100 % de oxigênio, conforme orientação do fornecedor do equipamento.

Após, o oxigênio é transformado em O_3 através do efeito descarga de corona, conforme pode ser observado o esquema do sistema de geração de O_3 por descarga elétrica na Figura 6.

Figura 6 - Esquema de sistema de geração de O_3 por descarga por efeito corona



Fonte: DEZOTTI (2008)

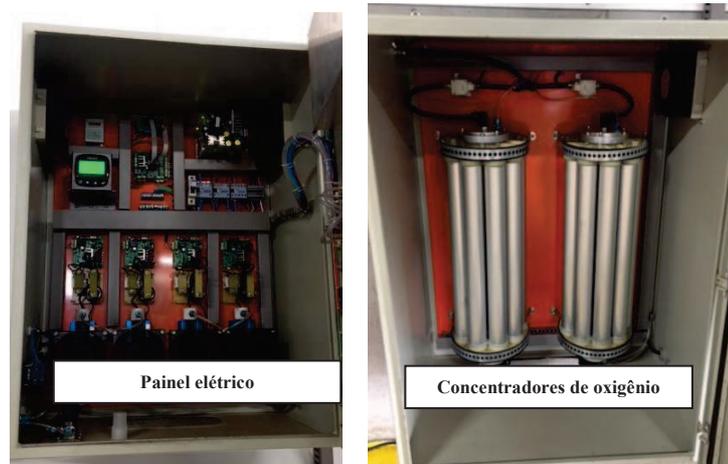
O equipamento foi instalado próximo à ventoinha responsável por sugar o ar externo para o interior dos secadores, a mangueira de saída do O_3 foi conectada ao duto de condução de ar, conforme Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Equipamento utilizado para a geração de O_3



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 8 - Interior do equipamento gerador de O_3



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 9 - Sistema de injeção de O_3 no secador de queijo ralado



Fonte: elaborado pelo autor

3.2.2.2 Aplicação de O_3 em queijo ralado

Foram realizados testes de adição de O_3 no ar que entra no secador em duas etapas diferentes no processo de desidratação: 1º) nos primeiros 10 minutos de aquecimento do queijo ralado; 2º) nos três minutos finais de resfriamento (nesta etapa o O_3 não entra em contato com o calor gerado na desidratação).

As quantidades de O_3 que foram escolhidas para serem aplicadas nos testes seguem detalhadas na Tabela 4. As concentrações foram escolhidas de acordo com os tempos determinados e capacidade de geração de O_3 pelo equipamento, foram escolhidas as faixas de concentrações que variaram entre o mínimo, intermediário e máximo do que o equipamento produziu.

Tabela 4 - Quantidade de O₃ aplicado nos queijos durante a o processo de desidratação

Experimento	Etapa de aplicação do processo de desidratação	Produção de O₃ (mg de O₃ / kg de queijo desidratado)
B1		0
B2		9
B3	10 minutos durante aquecimento	23
B4		31
B5		38
B6		0
B7		3
B8	3 minutos finais durante resfriamento	7
B9		9
B10		11

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os queijos ralados foram ralados em raladores industriais com chapa de ralo de 1,5 mm, após esta etapa foi coletada uma amostra de queijo ralado em triplicata, para avaliação do queijo ralado antes do processo de adição de ozônio e desidratação.

Os queijos ralados foram transferidos através de tubulações à vácuo para o secador, local onde ocorre o processo de desidratação e nesta pesquisa o local onde os queijos ralados foram tratados com O₃. Os queijos ralados foram desidratados a uma umidade média 19 % ± 1 %. Após o processo de desidratação e tratamento com O₃, as amostras de queijo ralado foram coletadas em triplicata enviadas ao laboratório da empresa Rasip.

O queijo ralado foi acondicionado em embalagens plásticas padrão para queijo ralado, seladas em máquina embaladora específica. As porções foram armazenadas em câmara de estocagem própria para produtos lácteos em uma temperatura de 20 °C ± 2 °C por um período de 150 dias.

Em todas as amostras coletadas nesta etapa foram realizadas análises de bolores e leveduras nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias e análises físico-químicas: gordura, umidade, rancidez oxidativa e atividade de água.

Como o grande problema dos produtores de queijos ralados Parmesão e Tipo Grana é o crescimento de bolores e leveduras ao longo do tempo de prateleira combinado com a umidade

do produto mais elevada, as análises realizadas na etapa 2 tiveram grande importância para a determinação de qual a melhor concentração de O₃ e qual a melhor etapa no processo de desidratação para aplicação de O₃, para a obtenção dos melhores resultados de inibição de bolores e leveduras e com menores alterações químicas no queijo ralado.

3.2.3 Etapa 3: Conservação do queijo ralado com uso de O₃ e ácido sórbico

Após a conclusão dos testes da etapa 1 e 2 foi seguido para a etapa 3, onde inicialmente foram combinadas as concentrações mínimas de ácido sórbico e injeção de O₃ através das formulações de queijo ralado, conforme seguem apresentadas nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5 - Formulações para produção de queijo Tipo Grana ralado

Experimento	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C1 (padrão)	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C2	Queijo Tipo Grana ralado	Com tratamento	0,05%	19 ± 1 %
C3	Queijo Tipo Grana ralado	Com tratamento	0,08%	19 ± 1 %
C4	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,05%	19 ± 1 %
C5	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	19 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

Tabela 6 - Formulações para produção de queijo Parmesão ralado

Experimento	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C6 (Padrão)	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C7	Queijo Parmesão ralado	Com tratamento	0,05%	19 ± 1 %
C8	Queijo Parmesão ralado	Com tratamento	0,08%	19 ± 1 %
C9	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,05%	19 ± 1 %
C10	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	19 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

Tabela 7 - Formulação para produção de queijo Tipo Grana ralado

Experimentos	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C11 (padrão)	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C12	Queijo Tipo Grana ralado	Com tratamento	0,08%	15 ± 1 %
C13	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	15 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

Tabela 8 - Formulação para produção de queijo Parmesão ralado

Experimentos	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C14 (Padrão)	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C15	Queijo Parmesão ralado	Com tratamento	0,08%	15 ± 1 %
C16	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	15 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

Os queijos ralados foram ralados em raladores industriais com chapa de ralo de 1,5 mm. Os queijos ralados foram transferidos através de tubulações à vácuo para o secador, local onde ocorreu o processo de desidratação, adição do conservador ácido sórbico e tratamento com O₃. Os queijos ralados foram desidratados a uma umidade média 19 % ± 1 %. Após o processo de desidratação e tratamento com O₃, as amostras de queijo ralado foram coletadas em triplicata enviadas ao laboratório da empresa Rasip.

O queijo ralado foi acondicionado em embalagens plásticas padrão para queijo ralado, seladas em máquina embaladora específica. Os queijos ralados foram coletados em porções de 100 g. As porções foram armazenadas em câmara de estocagem própria para produtos lácteos em uma temperatura de 20 °C ± 2 °C por um período de 150 dias. Os queijos ralados foram analisados no tempo zero e também ao longo do tempo de prateleira. Foram realizadas análises de bolores e leveduras para avaliação da estabilidade microbiológica e também foram realizadas análises de ácido sórbico, gordura, umidade, atividade de água e ácidos graxos.

Também na etapa 3 foi realizada a análise sensorial dos queijos ralados fabricados com a nova tecnologia verificando a aceitabilidade e também os atributos ressaltados através da metodologia CATA (*Check All That Apply*) ou marque tudo que se aplica.

3.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e apresentadas como média ± desvio padrão. As metodologias que foram utilizadas para a realização dos ensaios do presente trabalho estão detalhadas abaixo.

3.3.1 Análise de bolores e leveduras

A análise de bolores e leveduras foi realizada a cada 30 dias de validade dos produtos, até completar 150 dias. O método utilizado para análise de bolores e leveduras foi de acordo

com a ISO 6611/2004, onde foram pesadas 25 g de amostra de queijo ralado e transferido para erlenmeyer contendo 225 ml de solução peptonada 1 %, esterilizada. Após, esta mistura foi vigorosamente agitada, e transferido com micropipetador 0,1 ml para placa com meio de cultura DRBC: Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol. Posteriormente as placas foram incubadas a uma temperatura $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Após este período as placas foram retiradas da estufa para realização da contagem.

3.3.2 Análise do teor residual de ácido sórbico

As análises do teor residual de ácido sórbico foram realizadas através da metodologia descrita na IN 68/2006, Anexo V (BRASIL, 2006), que trata dos métodos quantitativos aplicados as análises de leites e produtos lácteos. Uma destilação por arraste de vapor é realizada, na qual o ácido sórbico oxida-se a aldeído malônico formando um composto de condensação de coloração vermelha, resultante da reação em meio ácido de dois moles de ácido 2-tiobarbitúrico e um mol de aldeído malônico. Esta coloração, resultante da presença do ácido é medida por espectrofotômetro a 532 nm, comparando-se com a curva padrão previamente estabelecida, para determinação do residual.

As análises do teor residual de ácido sórbico somente foram realizadas no tempo zero dos produtos, nas etapas 1 e 3.

3.3.3 Análise de gordura

Para realização da análise de gordura utilizou-se o método butirométrico de acordo com a IN 68/2006 (BRASIL, 2006). Foram pesados exatamente 3 g de amostra, diretamente no copo do butirômetro. O copo do butirômetro foi acoplado à parte inferior, de forma que ficasse bem vedado. Foi adicionado 5 mL de água destilada a 60-70 °C. Após adicionado 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. Foi colocado a tampa no butirômetro e mantido em banho-maria a 65 °C, para auxiliar na dissolução da amostra. Foi agitado até que se dissolva toda a amostra. Quando a amostra se apresentou dissolvida, foi retirado a tampa superior do butirômetro e adicionado água destilada até a última marcação deste. A tampa do butirômetro foi recolocada e centrifugado por 10 minutos, a 1200 rpm.

O resultado da gordura é dado diretamente na escala da vidraria, imediatamente após a retirada do butirômetro da centrífuga em percentual de gordura.

3.3.4 Análise de umidade

A análise da umidade dos queijos ralados foi realizada através do método gravimétrico de acordo com a IN 68/2006 (BRASIL, 2006). Foi realizada a pesagem de uma cápsula de porcelana, e anotado o peso no registro de controle de análise de umidade. A balança foi tarada com a cápsula de porcelana, então foi realizada a pesagem de 5 g de queijo ralado. A amostra foi levada para a estufa em temperatura de 90 a 110 °C por 3 horas. As cápsulas foram retiradas da estufa com auxílio da pinça de alumínio, e transferidas para o dessecador até que ficassem completamente resfriadas. Foi realizada a primeira pesagem, e as cápsulas novamente colocadas na estufa. O processo de pesagem repetiu-se duas vezes a cada 40 minutos, onde em todas elas a cápsula foi colocada no dessecador até que esfriasse, e as mesmas foram pesadas em todas as repetições.

O resultado foi obtido através de um cálculo, onde deve-se somar o valor da tara inicial com o valor do peso do queijo inicial (5 gramas) e diminuir o valor da tara final, com este resultado multiplica-se por 100 e divide-se pelo peso inicial do queijo novamente. Sendo assim o resultado de umidade é expresso em percentual.

3.3.5 Análise de atividade de água

A análise da atividade de água foi realizada com o equipamento modelo Labmaster AW NEO, onde o princípio de medição ocorre através de uma célula eletrolítica resistiva e sensor infravermelho.

3.3.6 Análise de rancidez oxidativa

A análise de rancidez oxidativa foi realizada de acordo com a metodologia citada na Portaria I MAPA de 07 de outubro de 1981 (BRASIL 1981), na qual a reação do aldeído epihidrílico (formado na rancificação das gorduras) com a floroglucina em presença de ácido clorídrico fornece um composto de condensação de coloração vermelha, indicando a presença de ranço na amostra, ou consequente ausência caso não ocorra a coloração.

3.3.7 Análise de ácidos graxos

A análise de ácidos graxos foi realizada nos queijos ralados logo após a produção de acordo com a metodologia detalhada abaixo.

3.3.7.1 Preparo dos Ésteres Metílicos

Os ácidos carboxílicos foram derivatizados a ésteres metílicos, por possuírem volatilidade e estabilidade térmica adequadas para serem determinadas por cromatografia a gás. Realizou-se a esterificação no Laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentos (CEPA), na cidade Passo Fundo, Rio Grande do Sul. A gordura extraída foi contida em um algodão e transferida para um tubo de vidro com tampa. Adicionou-se 4 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, para solubilizar a gordura no meio. A seguir, fechou-se o tubo e o conteúdo foi aquecido em banho-maria em temperatura de ebulição por 5 minutos até a total dissolução dos glóbulos de gordura, o tubo foi retirado do banho-maria e resfriado sob água corrente. Então, 5 mL de solução esterificante foram adicionadas ao tubo, o mesmo novamente fechado e aquecido em banho-maria por 5 min. A solução esterificante é composta por cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico, sendo, o metanol o agente esterificante e o ácido sulfúrico o reagente com função de neutralizar a base para a esterificação, garantindo assim, que o processo ocorra. Após este tempo, o tubo foi resfriado e nele adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl, com o objetivo de solvatar a água e deixar a fase orgânica mais disponível, em seguida o tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos. Ao final, adicionou-se ao tubo 5 mL de hexano. O tubo foi novamente agitado vigorosamente e após a separação das fases, a fase orgânica (sobrenadante), onde estão contido os ésteres metílicos, foi retirada. Foi injetado 1 μL de cada amostra no cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas.

3.3.7.2 Análise dos ácidos graxos por cromatografia a gás

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do CEPA, cidade Passo Fundo, Rio Grande do Sul. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada utilizando-se cromatografia à gás acoplada a um espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo GCQT8030. Efetuou-se a separação cromatográfica usando-se uma coluna RTXWAX 25 m x 0,25 mm x 0,25 μm , com a seguinte programação de temperatura: 60 °C

(por 2 min.), aumentando a temperatura em 10 °C/min. até 200°C (0 min.) e em seguida, 5 °C/min. até 240 °C (5 min.). Utilizou-se uma razão de split de 1:50. O gás de arraste utilizado foi o hélio ultrapuro, com vazão de 1,8 mL/min. A temperatura do injetor, da fonte ionização e da interface foi de 250 °C.

3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS QUEIJOS RALADOS PRODUZIDOS COM A NOVA TECNOLOGIA

O projeto foi encaminhado ao comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo, número do parecer 2.642.625, antes da realização da análise sensorial, sendo aprovado pela Comissão de avaliação.

A aplicação dos testes de análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo.

Por se tratar de uma pesquisa com seres humanos, a análise sensorial exigiu o termo de consentimento livre e esclarecido, como apresentado no Apêndice A. Não puderam fazer parte desta pesquisa os participantes alérgicos ao leite. Para isso, utilizou-se uma ficha de avaliação, conforme apresentado no Apêndice B.

O levantamento dos termos descritivos foi realizado por um painel de 15 avaliadores previamente selecionados, utilizando o método rede ou Kelly's Repertory Grid Method segundo Moskowitz (1983). Foram utilizadas as amostras de queijo ralado controle e queijo ralado tratado com O₃ para representar a variação entre as amostras a serem analisadas posteriormente, devido a diferenças quanto às características sensoriais.

As amostras foram apresentadas em pares aos avaliadores. Solicitou-se para que descrevessem as similaridades e diferenças percebidas entre as amostras com relação à aparência e cor, aroma, sabor e textura. Após o levantamento dos termos descritivos pelo método de rede e de acordo com o consenso da equipe, foi elaborada uma lista de termos que melhor caracterizava as amostras. A lista com os termos foi utilizada para a aplicação da metodologia CATA (*Check All That Apply*) ou marque tudo que se aplica.

Os consumidores, totalizando 50, receberam as amostras das 5 formulações de queijo ralado (queijo Tipo Grana ralado: amostra controle com 13 % de umidade, amostra tratada com O₃ com 15 % de umidade e amostra sem tratamento com O₃ com 15 % de umidade; queijo Parmesão ralado: amostra controle com 13 % de umidade, amostra tratada com O₃ com 15 % de umidade e amostra sem tratamento com O₃ com 15 % de umidade), de forma monádica, aleatorizadas e codificadas, utilizando luz branca, e uma ficha (Apêndice C) para avaliar os 2

testes propostos, sendo, aceitabilidade e CATA. Entre cada amostra, foi disponibilizada água para os participantes realizarem a limpeza da cavidade oral.

A lista com os atributos sensoriais foi utilizada para os consumidores selecionarem o que caracterizava a amostra, de forma fácil e rápida (ARES et al., 2014).

A aceitabilidade é um teste afetivo que expressa o quanto o consumidor gostou ou desgostou da amostra. O teste foi aplicado utilizando uma escala hedônica, balanceada com o mesmo número de categorias positivas e negativas. A consideração de aceitabilidade da amostra foi com índice de aceitabilidade igual ou superior a 70 % (DUTCOSKY, 1996).

O índice de aceitabilidade foi calculado utilizando a Equação 1.

$$IA (\%) = A \times \frac{100}{B} \quad (3)$$

Em que:

A = nota média obtida para o produto;

B = nota máxima dada ao produto.

3.4.1 Tratamento dos dados

Os resultados obtidos neste estudo foram avaliados ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95 %.

O índice de aceitabilidade foi calculado para todos os atributos avaliados. A análise dos dados obtidas com a metodologia CATA foi realizada através de análise estatística multivariada (Análise de Componentes Principais) utilizando o Programa *Statistica 7.0*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

Os queijos Tipo Grana e Parmesão foram caracterizados conforme mostram as Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Resultados físico-químicos das matérias-primas

Parâmetro	Queijo Tipo Grana	Queijo Parmesão
Gordura (g/100 g)	30 ± 1	33 ± 1
Umidade (g/100 g)	31 ± 1	32 ± 1
Atividade de água	0,913 ± 0,022	0,930 ± 0,021
pH	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1
Gordura do extrato seco (g/100 g)	43 ± 1	48 ± 1

Resultados de média ± desvio padrão

Tabela 10 - Composição e quantificação de ácidos graxos presentes no queijo Tipo Grana e Queijo Parmesão

Ácidos graxos saturados		Quantidade % (g/100 gordura)	
Simbologia	Nomenclatura	Queijo Tipo Grana	Queijo Parmesão
C12:0	Ácido láurico	0,29 ± 0,41	0,70 ± 0,25
C14:0	Ácido mirístico	5,27 ± 0,33	7,27 ± 0,27
C16:0	Ácido palmítico	33,91 ± 0,24	36,24 ± 1,09
C18:0	Ácido esteárico	17,74 ± 0,49	16,44 ± 1,09
Total de ácidos graxos saturados		57,21 ± 0,37	60,65 ± 0,67
Ácidos graxos insaturados		Quantidade % (g/100 gordura)	
C16:1	Ácido palmitoléico	1,12 ± 0,08	1,46 ± 0,48
C18:1	Ácido oléico	37,13 ± 0,23	33,72 ± 1,62
C18:1 TRANS	Ácido eláidico	1,17 ± 0,02	0,54 ± 0,18
C18:2	Ácido linoleico	3,37 ± 0,09	3,64 ± 0,17
Total de ácidos graxos insaturados		42,79 ± 0,10	39,35 ± 0,61

Resultados de média ± desvio padrão

Analisando os resultados físico-químicos das matérias primas, pode-se observar que o queijo Parmesão possui um teor de umidade e gordura mais elevados do que para o queijo Tipo Grana e que consecutivamente a gordura no extrato seco também é maior.

Pode ser observado na Tabela 6 que a composição e quantificação de ácidos graxos no queijo Tipo Grana e no queijo Parmesão diferem, sendo o somatório de ácidos graxos saturados superior para o queijo Parmesão com 60,65 % e 57,21 % no queijo Tipo Grana e diferentemente em relação aos ácidos graxos insaturados, onde temos o somatório dos ácidos graxos superior para o Queijo Tipo Grana com 42,79 % e 39,35 % para o queijo Parmesão.

Isto pode ser explicado devido as diferenças produtivas e de maturação que cada tipo de queijo possui. O queijo Tipo Grana é produzido com leite de altíssima qualidade tanto em requisitos microbiológicos quanto físico-químicos, com contagens totais muito baixas e requisitos de gordura e proteínas rigorosamente controlados quando comparado ao leite utilizado para produção do queijo Parmesão. Na produção do queijo Tipo Grana o leite utilizado é cru e semidesnatado, não passando pelo processo de pasteurização como ocorre para o queijo Parmesão, por isso a exigência é que o leite tenha uma altíssima qualidade, já que não ocorre nenhum tipo de tratamento térmico posterior.

O leite utilizado na produção de queijo Parmesão possui um teor de gordura inicial mais elevado do que o teor de gordura do leite utilizado para a produção do queijo Tipo Grana, já que o leite para a produção do queijo Parmesão passa pelo processo de pasteurização, e neste caso o teor de gordura mais elevado não acarretará em defeitos internos como poderia ocorrer no queijo Tipo Grana e claro, no queijo Parmesão o teor de gordura mais elevado também fornece um melhor sabor ao produto final. Isto justifica também o teor de gorduras saturadas ser mais elevado no queijo Parmesão.

Outro fator que os diferencia é o tamanho das peças de queijos, onde as de queijo Tipo Grana pesam em média 35 kg e as de queijo Parmesão pesam em média 7 kg. Além da diferença entre o tamanho dos queijos, o tempo de maturação também difere. De acordo com a Portaria nº 353/1997 (BRASIL, 1997) que aprova o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de queijos, têm-se que os queijos devem ser maturados pelo tempo necessário para a obtenção das suas características específicas, ou seja, um tempo de maturação mínimo de 6 meses para queijos com peso de 4 a 10 kg, que é o caso do queijo Parmesão e uma maturação mínima de 12 meses para os queijos com peso superior a 20 kg, que é o caso do queijo Tipo Grana.

No geral, quanto maior o tempo de maturação, mais firme o queijo ficará e mais intenso fica o seu aroma e sabor. No processo de maturação ocorrem diversas reações químicas, dentre elas a lipólise, que é a quebra dos lipídeos os quais conferem o sabor e aroma finais do queijo. O tempo de maturação leva à modificação dos ácidos graxos presentes nos queijos, em função do processo fermentativo natural em culturas lácticas distintas presentes em cada tipo de queijo.

Para Thierry et al. (2017) a lipólise e o catabolismo de ácidos graxos são processos chave da maturação, que geram compostos de sabor considerados importantes para maioria das variedades de queijos curados. Mesmo em queijos com baixos níveis de lipólise, os ácidos graxos livres são geralmente percebidos e podem ser responsáveis pelo equilíbrio de sabor esperado ou por sabores que caracterizam defeitos no queijo, dependendo da concentração de ácidos graxos e a variedade do queijo. Apesar da importância da lipólise, seus mecanismos têm sido menos estudados do que os da proteólise, e requerem trabalhos adicionais para caracterizar as enzimas envolvidas e principais fatores que influenciam sua atividade.

De acordo com Malacarne et al. (2009) a lipólise da gordura do leite no queijo em maturação produz ácidos graxos que contribuem diretamente para o sabor do queijo, ácidos graxos específicos transmitem notas de sabor, ou indiretamente como precursores para a formação de outros compostos de sabor. No caso dos queijos duros, os ácidos graxos livres são contribuintes significativos para o sabor.

4.2 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO SÓRBICO SOBRE A CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados de teor residual de ácido sórbico nos queijos ralados, com análise realizada no tempo zero nos 10 experimentos.

Tabela 11 - Análise da concentração de ácido sórbico residual em queijos ralados

Concentração adicionada de ácido sórbico (%)	Experimento	Concentração residual de ácido sórbico (%) em queijo Tipo Grana ralado	Experimento	Concentração residual de ácido sórbico (%) em queijo Parmesão ralado
0	A1	0	A6	0
0,05	A2	0,01 ± 0,00	A7	0,02 ± 0,00
0,10	A3	0,05 ± 0,01	A8	0,05 ± 0,01
0,15	A4	0,10 ± 0,01	A9	0,09 ± 0,01
0,20	A5	0,15 ± 0,02	A10	0,16 ± 0,02

Resultados de média ± desvio padrão

Observa-se que em todos os experimentos a quantidade residual de ácido sórbico foi inferior à adicionada em função da decomposição do ácido sórbico. De acordo com a Portaria nº 357 de 1997 (BRASIL, 1997) é permitida a adição do conservador ácido sórbico em formulações de queijos ralados a uma concentração máxima de 0,1 %, portanto esta questão também deve ser levada em consideração no momento da formulação dos queijos ralados.

As análises físico-químicas de umidade, gordura e atividade de água seguem apresentadas na Tabela 12. Pode-se perceber que o padrão de umidade trabalho na etapa 1 foi de $19\% \pm 1\%$ e percentual de gordura de acordo com cada tipo de queijo.

Tabela 12 - Análises físico-químicas dos queijos ralados

Experimentos	Umidade (%)	Gordura (%)	Aw
A1	$19,22 \pm 0,03^a$	$34,00 \pm 0,92^a$	$0,793 \pm 0,000^{bc}$
A2	$19,75 \pm 0,06^a$	$33,99 \pm 0,54^a$	$0,794 \pm 0,020^c$
A3	$18,92 \pm 0,08^a$	$34,05 \pm 0,43^a$	$0,790 \pm 0,000^a$
A4	$19,54 \pm 0,04^a$	$34,21 \pm 0,89^a$	$0,765 \pm 0,010^d$
A5	$19,32 \pm 0,05^a$	$34,99 \pm 0,54^a$	$0,791 \pm 0,035^a$
A6	$19,27 \pm 0,05^a$	$35,70 \pm 0,56^a$	$0,808 \pm 0,010^f$
A7	$19,26 \pm 0,06^a$	$35,64 \pm 0,45^a$	$0,791 \pm 0,081^{ab}$
A8	$19,33 \pm 0,04^a$	$35,30 \pm 0,89^a$	$0,791 \pm 0,066^a$
A9	$19,78 \pm 0,02^a$	$35,33 \pm 0,61^a$	$0,790 \pm 0,012^a$
A10	$19,45 \pm 0,07^a$	$36,00 \pm 0,32^a$	$0,803 \pm 0,099^e$

Resultados de média \pm desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto a avaliação da estabilidade microbiológica dos queijos ralados frente as diferentes concentrações do conservador ácido sórbico, pode-se observar nas Figuras 10 e 11 os resultados obtidos nas análises ao longo da vida de prateleira dos queijos ralados.

Figura 10 - Avaliação da estabilidade microbiológica do queijo Tipo Grana ralado

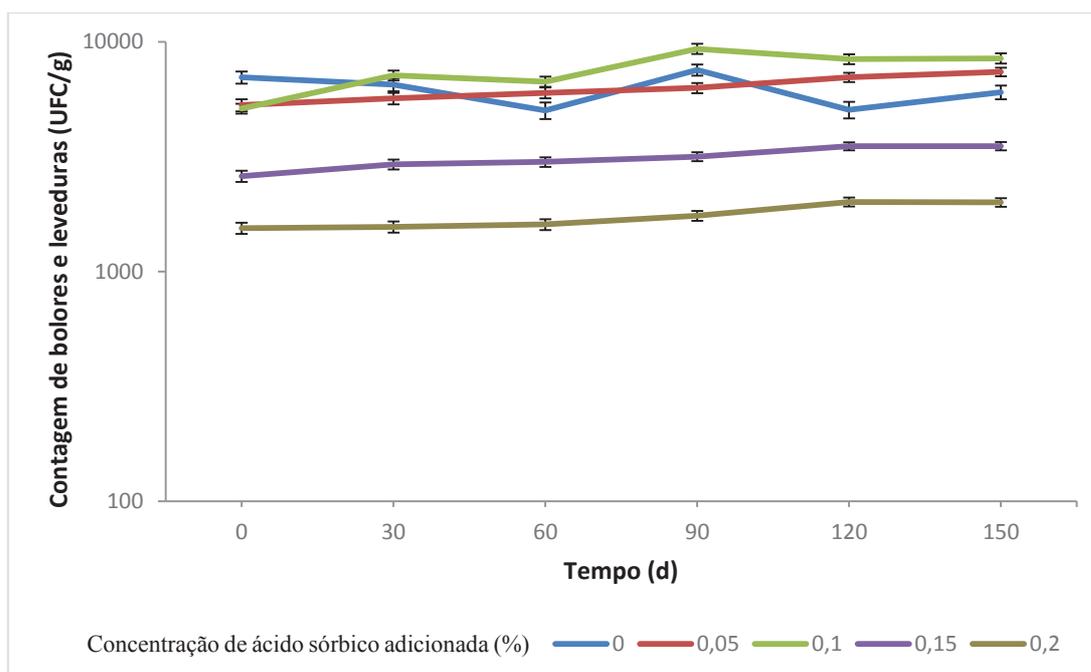
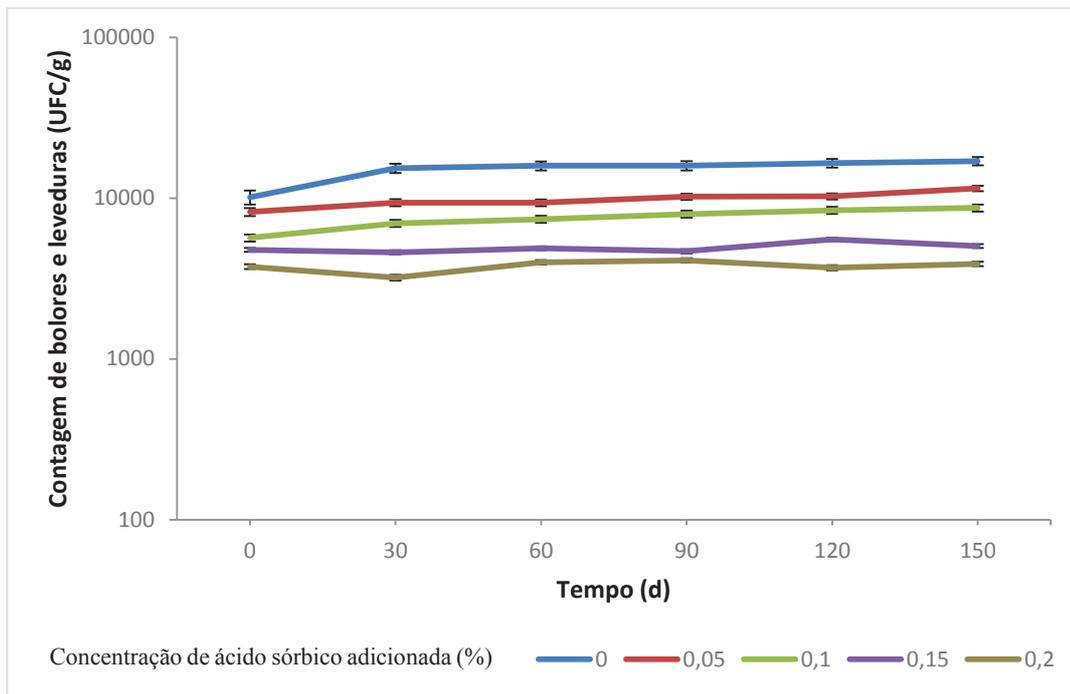


Figura 11 - Avaliação da estabilidade microbiológica do queijo Parmesão ralado



Analisando os queijos Tipo Grana e Parmesão ralados deste estudo, desidratados a uma umidade final média de 19 %, frente à aplicação do conservador ácido sórbico em diversas concentrações, pode-se observar que não é possível atingir uma estabilidade microbiológica dentro dos padrões legais.

No regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos ralados Portaria nº 357 de 1997 (BRASIL, 1997) têm-se que o padrão máximo de adição do conservador ácido sórbico em formulações de queijo ralado é de 0,1 % e o padrão máximo para bolores e leveduras é de 5.000 UFC/g. De acordo com as análises realizadas nesta etapa 1 somente foi possível obter uma estabilidade microbiológica do queijo ralado com umidade média de 19 % com o teor de ácido sórbico acima de 0,15 %, e ainda assim apresentando um crescimento de bolores e leveduras muito próximo ao limite máximo aceitável.

Isto ocorre pois, quando se trabalha com uma atividade de água superior a 0,70 as chances de deterioração do produto em um curto período de tempo são muito grandes, que foi o que ocorreu com os 10 experimentos (A). Com a gordura, umidade e atividade de água trabalhadas nestes experimentos não foi possível garantir uma estabilidade microbiológica com a adição do conservador dentro dos padrões que a legislação estabelece para queijos ralados.

De acordo com os resultados apresentados na etapa 1, onde foi possível obter uma estabilidade microbiológica somente com 0,15 %, optou-se em trabalhar na Etapa 3 com as concentrações de ácido sórbico de 0,05 % e 0,08 % as quais são concentrações que atendem a

legislação de formulações para queijos ralados, sendo que na etapa 3 o ácido sórbico será aliado ao O₃

4.3 ETAPA 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OZÔNIO SOBRE A CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO.

Em cada experimento foram realizadas análises de gordura, umidade, atividade de água e rancidez oxidativa no tempo zero, os quais apresentaram os resultados em média na Tabela 9 e 10. Pode-se observar que foi trabalhado com o queijo ralado a uma umidade média de 19 % \pm 1 %, sendo esta considerada a umidade ideal para a indústria produtora de queijo ralado desidratado, já que a Portaria n° 357 de 1997 (BRASIL, 1997) fixa o limite máximo de umidade para queijos ralados desidratados em até 20 %, e a uma umidade de 19 %, é possível manter um queijo ralado mais macio e saboroso, e também sem tantas perdas financeiras com o processo de desidratação.

Pode-se observar na Tabela 12 que ao realizar a desidratação do queijo ralado a gordura aumenta em torno de 3 % para ambos os queijos ralados, isto ocorre porque ao realizar a desidratação do queijo ralado a gordura se concentra.

Tabela 13 - Análises físico-químicas para queijo Parmesão ralado e queijo Tipo Grana ralado

Análise	Antes da desidratação		Após a desidratação	
	Queijo Parmesão ralado	Queijo Tipo Grana Ralado	Queijo Parmesão ralado	Queijo Tipo Grana Ralado
Gordura (g/100 g)	33,02 \pm 0,84 ^c	29,28 \pm 0,33 ^a	36,00 \pm 1,19 ^d	32,99 \pm 0,53 ^b
Umidade (g/100 g)	31,71 \pm 1,58 ^b	30,98 \pm 1,23 ^b	19,27 \pm 0,83 ^a	19,25 \pm 0,48 ^a
AW	0,891 \pm 0,010 ^d	0,882 \pm 0,010 ^c	0,795 \pm 0,011 ^b	0,793 \pm 0,00 ^d

Resultados de média \pm desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

Em relação a alteração química nos queijos ralados, foram realizadas as análises de rancidez oxidativa no tempo zero, as quais apresentaram resultado negativo para todas as análises, conforme pode ser observado na Tabela 14. A análise de rancidez oxidativa foi realizada nos queijos ralados antes do processo de desidratação e após a desidratação com adição de O₃, representando assim que a injeção do O₃ na etapa de desidratação e resfriamento do queijo ralado não provocou oxidação nos lipídeos ali presentes.

Tabela 14 - Análise de Rancidez Oxidativa em queijos ralados após o tratamento com O₃

Experimento	Etapa de aplicação do processo de desidratação	Produção de O ₃ (mg de O ₃ / kg de queijo desidratado)	Rancidez Oxidativa Queijo Tipo Grana ralado	Rancidez Oxidativa Queijo Parmesão ralado
B1	10 minutos durante aquecimento	0	negativo	negativo
B2		9	negativo	negativo
B3		23	negativo	negativo
B4		31	negativo	negativo
B5		38	negativo	negativo
B6	3 minutos finais durante resfriamento	0	negativo	negativo
B7		3	negativo	negativo
B8		7	negativo	negativo
B9		9	negativo	negativo
B10		11	negativo	negativo

Os resultados dos testes microbiológicos realizados na etapa 2 para os queijos Tipo Grana e Parmesão ralados analisados no tempo zero, seguem apresentados nas Figuras 12, 13, 15 e 15. Pode-se observar que a contaminação inicial do queijo Parmesão ralado foi em média superior a contaminação do queijo Tipo Grana ralado, mas mesmo assim puderam ser observados níveis de redução de bolores e leveduras de até 99 % para ambos os queijos.

Figura 12 - Avaliação microbiológica de queijo Parmesão ralado antes e após tratamento com O₃ na etapa da desidratação (10 minutos durante o aquecimento)

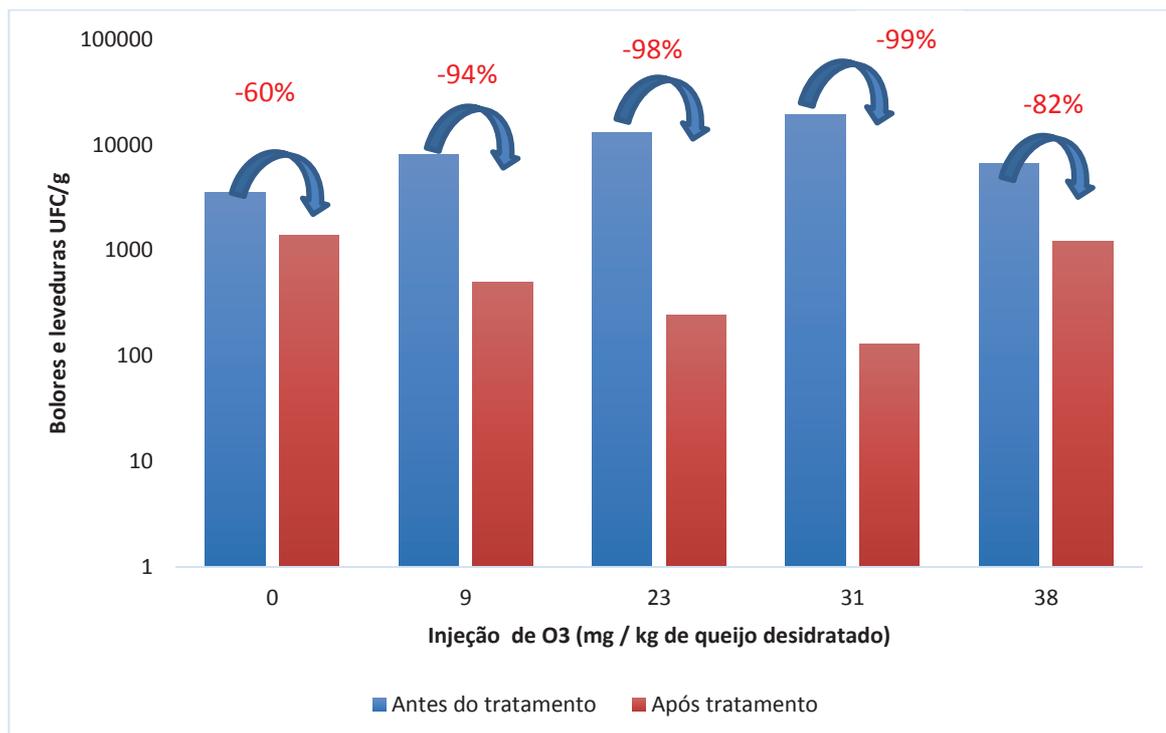


Figura 13 - Avaliação microbiológica de queijo Parmesão ralado antes e após tratamento com O₃ na etapa de resfriamento (3 minutos finais durante resfriamento)

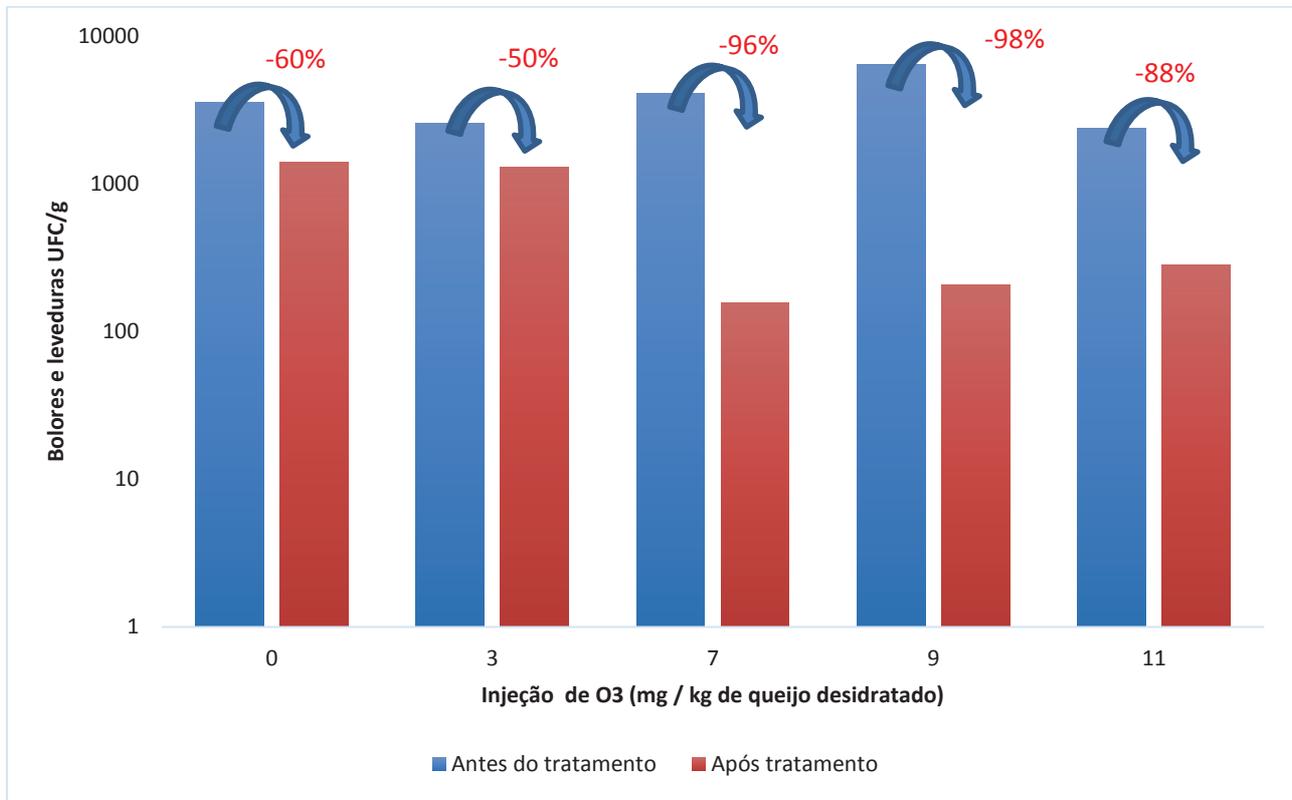


Figura 14 - Avaliação microbiológica de queijo Tipo Grana ralado antes e após tratamento com O₃ na etapa da desidratação (10 minutos durante aquecimento)

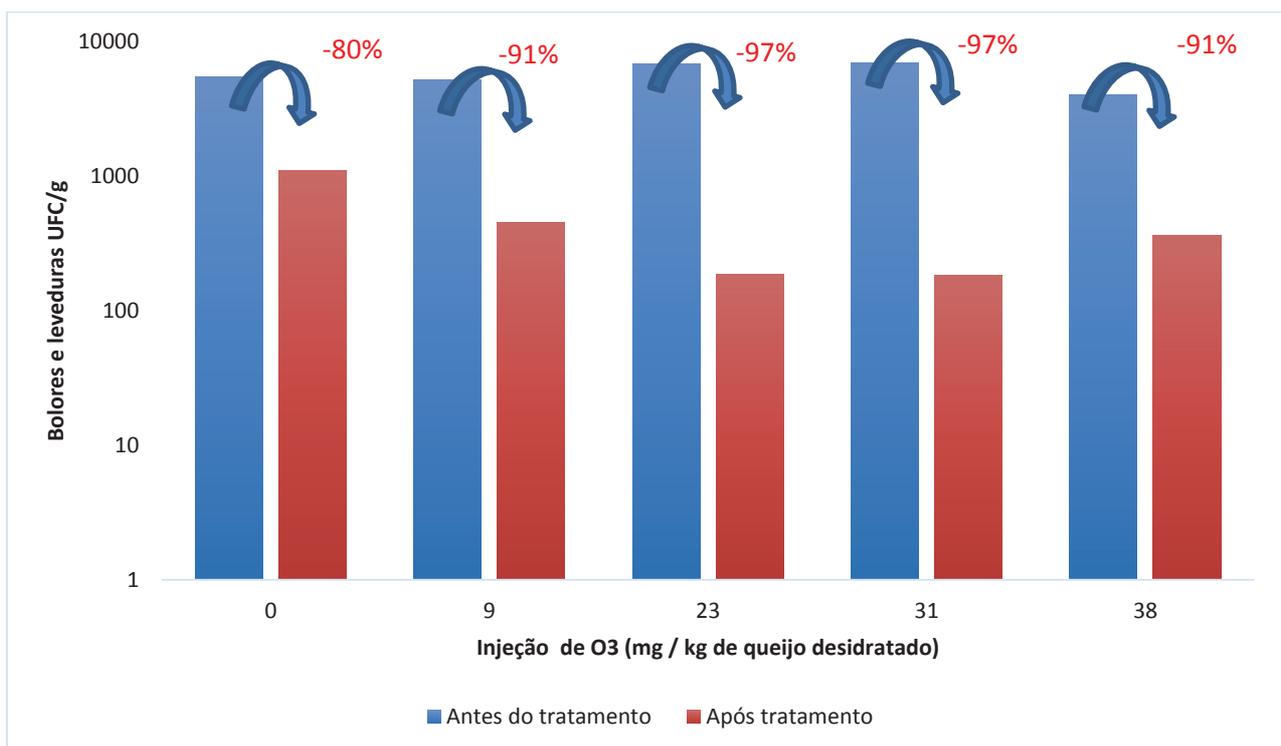
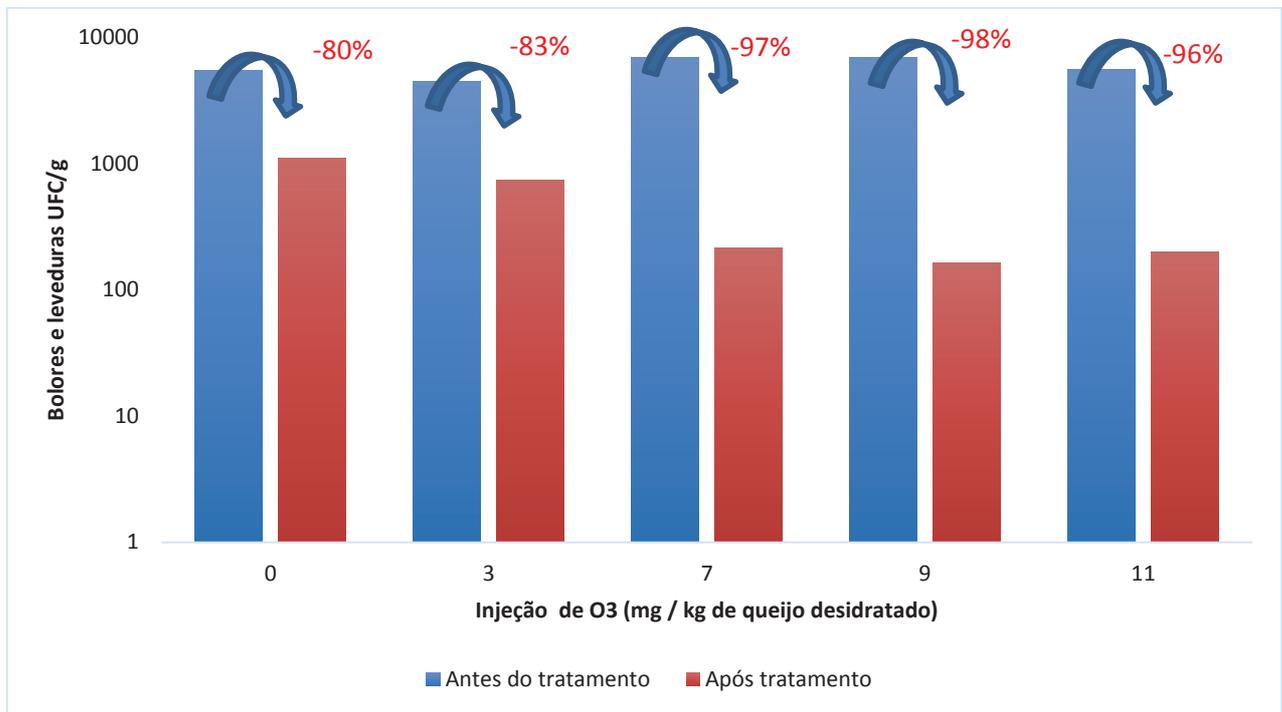


Figura 15 - Avaliação microbiológica de queijo Tipo Grana ralado antes e após tratamento com O₃ na etapa de resfriamento (3 minutos finais durante resfriamento)



Observando as amostras com 0 mg O₃/ kg de queijo ralado a qual representa os queijos ralados desidratados sem a adição do O₃ percebe-se que somente a etapa de desidratação do queijo ralado já foi responsável pela redução de 60 % a 80 % dos bolores e leveduras presentes no queijo ralado, já que a desidratação do queijo ralado reduz a umidade e atividade de água do produto e expõe os microrganismos a uma temperatura de 65 °C por um período aproximado de 20 minutos.

Os testes de injeção de O₃ foram realizados em duas etapas diferentes da desidratação dos queijos ralados. No primeiro caso o O₃ foi adicionado durante os 10 minutos iniciais do processo de desidratação dos queijos ralados e no segundo caso o O₃ foi adicionado nos 3 minutos finais do processo de desidratação, onde ocorre o resfriamento do queijo ralado, não havendo assim a interferência do calor no processo de injeção de O₃, e assim sendo possível um comparativo se o calor de 65 °C no processo de desidratação interfere na eficiência do O₃.

A uma injeção de 7 mg O₃/ kg de queijo desidratado, já pôde ser percebida uma redução de 96 % dos bolores e leveduras. A redução máxima de bolores e leveduras deu-se a uma aplicação de 31 mg O₃/ kg de queijo desidratado na etapa de desidratação, durante 10 minutos, a qual foi de 99 % para o queijo Parmesão ralado e 97 % para o queijo Tipo Grana ralado e

também a uma aplicação de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento, durante 3 minutos, a qual foi de 98 % para o queijo Parmesão ralado e para o queijo Tipo Grana Ralado.

Pode-se observar que os resultados de redução de bolores e leveduras a uma exposição de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento foi mais eficiente, onde a quantidade de O₃ por kg de queijo foi menor e o tempo também, somente 3 minutos, sendo que a 31 mg O₃ / kg de queijo desidratado o produto ficou exposto por 10 minutos e obteve o resultado muito similar e a 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de desidratação o percentual foi menor, 94 % para o queijo Parmesão ralado e 91 % para o queijo Tipo Grana ralado.

Os resultados apresentados a uma injeção de O₃ a 11 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 38 mg O₃ / kg de queijo desidratado ficaram com uma redução de bolores e leveduras abaixo do que para as injeções 31 mg O₃ / kg de queijo desidratado; 23 mg O₃ / kg de queijo desidratado; 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado, isto se deu provavelmente porque tivemos neste caso uma menor produção de O₃ do que o informado pelo equipamento (11 mg O₃ / kg de queijo e 38 mg O₃ / kg de queijo).

De acordo com outros autores, Wickramanayake (1991), Serra et al. (2003), Lanita e Silva (2008), Pinto et al. (2007), Alexopoulos et al. (2017), que avaliaram em suas pesquisas a redução de bolores e leveduras com a aplicação do O₃, se os fatores de tempo e concentração de O₃ estiverem configurados corretamente, a ozonização pode ser uma abordagem promissora salvaguardando a produção de produtos alimentícios, onde em suas pesquisas houveram grandes reduções de contagens de bolores e leveduras, conforme esta pesquisa apresentou também.

Quando o produto completou 30 dias de validade foi realizada a análise de bolores e leveduras, porém os resultados para os dois tipos de queijos e em todas as concentrações testadas foram muito elevados e na análise dos queijos já percebeu-se a presença de mofo visual. Sendo assim, a análise da estabilidade microbiológica desta etapa encerrou-se nos 30 dias de estocagem do produto visto que não houve estabilidade microbiológica ao longo do tempo de prateleira.

Ao finalizar a etapa 2, têm-se que ao analisar somente o tempo zero, a 23 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado, já é possível obter uma grande redução de bolores e leveduras, tanto na etapa de desidratação do queijo ralado, onde houve uma exposição durante 10 minutos, quanto na etapa de resfriamento, onde houve uma exposição durante 3 minutos. Se levado em consideração o tempo de exposição, a etapa de resfriamento

apresentou os melhores resultados, sendo que a 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado por 3 minutos ocorreu uma redução mínima de 96 % em ambos os queijos ralados.

Ou seja, a adição do O₃ na etapa de desidratação do queijo ralado é influenciada pelo calor de 65 °C pois, as moléculas de O₃ podem sofrer uma degradação a esta temperatura e voltar a sua forma de oxigênio, conforme outros autores mencionam no caso do O₃ em meio aquoso, quanto maior a temperatura, maior a degradação do O₃. Outro fator é que a etapa de desidratação do queijo ralado é responsável por uma redução média de 70 % dos bolores e leveduras presentes nos queijos ralados sem a ação do ácido sórbico ou O₃.

Embora tenha-se observado uma redução de bolores e leveduras de até 99 % no tempo zero, quando observamos o produto armazenado em teste de prateleira o crescimento de bolores e leveduras foi exponencial, não havendo nenhuma estabilidade microbiológica com o passar do tempo. Com isso é possível dizer que o O₃ age momentaneamente na redução dos bolores e leveduras, mas que, para manter a estabilidade microbiológica dos queijos ralados ao longo da vida de prateleira é necessário um outro agente antimicrobiano na formulação, neste caso o ácido sórbico, que é o conservador permitido em queijo ralados.

Com o experimento de exposição do queijo ralado ao O₃ em um menor tempo as chances de alterações químicas reduzem também, já que as exposições a grandes fatores de oxidação são reduzidas. Para dar sequência na etapa 3 a concentração de ozônio escolhida foi 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa do resfriamento durante 3 minutos.

4.4 ETAPA 3: CONSERVAÇÃO DO QUEIJO RALADO COM O USO DE O₃ E ÁCIDO SÓRBICO

4.4.1 Análises físico-químicas

Após a produção dos experimentos de queijos ralados com as formulações determinadas, foram realizadas análises de umidade, gordura, atividade de água e teor residual de ácido sórbico conforme podem ser observadas na tabela 15.

As amostras de queijo ralado padrão apresentaram umidade de aproximadamente 13 % e as demais em média de 19 %. O resultado da análise de gordura variou de acordo com o tipo de queijo e o resultado final de umidade. A atividade de água variou de 0,692 a 0,824 de acordo com a amostra analisada. Para a análise do teor residual de ácido sórbico, novamente nota-se

um residual inferior ao adicionado na formulação, isto ocorre devido a decomposição deste ácido no processo e também devido a perdas de processo (residual que fica nos equipamentos).

Tabela 15 - Análises físico-químicas queijos ralados

Experimento	Umidade (%)	Gordura (%)	Aw	Teor residual de ácido sórbico (%)
C1	13,47 ± 0,02 ^d	36,2 ± 0,76 ^{ab}	0,692 ± 0,030 ^c	0,05 ± 0,01 ^a
C2	18,06 ± 0,09 ^e	33,7 ± 0,57 ^{cd}	0,771 ± 0,000 ^b	0,02 ± 0,00 ^b
C3	18,77 ± 0,01 ^a	33,2 ± 0,29 ^e	0,744 ± 0,012 ^g	0,05 ± 0,02 ^a
C4	18,80 ± 0,06 ^a	33,9 ± 0,60 ^d	0,730 ± 0,012 ^f	0,03 ± 0,01 ^b
C5	18,78 ± 0,09 ^a	33,5 ± 0,30 ^c	0,720 ± 0,000 ^e	0,06 ± 0,01 ^a
C6	13,22 ± 0,03 ^c	38,1 ± 0,55 ^f	0,701 ± 0,011 ^d	0,05 ± 0,02 ^a
C7	19,99 ± 0,09 ^g	36,4 ± 0,60 ^b	0,824 ± 0,000 ^b	0,02 ± 0,02 ^b
C8	19,76 ± 0,08 ^f	36,2 ± 0,30 ^{ab}	0,810 ± 0,000 ^a	0,06 ± 0,02 ^a
C9	19,58 ± 0,01 ^b	36,0 ± 0,22 ^a	0,821 ± 0,000 ^b	0,02 ± 0,01 ^b
C10	19,51 ± 0,01 ^b	35,9 ± 0,43 ^a	0,803 ± 0,000 ^a	0,05 ± 0,01 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).; C1 – Queijo Tipo Grana ralado padrão com 0,08 % de ácido sórbico e 13 % de umidade; C2 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,05 % de ácido sórbico com tratamento de O₃ e 19 % de umidade; C3 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico com tratamento de O₃ e 19 % de umidade; C4 - Queijo Tipo Grana ralado com 0,05 % de ácido sórbico sem tratamento de O₃ com 19 % de umidade; C5 - Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento de O₃ com 19 % de umidade; C6 – Queijo Parmesão ralado padrão com 0,08 % de ácido sórbico e 13 % de umidade; C7 – Queijo Parmesão ralado com 0,05 % de ácido sórbico com tratamento de O₃ e 19 % de umidade; C8 – Queijo Parmesão ralado com 0,08 % de ácido sórbico com tratamento de O₃ e 19 % de umidade; C9 - Queijo Parmesão ralado com 0,05 % de ácido sórbico sem tratamento de O₃ e 19 % de umidade; C10 - Queijo Parmesão ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento de O₃ e 19 % de umidade.

4.4.2 Análise de estabilidade microbiológica

As análises de bolores e leveduras podem ser observadas nas Tabelas 16 e 17. Ao longo do tempo de prateleira, foram realizadas análises de bolores e leveduras dos experimentos para avaliação da estabilidade microbiológica. Porém, o teste de prateleira foi encerrado aos 90 dias para os experimentos C1 a C5 e aos 30 dias para os experimentos C6 a C10 devido ao elevado crescimento de bolores e leveduras, sendo que estes crescimentos puderam ser notados visualmente.

Para o queijo Tipo Grana ralado pôde ser observada uma estabilidade microbiológica até o tempo 60 dias, já no tempo 90 dias houve um elevado crescimento de bolores e leveduras inclusive podendo ser verificada a presença de bolores visualmente no queijo ralado. O teste de

prateleira para este produto encerrou-se nos 90 dias devido ao produto estar apresentando sinais visuais de deterioração e sendo assim inviável a continuidade dos testes.

Tabela 16 - Análise de bolores e leveduras queijo Tipo Grana ralado

Experimento	Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)			
	0d	30d	60d	90d
C1	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
C2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^6$
C3	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^5$
C4	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^8$
C5	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^6$

Resultados de média \pm desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); C1 – Queijo Tipo Grana ralado padrão com 0,08 % de ácido sórbico e 13 % de umidade; C2 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,05 % de ácido sórbico com tratamento de O_3 e 19 % de umidade; C3 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico com tratamento de O_3 e 19 % de umidade; C4 - Queijo Tipo Grana ralado com 0,05 % de ácido sórbico sem tratamento de O_3 com 19 % de umidade; C5 - Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento de O_3 com 19 % de umidade.

Tabela 17 - Análise de bolores e leveduras queijo Parmesão ralado

Experimento	Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)	
	0d	30d
C6	$2,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$
C7	$1,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
C8	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
C9	$1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^5$
C10	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$

C6 – Queijo Parmesão ralado padrão com 0,08 % de ácido sórbico e 13 % de umidade; C7 – Queijo Parmesão ralado com 0,05 % de ácido sórbico com tratamento de O_3 e 19 % de umidade; C8 – Queijo Parmesão ralado com 0,08 % de ácido sórbico com tratamento de O_3 e 19 % de umidade; C9 - Queijo Parmesão ralado com 0,05 % de ácido sórbico sem tratamento de O_3 e 19 % de umidade; C10 - Queijo Parmesão ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento de O_3 e 19 % de umidade.

Para o queijo Parmesão ralado no primeiro teste de prateleira aos 30 dias já pôde ser observado um elevado crescimento de bolores e leveduras e podendo ser verificada a presença de bolores visualmente no queijo ralado. O teste de prateleira para este produto encerrou-se nos 30 dias devido ao produto estar apresentando sinais de deterioração e sendo assim inviável a continuidade dos testes.

Esperava-se que com a combinação do ácido sórbico e O₃ fosse possível trabalhar com os queijos ralados a uma umidade média de 19 % ± 1 % sem o crescimento de bolores e leveduras ao longo da vida de prateleira e ainda sendo possível trabalhar com o conservador ácido sórbico em concentrações dentro da legislação e reduzidas, porém conforme os dados observados nas Tabelas 14 e 15 os resultados não foram satisfatórios devido ao rápido e elevado crescimento de bolores e leveduras.

Mesmo com a atuação do O₃ agindo consideravelmente na redução dos bolores e leveduras no tempo zero, o conservador ácido sórbico nas concentrações de 0,05 % e 0,08 % não foi suficiente para manter uma estabilidade microbiológica dos queijos ralados no decorrer do tempo de 150 dias prateleira, o qual é a validade estipulada para este tipo de produto. Isto ocorreu devido à elevada atividade de água do produto, sendo próxima a 0,8 a qual favoreceu o crescimento de algumas cepas de bolores e leveduras que resistiram a ação do O₃, e decorrido o tempo de adaptação dos microrganismos as contagens foram muito elevadas, e já apresentando sinais visuais de deterioração.

Como estes experimentos não apresentaram resultados satisfatórios, repetiram-se os experimentos com novas formulações.

4.4.3 Análises físico-químicas

Após a produção dos novos experimentos de queijos ralados com as formulações determinadas, foram realizadas análises de umidade, gordura e atividade de água, conforme podem ser observadas na tabela 18.

Tabela 18 - Análise físico-química queijos ralados

Formulação	Umidade (%)	Gordura (%)	Aw	Teor residual de ácido sórbico (%)
C11	13,20 ± 0,01 ^a	37,9 ± 0,34 ^c	0,681 ± 0,010 ^b	0,06 ± 0,01 ^a
C12	15,12 ± 0,09 ^b	36,2 ± 0,10 ^d	0,702 ± 0,000 ^d	0,06 ± 0,01 ^a
C13	15,00 ± 0,01 ^b	36,4 ± 0,34 ^d	0,712 ± 0,010 ^c	0,05 ± 0,01 ^a
C14	13,10 ± 0,02 ^a	35,5 ± 0,87 ^b	0,691 ± 0,010 ^c	0,06 ± 0,01 ^a
C15	16,56 ± 0,06 ^c	34,1 ± 0,27 ^a	0,720 ± 0,010 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
C16	16,21 ± 0,05 ^c	34,6 ± 0,39 ^a	0,720 ± 0,000 ^a	0,06 ± 0,01 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

Pode-se observar que os experimentos de queijo ralado padrão mantiveram a umidade em média de 13 % e os demais experimentos a uma umidade mais próxima de 15 %, que foi a umidade reduzida dos experimentos anteriores. A atividade de água ficou próxima a 0,7.

4.4.4 Análise de estabilidade microbiológica

Ao longo do tempo de prateleira, que são 150 dias, foram realizadas análises de bolores e leveduras dos novos experimentos para avaliação da estabilidade microbiológica. As análises de bolores e leveduras podem ser observadas nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Análise de bolores e leveduras queijo Tipo Grana Ralado

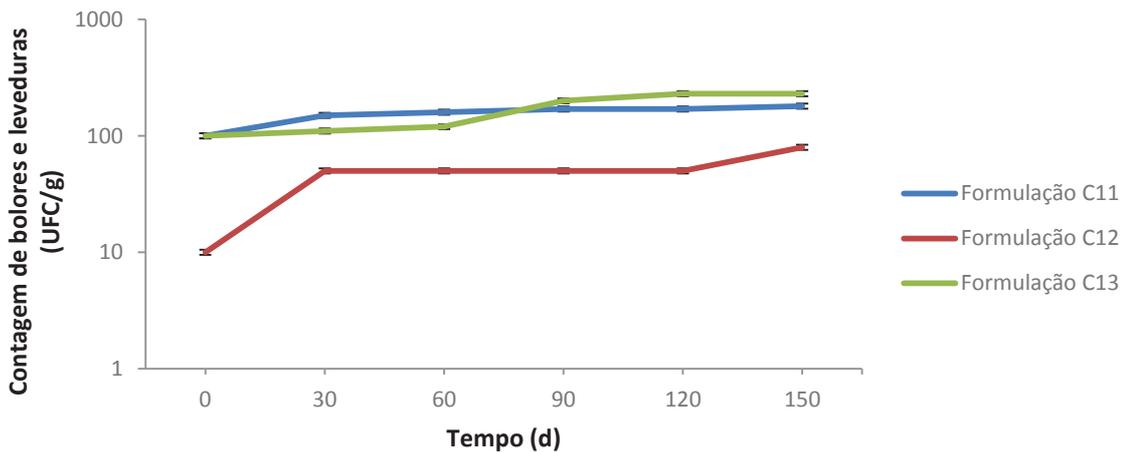
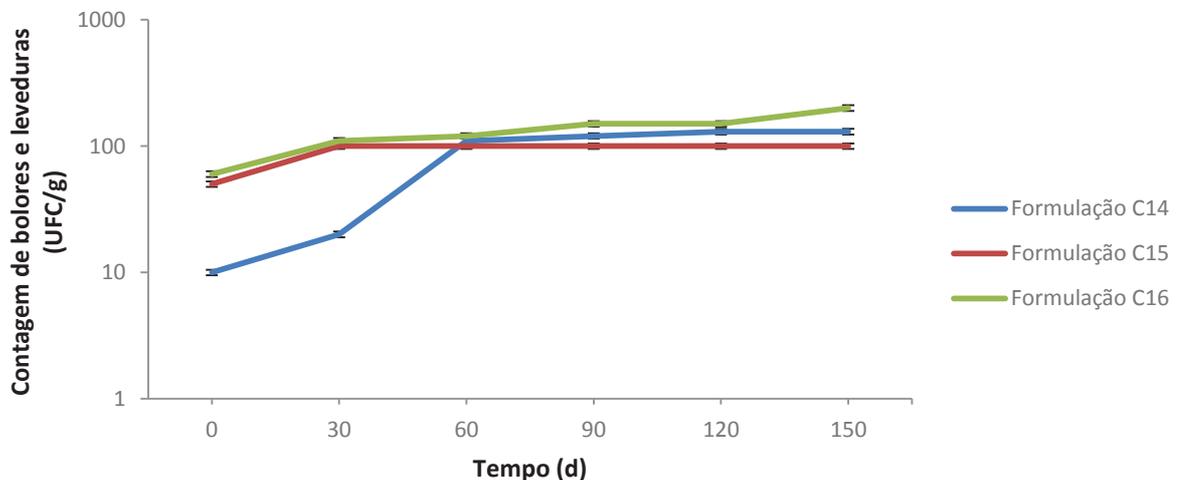


Figura 17 - Análise de bolores e leveduras queijo Parmesão ralado



É possível perceber o surgimento de uma estabilidade microbiológica em todas as formulações. Nas formulações C11 e C14 temos o queijo ralado padrão com umidade baixa, com média de 13 % \pm 1 % fator este que auxiliou na estabilidade microbiológica, já que a atividade de água também é reduzida e sendo assim mantendo o queijo ralado em condições favoráveis por um período de tempo mais longo.

Nas formulações C12 e C15 temos a umidade das amostras em média de 15 % \pm 1 % e a adição do ozônio, e foi percebida um crescimento de bolores e leveduras muito baixo e estável, sendo assim satisfatório. Nas formulações C13 e C16 onde também temos a umidade em torno de 15 % \pm 1 %, porém não ocorreu a adição do ozônio, também foi possível perceber um baixo crescimento microbiológico, porém ainda se destacando positivamente as formulações C12 e C15 com a adição do ozônio.

Todas as formulações atenderam os requisitos de bolores e leveduras estabelecidos na RDC 357/1997 - Regulamento para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado (BRASIL, 1997).

4.4.5 Análises de composição de ácidos graxos

Para uma avaliação mais precisa dos danos que o O₃ possa ter causado na estrutura química dos queijos ralados, foi realizada a análise da composição dos ácidos graxos dos experimentos comparando os experimentos que sofreram tratamento com O₃ dos que não sofreram tratamento com ozônio. Os resultados seguem apresentados nas Tabelas 19 e 20 para ácidos graxos saturados e insaturados.

Tabela 19 - Análise de ácidos graxos saturados (%)

Ácidos graxos saturados		Quantidade de ácidos graxos (%) nos experimentos					
Simbologia	Nomenclatura	C11	C12	C13	C14	C15	C16
C12:0	Ácido láurico	0,61 \pm 0,03 ^{ab}	0,54 \pm 0,02 ^a	0,75 \pm 0,03 ^a	0,71 \pm 0,08 ^b	0,68 \pm 0,07 ^{ab}	0,66 \pm 0,02 ^a
C14:0	Ácido mirístico	2,86 \pm 0,07 ^{ab}	2,63 \pm 0,05 ^a	3,67 \pm 0,02 ^c	3,10 \pm 0,07 ^b	2,91 \pm 0,17 ^{ab}	4,00 \pm 0,05 ^c
C16:0	Ácido palmítico	12,77 \pm 0,05 ^b	12,20 \pm 0,05 ^a	14,09 \pm 0,03 ^c	13,22 \pm 0,38 ^b	12,16 \pm 0,02 ^a	14,66 \pm 0,02 ^d
C18:0	Ácido esteárico	5,97 \pm 0,01 ^a	5,85 \pm 0,04 ^a	5,73 \pm 0,05 ^{ab}	5,53 \pm 0,18 ^{ab}	5,34 \pm 0,15 ^b	5,91 \pm 0,04 ^a

Resultados de média \pm desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

Tabela 20 - Análise de ácidos graxos insaturados (%)

Ácidos graxos insaturados		Quantidade de ácidos graxos (%) nos experimentos					
Simbologia	Nomenclatura	C11	C12	C13	C14	C15	C16
C16:1	Ácido palmitoléico	0,52±0,02 ^{ab}	0,50±0,03 ^a	0,68±0,02 ^c	0,46±0,05 ^a	0,53±0,08 ^{ab}	0,65±0,05 ^{bc}
C18:1	Ácido oléico	13,63±0,07 ^c	13,07±0,08 ^a	12,63±0,03 ^a	11,17±0,54 ^b	11,10±0,11 ^b	12,57±0,07 ^a
C18:1 TRANS	Ácido elaidico	0,11±0,05 ^a	0,10±0,02 ^a	0,14±0,06 ^a	0,12±0,08 ^a	0,10±0,03 ^a	0,05±0,01 ^a
C18:2	Ácido linoleico	1,40±0,06 ^{ab}	1,27±0,05 ^{abc}	1,33±0,01 ^{ab}	1,13±0,09 ^c	1,25±0,04 ^{ac}	1,44±0,03 ^b

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

Pode-se observar que houve uma leve diminuição dos ácidos graxos saturados nos queijos ralados tratados com O₃, havendo pequenas diferenças significativas entre os experimentos tratados com O₃ quando comparados aos que não receberam tratamento com O₃, a maior diferença foi em relação ao ácido palmítico, onde estatisticamente pode-se observar uma diferença significativa.

Para a composição de ácido láurico, ácido mirístico e ácido esteárico os queijos ralados padrão quando comparados com os queijos ralados que receberam tratamento com O₃ não apresentaram diferenças significativas. Quando comparado um tipo de queijo com o outro, apresentaram diferenças significativas para o ácido mirístico e esteárico.

Os queijos ralados tratados com O₃ apresentaram diferenças significativas para a composição de ácido palmítico quando comparado aos experimentos sem tratamento com O₃. Se comparado um tipo de queijo com o outro, não apresentaram diferenças significativas para o ácido palmítico.

Analisando a Tabela 20 onde tem-se os resultados da composição de ácidos graxos insaturados dos experimentos, pode-se observar que na maioria dos casos houve redução dos ácidos graxos, porém sem diferenças significativas quando comparados os queijos ralados padrão com os experimentos tratados com O₃. Quando comparado um tipo de queijo com o outro somente houve diferença significativa para o ácido oléico.

A análise da composição de ácidos graxos foi fundamental para concluir que os danos causados pela ação do O₃ são mínimos, já que houveram pequenas diferenças significativas entre os experimentos tratados com O₃ em relação aos que não receberam tratamento com O₃, exceto para o ácido graxo saturado palmítico que houve uma diferença significativa.

Como este estudo utilizou como matéria prima os queijos maturados Tipo Grana e Parmesão, deve ser levado em consideração que, além da ação do O₃ sobre os ácidos graxos, durante o processo de maturação ocorre a lipólise das gorduras com formação de ácidos graxos

de baixo peso molecular. Tais reações ocorrem por ação dos microrganismos presentes e/ou através de enzimas adicionadas especificamente para esse fim. Os principais ácidos formados são butírico, capróico, caprílico, cáprico e láurico; sua proporção relativa varia de acordo com o agente lipolítico utilizado o qual, por sua vez, é escolhido de acordo com o queijo. Embora a maturação esteja longe de ser um processo completamente entendido, já se sabe que a glicólise é efetuada integralmente pela microbiota láctica iniciadora, enquanto que a lipólise e a proteólise requerem a participação também da microbiota secundária para se completarem (PERRY, K, 2004).

No estudo de Malacarne et al. (2009) o teor de ácidos graxos livres aumentou continuamente ao longo de 24 meses de maturação do queijo Parmigiano Reggiano. A comparação das partes das peças de queijo mostrou uma distribuição não foi uniforme para o processo lipolítico. As porções periféricas da forma de queijo foram caracterizadas por um maior teor de ácidos graxos livres do que a região interna. Isso foi consistente com o "centrípeto" tendência do processo bioquímico responsável pelo amadurecimento de Queijo Tipo Grana. Os processos enzimáticos responsáveis para a hidrólise de triglicerídeos mostrou uma especificidade para ácidos graxos de cadeia curta, que proporcionalmente (em relação ao soma dos ácidos graxos individuais) aumentou durante a maturação.

Para McCarthy et al. (2017) as concentrações de ácidos graxos livres aumentaram gradualmente em queijos gordurosos, reduzidos em gordura e meio gordos durante a maturação, até certo ponto dependente dos níveis de gordura e sal.

4.4.6 Análise sensorial

A análise sensorial é uma boa forma de avaliar a qualidade dos queijos ralados. A análise sensorial foi realizada para as formulações C11, C12, C13, C14, C15 e C16, visto que nas primeiras formulações (C1 a C10) não foi possível obter uma estabilidade microbiológica e não sendo viável a sequência da análise sensorial.

4.4.6.1 Análise de aceitabilidade

Na Tabela 21 estão apresentados os valores médios para cada atributo das amostras de queijos ralados utilizados para avaliar a aceitabilidade do consumidor.

Tabela 21 - Médias dos atributos utilizados para avaliar a aceitabilidade do consumidor para os queijos ralados

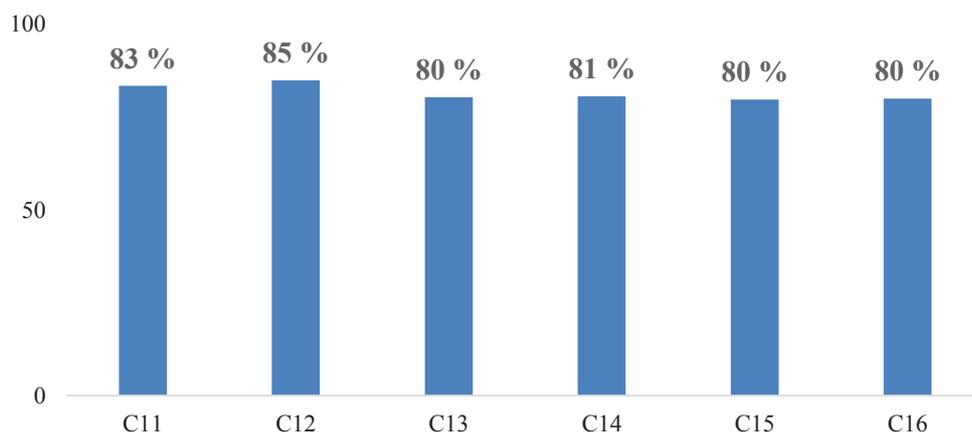
Experimentos	C11	C12	C13	C14	C15	C16
Cor	8,06 ± 1,11 ^a	7,86 ± 1,27 ^a	8,02 ± 1,10 ^a	7,87 ± 1,12 ^a	7,80 ± 1,18 ^a	7,72 ± 1,02 ^a
Textura	7,56 ± 0,99 ^a	7,68 ± 1,06 ^a	7,36 ± 1,22 ^a	7,18 ± 1,14 ^a	7,38 ± 1,09 ^a	7,38 ± 1,25 ^a
Aparência	7,78 ± 1,11 ^a	7,82 ± 1,03 ^a	7,38 ± 0,89 ^a	7,74 ± 1,10 ^a	7,60 ± 1,16 ^a	7,40 ± 1,06 ^a
Odor/Aroma	7,16 ± 1,60 ^a	7,51 ± 1,34 ^a	7,32 ± 1,50 ^a	7,36 ± 1,38 ^a	6,84 ± 1,58 ^a	7,36 ± 1,32 ^a
Sabor	7,08 ± 1,60 ^{ab}	7,45 ± 1,44 ^b	6,71 ± 1,61 ^{ab}	6,31 ± 2,03 ^a	6,57 ± 1,95 ^{ab}	6,70 ± 1,46 ^{ab}
Impressão Global	7,35 ± 1,33 ^a	7,51 ± 1,37 ^a	7,12 ± 1,22 ^a	7,18 ± 1,45 ^a	6,90 ± 1,66 ^a	7,08 ± 1,40 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

Analisando a avaliação da aceitabilidade dos queijos ralados, pode-se perceber que para todos os atributos, exceto sabor, não houveram diferenças significativas entre os experimentos.

Pode-se observar que para os experimentos de queijo Tipo Grana ralado e para o queijo Parmesão ralado o atributo da cor da amostra foi o melhor pontuado, seguido da aparência e o menos pontuado foi o sabor.

Figura 18 - Índice de aceitabilidade (%)



C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

4.4.6.2 Análise CATA

De acordo com a Figura 18, nota-se que a amostra mais aceita foi a de queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ com 85 % de aceitabilidade, seguido das amostras padrão de queijo Tipo Grana ralado com 83 % e queijo Parmesão ralado com 81 % de aceitabilidade, sendo que o uso do

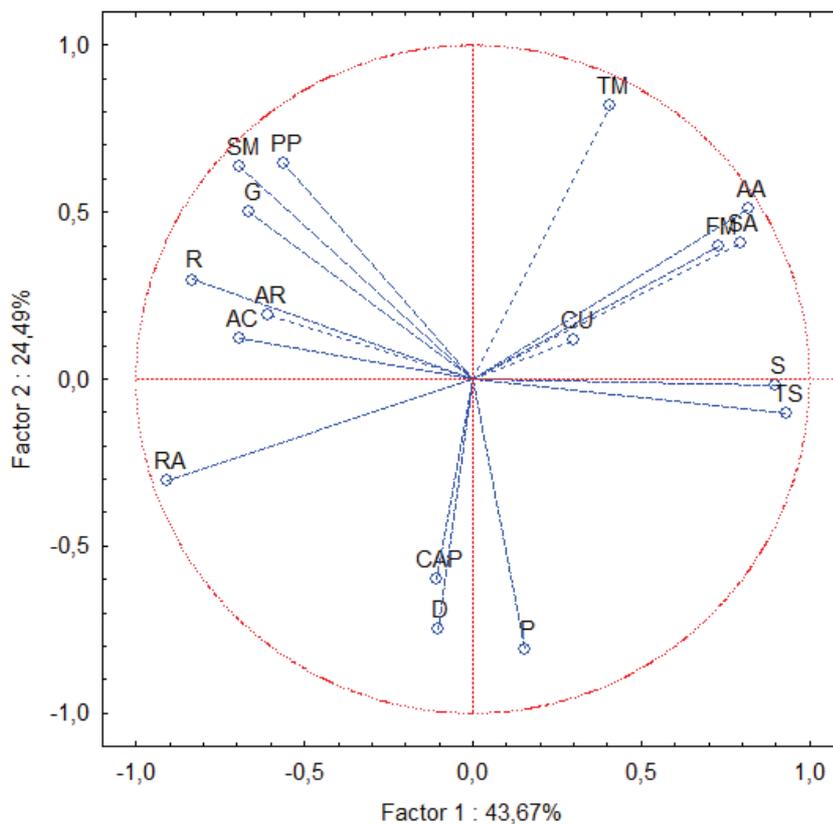
O₃ além de reduzir a população microbiana não provocou diminuição na aceitabilidade dos queijos ralados.

O índice de aceitabilidade com boa repercussão tem sido considerado $\geq 70\%$ (DUTCOSKY, 1996). Considerando o presente trabalho, todos os experimentos ficaram com índice de aceitabilidade acima de 80%.

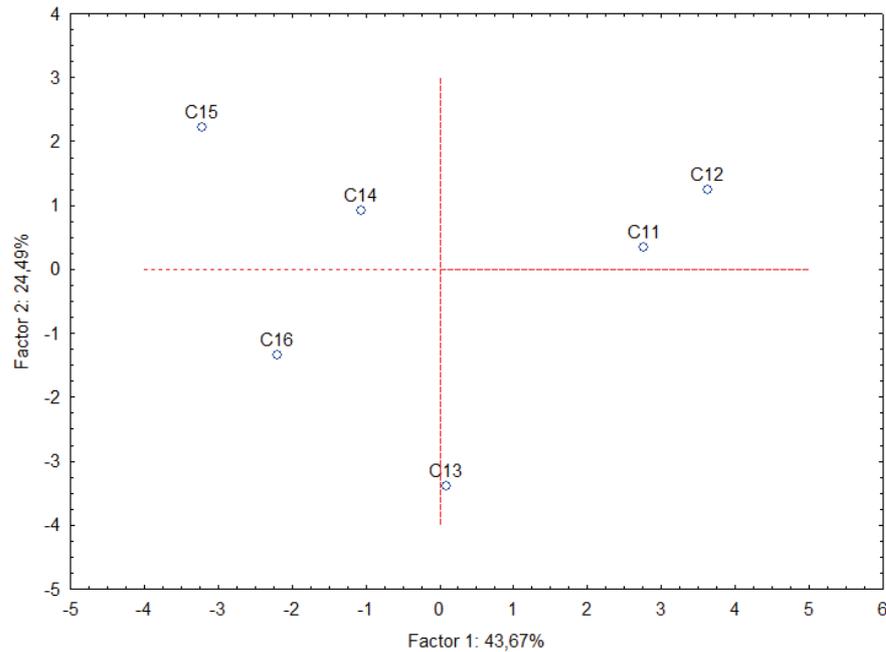
A utilização da metodologia CATA é uma boa ferramenta para coletar informações sobre a percepção dos consumidores em relação às características sensoriais dos produtos, isso pode contribuir para as melhorias no desenvolvimento do produto (BRUZZONE et al.,2015).

O questionário CATA tem como finalidade reunir as informações dos produtos em relação à percepção das características sensoriais do consumidor. A análise dos componentes principais do método CATA, representado na Figura 19 mostra que a variabilidade das amostras pôde ser explicada 68,16% por dois componentes principais.

Figura 19 - Projeção dos atributos sensoriais para as amostras de queijo ralado a partir da análise CATA.



RA: residual amargo; CAP: cor amarelo palha; S: solto; FM: fiapos médios; A: adesividade; PP: presença de pontos verdes; TS: textura seca; SM: sabor de mofo; CU: cor uniforme; D: duro; R: ranço; P: picante; AA: aroma adocicado; TM: textura macia; G: gorduroso; AR: ardido; AC: aroma de creme de leite, SA: sabor adocicado.



C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão com 13 % de umidade; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão com 13 % de umidade; C15 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 15 % de umidade sem tratamento com O₃.

O componente 1 se caracterizou mais acentuadamente pelos os atributos aroma de creme de leite, residual amargo, textura seca e solto enquanto que o componente 2 ficou mais marcado pelos atributos textura macia, cor amarelo palha, duro e picante.

O queijo Tipo Grana ralado padrão (C11) e o queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ (C12) foram mais bem representados pelos atributos textura seca, solto, cor uniforme, fiapos médios, sabor adocicado e aroma adocicado. Já o queijo Tipo Grana ralado sem tratamento com O₃ (C13) foi representado pelos atributos picante, duro e cor amarelo palha.

Enquanto que para o queijo Parmesão ralado padrão (C14) e para o queijo Parmesão ralado tratado com O₃ (C15), os atributos que mais se destacaram foram ardido, presença de pontos verdes, ranço, gorduroso e aroma de creme de leite. E para o queijo Parmesão ralado sem tratamento com O₃ (C16) os atributos que mais se acentuaram foi o residual amargo.

O queijo Tipo Grana ralado padrão (C11) apresenta atributos sensoriais semelhantes aos do queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ a 15 % de umidade (C12) por estarem no mesmo quadrante como pode ser observado na Figura 19. Já o queijo Tipo Grana sem tratamento com O₃ a 15 % de umidade (C13) apresentou atributos diferentes dos demais por ter ficado situado em outro quadrante.

O queijo Parmesão ralado com e sem tratamento com O₃ com umidade de 15 % ficaram no mesmo quadrante e assim havendo relação, já o queijo Parmesão padrão ficou em outro quadrante, não se relacionando com os outros dois e se acentuando o atributo de residual amargo.

Os atributos que apareceram com maior frequência nas quatro formulações de queijos ralados foram: Cor amarelo palha, solto, fiapos médios, textura seca, cor uniforme e duro. O queijo Parmesão ralado padrão foi mais vezes citado com textura rugosa, residual amargo e duro do que para o Queijo Tipo Grana ralado Padrão e com adição de O₃.

Um fator positivo foi que as amostras com adição de O₃ apresentaram menor pontuação para o item textura seca do que as amostras padrão, ou seja, mesmo com a umidade média de 15 % ± 1 % já é possível sentir uma textura melhor do que a amostra padrão que possui umidade média de 13 % ± 1 %.

No atributo ranço, o qual é muito importante para esta pesquisa, onde podemos comparar as amostras com tratamento de O₃ e sem tratamento com O₃, percebe-se que as amostras foram pouco pontuadas neste atributo, sendo a formulação mais pontuada a de queijo Parmesão ralado com adição de O₃ e a amostra menos pontuada foi a de queijo Tipo Grana ralado com tratamento de O₃, a análise sensorial coincide com os resultados obtidos na análise realizada para composição de ácidos graxos, onde foi constatado diferença significativa entre amostras, porém diferenças pequenas.

Quando se observa a análise sensorial frente a análise da composição de ácidos graxos, pode-se perceber que o ozônio oxidou uma fração muito pequena dos ácidos graxos que compõe a estrutura química dos queijos ralados, porém a composição de ácidos graxos quando olhada estatisticamente apresentou pequenas diferenças significativas entre as amostras analisadas ($p > 0,05$). Analisando estudos de outros autores sobre a aplicação de O₃ e seus efeitos sobre os ácidos graxos dos alimentos, análise sensorial e rancidez oxidativa, encontram-se diversos resultados e conclusões, positivos e negativos.

Roberto et al. (2016) estudaram o efeito do O₃ sobre a composição dos ácidos graxos do produto amendoim, no que se refere à qualidade dos grãos ozonizados, e não foi detectada variação significativa para o percentual de ácidos graxos e índice de peróxidos ($p > 0,05$).

De acordo com o estudo dos autores Kim et al. (2003), o ozônio teve um efeito negativo na qualidade sensorial de alguns produtos como grãos, especiarias e leite em pó, devido à oxidação de lipídios. Porém, outros investigadores demonstraram que o tratamento com ozônio melhorou a qualidade sensorial em carne de boi e de ovos e não alterou significativamente a qualidade sensorial de algumas frutas e legumes. Lanita e Silva (2008) não constataram o surgimento de processos adicionais de rancidez oxidativa em queijo parmesão submetido à ação do ozônio durante a maturação. O poder de oxidação do O₃ pode provocar descoloração e odores indesejáveis em alguns alimentos, ou componentes nutricionais como vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais podem ser alterados pela oxidação (KIM et al., 2003).

Compostos voláteis relacionados à oxidação lipídica, como heptanal e hexanal, foram observados em concentração crescente na farinha após tratamento com ozônio (OBADI et al., 2018). A solução de gás ozônio e ozônio tem sido aplicada para modificar as funcionalidades de vários produtos de grãos, incluindo proteína, amido e farinha. Os tratamentos com intensidade excessiva tendem a oxidar os componentes químicos, eliminando em grande parte as micotoxinas e fungos relacionados. O tratamento introduz grupos carbonilo e carboxilo no amido, cria dissulfeto de ligações em proteínas, oxida os lipídios, diminui os teores de polifenóis e inativar as enzimas endógenas (ZHU, 2018).

Apesar desses obstáculos técnicos, o ozônio tem se mostrado eficaz na descontaminação de vários alimentos. Os benefícios do ozônio, em muitos casos, superam as desvantagens e suas aplicações em alimentos devem aumentar em popularidade nos próximos anos (CHAWLA et al., 2012).

Comparando-se os resultados obtidos nesta pesquisa (onde somente foi realizado tratamento com O₃) com outros métodos existentes, tais como: radiofrequência, micro-ondas, radiação ultravioleta, irradiação, processamento a altas pressões, luz pulsada, entre outros, tem-se que cada método possui seus pontos positivos e negativos, e todos os métodos existentes causam reduções de populações microbianas nos alimentos. Todos estes métodos são promessas para o futuro da segurança alimentar, o que depende muito é o valor a ser investido nestes equipamentos, legislação ainda pouco existente ou não existente e a realização de testes no alimento que se pretende trabalhar (KHAN et al., 2017).

No estudo de Thierry et al. (2017) é relatado que a relação entre gordura e sabor dos produtos lácteos é complexo. Primeiro que a gordura é um “reservatório” de sabores, porque a maioria dos sabores compostos são mais solúveis em gordura do que em água. A interface entre as várias fases da matriz dos queijos fornece um local onde podem ocorrer diversas reações de formação de sabor. Em segundo lugar, a proporção e estrutura de gordura pode afetar a reologia do produto, e assim sua dispersão na boca. Como resultado a dispersão de compostos de sabor e a percepção do sabor pode ser modificado. Em terceiro lugar, gordura, e especialmente triglicerídeos, são precursores de compostos de sabor, tais como ácidos graxos livres, ésteres, tioésteres, metil cetonas, álcoois secundários e lactonas, que são comumente produzidos durante a maturação do queijo.

5 CONCLUSÕES

De acordo com este estudo para atingir a estabilidade microbiológica de queijo Tipo Grana ralado e de queijo Parmesão ralado a uma umidade final média de $19\% \pm 1\%$ e atividade de água superior a 0,8, após desidratação, é necessária uma concentração de conservador ácido sórbico acima de 0,15 % na formulação dos queijos ralados, ultrapassando os limites máximos estabelecidos pela Portaria n° 357 de 1997 (BRASIL, 1997) onde é permitida a adição do conservador ácido sórbico em formulações de queijos ralados a uma concentração máxima de 0,1 %.

Com a aplicação de O_3 em queijo ralado na etapa de desidratação, as contagens de bolores e leveduras foram reduzidas em até 99 % quando analisadas no tempo zero. Porém, para a conservação do produto queijo ralado ao longo da vida de prateleira, somente a ação do O_3 não foi suficiente para garantir uma estabilidade microbiológica, para tanto é necessário adicionar um outro agente conservador, no caso o conservador químico permitido em queijos ralados, o ácido sórbico.

Ao produzir o queijo ralado com tratamento de O_3 e conservador ácido sórbico, só foi possível atingir uma estabilidade microbiológica ao longo da vida de prateleira quando a umidade foi reduzida para $15\% \pm 1\%$ e a atividade de água ficou próxima de 0,7, acima deste percentual médio de umidade houve rápido crescimento de bolores e leveduras.

Avaliando o impacto da ação do O_3 sobre os queijos ralados, as amostras apresentaram resultados negativos para rancidez oxidativa porém, foram detectadas diferenças mínimas para a composição de ácidos graxos e atributos sensoriais. Sensorialmente os produtos tratados com O_3 ficaram muito parecidos com o produto padrão, onde se ressaltaram os atributos cor amarelo palha, solto, fiapos médios, textura seca, cor uniforme e duro. Percebeu-se diferença significativa para as análises de ácidos graxos e análise sensorial quando se comparou um queijo com o outro.

Diante disso, este estudo mostrou elevada aceitabilidade tanto para os queijos ralados padrão quanto para os experimentos tratados com O_3 , onde a amostra mais aceita foi a de queijo Tipo Grana ralado com tratamento de O_3 . Ainda existem muitas oportunidades de pesquisa para uma melhor utilização do gás ozônio como um aliado para o processamento de alimentos. Para a sequência deste estudo, o produto queijo ralado ainda pode ser tratado com concentrações de O_3 mais elevadas, com tempos de exposição maiores e também o tratamento pode ocorrer em outras etapas do processo de produção do queijo ralado.

REFERÊNCIAS

- ABIQ. **Mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil**. Extraído de <<https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil-105515n.aspx>> acesso em 20/09/17.
- AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*, London, v. 25, p. 386-391, 2008.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; MARTINS, M. A.; COSTA, A. R.; CECON, P. R. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*, v. 31, p. 930-939, 2011.
- ALEXANDRE, E.; BRANDÃO, T.; SILVA, C. Modelling microbial load reduction in foods due to ozone impact. *Procedia Food Science*, v. 1, p. 836 – 841, 2011.
- ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; KOURKOUTAS, Y.; STEFANIS, C.; VAVIAS, S.; VOIDAROU, C.; MANTZOURANI, I.; BEZIRTOGLOU, E. Experimental effect of ozone upon the microbial flora of commercially produced dairy fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 246, p. 5–11, 2017.
- AMES, Z.; FELIZIANI, E.; SMILANICK, L. Germination of fungal conidia after exposure to low concentration ozone atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, v. 83, p. 22 – 26, 2013.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos de alimentos, em anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 janeiro de 2001.
- ARES, G. JAEGER, S.R. Check-all-that-apply questions: influence of attribute order on sensory product characterization. *Food Quality and Preference*, v. 28, p. 141-153, 2013.
- ARES, G.; DAUBER, C.; FERNÁNDEZ, E.; GIMÉNEZ, A.; VARELA, P. Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation. *Food Quality and Preference*, v. 32, p. 65-76, 2014.
- ARES, G.; VARELA, P.; RADO, G.; GIMÉNEZ, A. Identifying ideal products using three different consumer profiling methodologies. Comparison with external preference mapping. *Food Quality and Preference*. V.22, p. 581-591, 2011.
- ASHFORD, R. D. **Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals**. 3. ed. p. 8482, 2011.
- BAI, Y.; GUO, X.; ZHU, K.; ZHOU, H. Shelf-life extension of semi-dried buckwheat noodles by the combination of aqueous ozone treatment and modified atmosphere packaging. *Food Chemistry*, v. 237, p. 553 – 560, 2017.
- BLOGOSLAWSKI, W. J.; STEWART, M. E. Some ozone applications in seafood. *Ozone Sci. Eng*, v. 33, p. 368-373, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de Dezembro de 2006, Anexo V. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos - Ácido Sórbito e seus Sais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1 de 07 de Outubro de 1981, Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes, constituindo-se em métodos microbiológicos e métodos físicos e químicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 357, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília**, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. Instrução normativa conjunta nº 18, de 28 de maio de 2009.

BRIÉ A.; BOUDAUD, N.; MSSIHID, A.; LOUTREUL, J.; BERTRAND, I.; GANTZER, G. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. **Food Microbiology**, v. 70, p. 1-6, 2018.

BRUZZONE, F.; VIDAL, L.; ANTÚNEZ, L.; GIMÉNEZ, A.; DELIZA, R.; ARES, G. Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterisation and directions for product reformulation of milk desserts. **Food Quality and Preference**, v. 44, p. 183-193, 2015.

CARDENAS, F.C.; ANDRES, S.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. **Food Control**, v. 22, p.1442-1447, 2011.

CASTANHEIRA, A. **Controle de qualidade de leite e derivados – manual básico**. 2. Ed. São Paulo, 2012.

CEVOLI, C.; GORI, A.; NOCETTI, M.; CUIBUS, L.; CABONI, M. F.; FABBRI, A. FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. **Food Research International**, v. 52, p.214–220, 2013.

CHAWLA, A.S.; KASLER, D.R.; SASTRY, S.K.; YOUSEF, A.E. Microbial decontamination of food using ozone. **Food Industry**. p. 495-532, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. General standard for food additives codex stan 192-1995. Adopted in 1995. Revision in 2017.

CULLEN, P. J.; VALDRAMIDIS, V. P.; TIWARI, B. K.; PATIL, S.; BOURKE, P.; O'DONNELL, C. P. Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. **Ozone Sci. Eng.** v.32, p. 166-179, 2010.

DEUEL, H. J., JR., CALBERT, C. E., ANISFELD, L., MCKEEHAN, H., & BLUNDEN, H. D. Sorbic acid as fungistatic agent for foods. II Metabolism of b-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. **Food Research**, v.19, n. 1, p. 13–19, 1954.

DEZOTTI, M. **Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos**. v.5, p.360, Rio de Janeiro, 2008.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, v. 2, p. 784, 2005.

DUARTE, AM; CRUZ, AG; SANT'ANA, AS; BARBIN, DF. Incidência de amido em queijo parmesão ralado. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, n.353, v.61, p.16- 18, 2006.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.

FDA. **Guidance to Industry: Recommendations to processors of apple juice or cider on the use of ozone for pathogen reduction purposes**, 2004.

FDA. **Hazard analysis and critical control point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule**, Federal Register, 66: 6137-6202, 2001.

FDA. Teratologic evaluation of FDA 73-4, potassium sorbate, Sorbistat, in mice and rats. PB-245520, Springfield: National Technical Information Service. **US Department of Commerce**, 1975.

FEITOSA, T.; BORGES M.F.; NASSU R.T; AZEVEDO E.H.F; MUNIZ C.F. Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162-165, 2003.

FERRAND, C. Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n. 11, p.895-901, dez. 2000.

FRATAMICO, P. M.; JUNCJA, V.; ANNOUS, B. A.; RASANAYAGAM, V.; SUNDAR, M.; BRAITHWAITE, D.; FISHER, S. Application of ozonated dry ice (ALIGALTM Blue ice) for packaging and transport in the food industry. **J. Food Sci.**, v. 77, M285-M2910, 2012.

GAUNT, I. F. Long-term toxicity of sorbic acid in the rat. **Food and cosmetics toxicology**, v. 13, n. 1, p. 31-45, 1975.

GERTZOU, L. N., KARABAGIAS, L. K., DROSOS, P. E., RIGANAKOS, K. A. Effect of combination of ozonation and vacuum packaging on shelf life extension of fresh chicken legs during storage under refrigeration. **Journal of Food Engineering**, V. 213, p. 18-26, novembro 2017.

GORI, A.; MAGGIO, R. M.; CERRETANI, L.; NOCETTI, M.; CABONI, M. F. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. **International Dairy Journal**, v. 23, p. 115-120, 2012.

GRAHAM, D. M.; PARIZA, M. W.; GLAZE, W. H.; ERDMAN, J. W.; NEWELL, G. W.; BORZELLECA, J. F. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v. 51, n.6, p. 6-72, 1997.

HAN, Q.; GAO, H.; CHEN, H.; FANG, X.; WU, W. Precooling and ozone treatments affects postharvest quality of black mulberry (*Morus nigra*) fruits. **Food Chemistry**, v. 221, p.1947–1953, 2017.

HANNUKSELA, M.; HAAHTELA, T. Hypersensitivity reactions to food additives. **Allergy**, v. 42, n. 8, p. 561-575, 1987.

HENDY, R. J. Long-term toxicity studies of sorbic acid in mice. **Food and cosmetics toxicology**, v. 14, n. 5, p. 381-386, 1976.

HILL, A. G.; RICE, R. G. **Historical background, properties and applications**. In Rice, R. G.; Netzer, A. ed.: Handbook of Ozone Technology and Applications, 1. ed., Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, p. 1-37, 1982.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; HOFFMANN, P. Determinação da qualidade microbiológica de queijos ralados obtidos o varejo do município de São José do Rio Preto SP. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 342, v. 60, p. 31-39, 2005.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. **Water Research**, Kidlington, v. 33, n. 11, p. 2633-2641, 1999.

ISIKBER, A.; ATHANASSIOU, C. The use of ozone gas for the control of insects and microorganisms in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 64, p. 139 – 145, 2015.

JAEGER, H.; SCHULZ, A.; KARAPETKOV, N.; KNORR, D. Efeito protetor dos constituintes do leite e lesões sublethal limitando a eficácia do processo durante a inativação do PEF de *Lb.Rhamnosus*, **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p. 154 – 161, 2009.

JECFA. **Evaluation of certain food additives**. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 70° meeting. Roma, Italy, 2002.

JEONG, J. Y.; KIM, C. R.; KIM, K. H.; MOON, S. J.; KOOK, K.; KANG, S. N. Microbial and physicochemical characteristics of pork loin cuts treated with ozone gas during storage. **Korean J. Food Sci. Animal Res.** v. 27, p.80-86, 2007.

JORNAL DA CIÊNCIA. **Queijo ralado de grandes marcas pode não ser parmesão, e sim madeira!** Extraído de <<http://www.jornalciencia.com/queijo-ralado-de-grandes-marcas-pode-nao-ser-parmesao-e-sim-madeira/>> acesso em 20/09/2017.

JUHLIN, LENNART. Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. **British Journal of Dermatology**, v. 104, n. 4, p. 369-381, 1981.

JUSTUS, A.; FERRARI, L. M. B.; RODRIGUES, L. R.; FERREIRA, M. L.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R. Caracterização física e química de queijos parmesão ralados comercializados na região Sul de Minas Gerais. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 66, p. 16-24, 2011.

KHAN, I.; TANGO, C. N.; MISKEEN, S.; LEE, B. H.; OH, D. Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. **Food Control**, V. 73, p. 1426 – 1444, 2017.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KOGELSCHATZ, U. **Advanced ozone generation**. In: Stucki, S. (Ed.), *Process Technologies for Water Treatment*. Plenum Publishers, New York, NY, p. 87-120, 1988.

KUBO, I.; LEE, S. H. Potentiation of antifungal activity of sorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.10, p.4052-4055, 1998.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, p. 568, 1991.

LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 182-189, 2008.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. **Desinfecção de efluentes sanitários por meio de ozonização**. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). *Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patógenos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica*. Vitória: PROSAB, p. 169-208, 2003.

LEITE E QUEIJOS. Revista da Associação das Pequenas Indústrias de Laticínios do Rio Grande do Sul. **Como o ozônio pode auxiliar produtores e indústria na higienização**. Ano VI, 34. ed., Agosto 2017.

LI, M.; PENG, J.; ZHU, K.; GUO, X.; ZHANG, M.; PENG, W.; ZHOU, H. Delineating the microbial and physical-chemical changes during storage of ozone treated wheat flour. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 20, p. 223-229, 2013.

LIICK, E. Sorbic acid as a food preservative. **International Flavours and Food Additives**, v.7, p. 122-124, 1976.

LOUREIRO, V.; QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 11, p. 356-365, 1999.

LUCK, E.; JAGER, M.; RACZEK, N. **“Sorbic Acid” in Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Wiley – VCH, Weinheim, 2000.

MALACARNE, M.; SUMMER, A.; FRANCESCHI, P.; FORMAGGIONI, P.; PECORARI, M.; PANARI, G.; MARIANI, P. Free Fatty acid profile of Parmigiano Reggiano cheese throughout ripening: Comparison between the inner and outer regions of the wheel. **International Dairy Journal**. V. 19, p. 637-641, 2009.

MALDONADO, A.G. Avaliação higiênicosanitária de amostras de queijo parmesão ralado do município de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.141, p.103-105, 2006.

MANLEY, C. & NIEGOWSKI, J. **Ozone**. In *Encyclopedia of chemical technology*. V. 14, 2 ed., p. 410 – 432, Nova York, 1967.

MARINO, M.; SEGAT, A.; MAIFRENI, M.; FRIGO, F.; SEPULCRI, C.; INNOCENTE, N. Efficacy of ozonation on microbial counts in used brines for cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 50, 9-14, 2015.

MARQUES, S. F.; CORÇÃO, G. E.; ALVES, M. K. Análise microbiológica e incidência de amido em queijos ralados. **Higiene alimentar**, vol. 30, p. 256-257, 2016.

MARTINS, R. P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEITE, D. S. Analysis of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from grated cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 31 (1): 106-108, jan-mar 2011.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em Alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.

MCCARTHY, C.M.; KELLY, P.M.; WILKINSON, M.G.; GUINEE, T.P. Effect of fat and salt reduction on the changes in the concentrations of free acids and free fatty in Cheddar-style cheeses during maturation. **Food Composition Analysis**. S0889-1575(17)30017-0. 2017.

MENDEZ, F.; MAIER, E.; MASON, J.; WOLOSHUK, P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal Stored Prod.* v. 39, p. 33 – 34, 2003.

MESQUITA. A.J. Estudo quali-quantitativo da microbiota anaeróbia em amostras de queijo provolone, parmesão e prato. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.2, n.1, p.27-34, 2001.

MEYNEERS, M. CASTURA, J.C. CARR, B.T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data. *Food Quality and Preference*, v. 30, p. 309-319, 2013.

MOLOGNONI, L. **Desenvolvimento de metodologias para análise simultânea de ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2015.

MORAES, A. R.F. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.33-36, 2007.

MOSKOWITZ, H. R. **Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R&D approaches**. Food & Nutrition Press, Inc., 1983.

MOSQUIM, M. C. Queijo ralado. Nova legislação comentada. São Paulo: Fonte Comunicações, p. 95-100, 1998.

MYLONA, K.; KOGKAKI, E.; SULTYOK, M.; MAGAN, N. Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in vitro and in situ in maize. **Journal of Stored Products Research**, V. 59, p. 178 – 184, 2014.

NAIDU, A. S. **Natural food antimicrobial systems**. p. 637, 2000.

NASCIMENTO, L.; LIMA, L.; PICOLLI, R.; FIORINI, J.; DUARTE, S.; SILVA, J.; OLIVEIRA, N.; VEIGA, S. Ozônio e ultrassom: processos alternativos para o tratamento de café despolpado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 (2), p. 282 – 294, abr – jun, 2008

NOVAK, J.; DEMIRCI, A.; HAN, Y. Processos químicos dos gases: ozônio, O₂ supercrítico, água oxidante eletrólise e dióxido de cloro. **Food Science and Technology International**, v.14, p. 437-441, 2008.

NUNES, A.; PAIVA, J.; CORTEZ, N.; NÓBREGA, I.; SIMÕES, R. Physico-chemical and microbiological quality of grated cheeses marketed in recife-pe Brazil. **Joural Bioen. Food Science**, Brasil, V. 02 p. 25-31, 2015.

O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. **Ozone in food processing**. 1. ed.: Wiley-Blackwell, 2012.

OBADI, M., ZHU, K. X., PENG, W., & ZHOU, H. M. Shelf life characteristics of bread produced from ozonated wheat flour. **Journal of Texture Studies**, DOI: 10.1111/jtxs.12309, 2018.

OLIVEIRA, L.; ANJOS, L.; SOUZA, P.; BRUMANO, L.; BESSA, M.; PINTO, M. Avaliação da qualidade de queijos ralados para proteção da saúde pública. **Instituto Candido Tostes**, Jan/Fev, n. 384, 67: 41-47, 2012.

OSKAN, R.; SMILANICK, J. L.; KARABULUT, O. A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 60, p. 47-51, 2011.

PAISSONI, M. A.; SEGADE, S. R.; GIACOSA S.; TORCHIO, F. CRAVERO F.; ENGLEZOS V.; RANTSIOU A.; CARBONI, C.; GERBI, V. TEISSEDE, P.; ROLLE, L. Impact of post-harvest ozone treatments on the skin phenolic. **Food Research International**. v.98, p.68–78, 2017.

PATIL, S.; BOURKE, P.; FRIAS, J. M.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J. Inativação de *Escherichia coli* em suco de laranja usando ozônio. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, p. 551-557, 2009.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27 n.2, São Paulo, Março/Abril, 2004.

PIACHIN, T.; TRACHOO, N. Effect of ozone and potassium lactate on lipid oxidation and survival of *Salmonella typhimurium* on fresh pork. **Pak. J. Biol. Sci.** v.14, p. 236-240, 2011

PIMENTEL, E. F. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p. 289-294, 2002.

PINTO, A. T.; SCHMIDT, V.; RAIMUNDO, S. A.; RAIHMER, F. Uso do ozônio no controle de fungos em sala de maturação de queijos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, p. 333-337, 2007.

PUGA, L.C.H.P. Alimentos seguros para consumo: Análises dos produtos lácteos de minas gerais. In: **Congresso Nacional de Laticínios**, 26, 2009, Juiz de Fora: EPA-MIG/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, p. 1-9, 2008.

QUESADA, J.; RUBIO, M.; GÓMEZ, D. Ozonation products of organosolvolytic extracts from vegetal materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 2, p. 692-697, Fev, 1998.

RAJCHL, A. Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. **Journal of food engineering**, v. 99, n.4, p. 465-470, 2010.

REGATTIERI, A.; GAMBERI, M.; MANZINI, R. Traceability of food products: general framework and experimental evidence. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 347-356, 2007.

RIBEIRO, J. C. B.; CARDOSO, C. R.; ESMERINO, L. A.; SANTOS, R. D.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. Qualidade físico-química e microbiológica do queijo parmesão ralado comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 67, p. 21-26, 2012.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. B. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 73, n. 1, p. 44-47, 1981.

ROBERTO, M.; ALENCAR, E.; FERREIRA, W.; MENDONÇA, M.; ALVES H. Saturação do ozônio em coluna contendo grãos de amendoim e efeito na qualidade. **Food Technology**. Campinas, v. 19, 2016.

RODRIGES, R. M. C. **2017 será tão instável para o setor lácteo quanto foi 2016? Confira relatos de especialistas**. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/2017-sera-tao-instavel-para-o-setor-lacteo-quanto-foi-2016-confira-relatos-de-especialistas-103569n.aspx>>. Acesso em 02/10/2017.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, p. 826, 1999.

SALAVESSA, J. J. S. M. **Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos**. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

SALVADOR, M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.19, n.1, p.65- 74, 2001.

SANCHEZ, B. A. O.; ALENCAR, E. R.; PINELI, L. L. O.; FERREIRA, W. F. S.; ROBERTO, M. A. Tracing interactions among column height, exposure time and gas concentration to dimension peanut antifungal ozonation. **Food Science and Technology**, Zurich, v. 65, p. 668-675, 2016.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2009.

SEGAT, A.; BIASUTTI, M.; IACUMIN, L.; COMI, G.; BARUZZI, F.; CARBONI, C.; INNOCENTE, N. Use of ozone in production chain of high moisture Mozzarella cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 513-520, 2014.

SEGAT, A.; MISRA, N.; FABBRO, A.; BUCHINI, F. LIPPE, G.; CULLEN, P.; INNOCENTE, N. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 66, p. 365 – 372, 2014.

SELMA, M. V.; IBANEZ, A. M.; CANTWELL, M.; SUSLOW, T. Redução por aplicação de ozônio gasoso de *Salmonella* e flora microbiana associada ao melão cortado. **Microbiologia alimentar**, v. 25, p. 558-565, 2008.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENANCIO, A.; LIMA, N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2355 - 2358, 2003.

SFAGRO. **Fiscais agropecuários dão dicas para identificar fraudes em queijos**. Artigo original da SFAGRO, extraído de <<http://sfagro.uol.com.br/fraude-queijos/>>, acesso em 20/09/2017.

SHAH, N.; RAHMAN, R. A.; CHUAN, L.T.; HASHIM, D. M.; Application of gaseous ozone to inactivate *Bacillus cereus* in processed rice. **J. Food Process Eng.** v. 34, p. 2220-2232, 2011.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potential use of ozone in the food processing. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, abr-jun, 2011.

SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados à desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS**. Dissertação de Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In MAGA, J. A. & TU, A. T. **Food additive toxicology**, p. 501-529, 1995.

SOFOS, J. N. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1- 17, 1986.

SOFOS, J.; BUSTA, F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. & BRANEN, A. **Antimicrobials in foods**. Idaho: Marcel Dekker, p. 49-94, 1993.

SOUZA, J. B. **Avaliação de métodos para desinfecção de água, empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SUBRAMANYAM, B.; XINYI, E.; SAVOLDELLI, S.; SEHGAL, B. Efficacy of ozone against *Rhizopertha dominica* adults in wheat. **Journal of Stored Products Research**. v. 70, p.53-59, 2017.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.

THIERRY, A.; COLLINS, Y.F.; MUKDSI, M.C.A.; MCSERRNEY, P.L.H.; WILKINSON, M.G.; SPINLER, H.E. Lipolysis and Metabolismo f Fatty Acids in Cheese. **Science and Technology of Milk and Egg**. INRA, Agrocampus Ouest, Renners, Cap. 17. France, 2017.

TORLAK, E. & SERT, D. Inactivation of *Cronobacter* by gaseous ozone in milk powders with diferente fat contents. **International Dairy Journal**, v. 32, 2. ed. 2, p. 121-125, Outubro, 2013.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Avaliação da qualidade química e microbiológica de queijo parmesão ralado e comercializado no Rio de Janeiro. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 67, p. 11-16, Mar/Abr, 2012.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, 1999.

VIDAL, F. J. R. **Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid : Ediciones Díaz de Santos, p. 253, 2003.

WALKER, R. Toxicology of sorbic acid and sorbates. **Food Additives & Contaminants**, v. 7, n. 5, p. 671-676, 1990

WHO. World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. In. **WHO Technical Report Series**, n. 868, 1997.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, p. 182-190, 1991.

WIESE, C. B.; PELL, E. J. Oxidative modification of the cell wall in tomato plants exposed to ozone. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 4, p. 375-382, Abr, 2003.

ZACARCHENCO, P.B. Bolores e leveduras em queijos. **Revista Tecnol (ITAL)**. Expresso, ano II, n8, set-out de 2011.

ZHU, F. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. **Food Chemistry**. SO308-8146(18)308422, May, 2018.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre “**Aplicação de ozônio em queijo ralado para redução do conservante químico**”, de responsabilidade da pesquisadora Cristine Maso Jeusti Bof.

Esta pesquisa justifica-se em atender a demanda por alimentos mais saudáveis e a necessidade da indústria em explorar as diferentes tecnologias para a produção e conservação de produtos. O objetivo desta pesquisa é desenvolver um processo alternativo utilizando ozônio para a conservação de queijo ralado buscando a redução da adição do conservador químico no produto.

A sua participação na pesquisa será em 2 encontros, junto ao laboratório de análise sensorial do CEPA, na Universidade de Passo Fundo, com duração aproximada de 30 minutos para cada julgador. Você não terá custos para realização da análise, assim como não receberá pagamento pela sua participação.

Se for identificado algum sinal de desconforto psicológico da sua participação na pesquisa, a pesquisadora compromete-se em orientá-lo e encaminhá-lo para os profissionais especializados na área de enfermagem.

Ao participar desta pesquisa os riscos aos participantes são mínimos, já que o produto será fabricado a partir de matérias-primas de grau alimentício e o ozônio que será acrescentado na etapa de desidratação do queijo ralado, por se tratar de um gás inerte, até a embalagem primária do queijo ralado, este gás retorna a sua forma de oxigênio. Caso possua intolerância, alergia ou qualquer outra reação adversa a qualquer um dos ingredientes você não poderá participar da pesquisa.

Você terá os seguintes benefícios: ter a oportunidade de degustar um produto saboroso e contribuir para a pesquisa de desenvolvimento de produtos mais saudáveis. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relacionada a pesquisa e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo.

Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento. Os dados relacionados à sua identificação não serão divulgados. Os resultados da pesquisa serão divulgados, mas você terá a garantia do sigilo e da confidencialidade dos dados.

Caso você tenha dúvidas sobre o comportamento dos pesquisadores ou sobre as mudanças ocorridas na pesquisa que não constam no TCLE, e caso se considera prejudicado na sua

dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com a pesquisadora Cristine Maso Jeusti Bof, telefone 54-99996-3494 ou com o curso Engenharia de Alimentos, ou também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF, pelo telefone (54) 3316-8157, no horário das 08h às 12h e das 13h30min às 17h30min, de segunda a sexta-feira.

Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações acima, coloque seu nome no local indicado abaixo. Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o (a) pesquisador (a).

Passo Fundo, 03 de Dezembro de 2018.

Nome do (a) participante: _____

Assinatura: _____

Nome do (a) pesquisador (a): Cristine Maso Jeusti Bof

Assinatura: _____

APÊNDICE B – Ficha de Cadastro para realização de análise sensorial

Nº _____

Nome: _____ **Data:** ___/___/___

1) Faixa etária <input type="checkbox"/> menos de 18 anos <input type="checkbox"/> 18 a 25 anos <input type="checkbox"/> 25 a 30 anos <input type="checkbox"/> 31 a 40 anos <input type="checkbox"/> 41 a 50 anos <input type="checkbox"/> mais de 50 anos	2) Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino	3) Você tem alguma alergia ou intolerância alimentar das indicadas abaixo, que restrinja o consumo? <input type="checkbox"/> Ovo <input type="checkbox"/> frutos do mar <input type="checkbox"/> leite <input type="checkbox"/> glúten <input type="checkbox"/> trigo <input type="checkbox"/> outra _____
4) Você gosta de consumir queijo ralado? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	5) Indique a sua frequência de consumo de queijo ralado: <input type="checkbox"/> diariamente <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 2 vezes por semana <input type="checkbox"/> mais que duas vezes por semana <input type="checkbox"/> ocasionalmente (menos	
6) Se você costuma consumir queijo ralado, qual o tipo prefere? <input type="checkbox"/> Queijo Parmesão <input type="checkbox"/> Queijo Tipo Grana Padano		

APÊNDICE C – Ficha de aceitabilidade e CATA para análise sensorial

Avaliação Sensorial de QUEIJO RALADO

Nome: _____

Número da amostra: _____

Data: ___/___/___

Por favor, prove a amostra de QUEIJO RALADO e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou do produto.

- | | | |
|------------------------------|-------------------|----------------------|
| 9 – Gostei muitíssimo | Cor: | <input type="text"/> |
| 8 – Gostei muito | Textura: | <input type="text"/> |
| 7 – Gostei moderadamente | Aparência: | <input type="text"/> |
| 6 – Gostei ligeiramente | Odor/aroma: | <input type="text"/> |
| 5 – Não gostei/nem desgostei | Sabor: | <input type="text"/> |
| 4 – Desgostei ligeiramente | Impressão global: | <input type="text"/> |
| 3 – Desgostei moderadamente | | |
| 2 – Desgostei muito | | |
| 1 – Desgostei muitíssimo | | |

Cheque tudo que se aplica ao produto

Você está recebendo uma amostra de QUEIJO RALADO. Por favor, observe, aspire e prove. Em seguida, marque com um X todas as opções que você considera adequadas para descrever o produto:

<input type="checkbox"/>	Textura rugosa
<input type="checkbox"/>	Residual amargo
<input type="checkbox"/>	Cor amarelo palha
<input type="checkbox"/>	Solto
<input type="checkbox"/>	Fiapos médios
<input type="checkbox"/>	Cor não uniforme
<input type="checkbox"/>	Adesividade
<input type="checkbox"/>	Presença de pontos verdes
<input type="checkbox"/>	Textura seca
<input type="checkbox"/>	Sabor de mofo
<input type="checkbox"/>	Cor uniforme

<input type="checkbox"/>	Duro
<input type="checkbox"/>	Ranço
<input type="checkbox"/>	Picante
<input type="checkbox"/>	Aroma adocicado
<input type="checkbox"/>	Textura macia
<input type="checkbox"/>	Cor amarelo queimado
<input type="checkbox"/>	Ácido
<input type="checkbox"/>	Gorduroso
<input type="checkbox"/>	Ardido
<input type="checkbox"/>	Sabor adocicado
<input type="checkbox"/>	Aroma de creme de leite

APÊNDICE D – ARTIGO CIENTÍFICO

Conservação de queijo ralado através da aplicação de ozônio durante a etapa de desidratação

RESUMO

Grande parte dos queijos ralados encontrados no mercado apresentam-se secos, salgados, ácidos, com pouco sabor e baixo teor de gordura. Estes fatores que prejudicam a qualidade sensorial do produto por outro lado ajudam a inibir o desenvolvimento de bolores e leveduras ao longo da vida de prateleira. A ação do ozônio sobre bolores e leveduras é bastante efetiva, pois eles são facilmente atingidos em um menor período de tempo do que as bactérias, portanto a utilização do Ozônio no processamento de alimentos pode ser uma alternativa para as indústrias. Este estudo teve como objetivo desenvolver um processo utilizando ozônio para a conservação de queijo Tipo Grana ralado e queijo Parmesão ralado buscando a redução da adição do conservador químico no produto. Foi realizada a conservação dos queijos ralados com uso do ozônio e do ácido sórbico e ainda foram realizados testes sensoriais afetivos e descritivos. O ozônio foi aplicado nos queijos ralados em concentrações variadas, durante o processo de desidratação, para determinação da concentração mínima que tenha apresentado os melhores resultados para redução de bolores e leveduras onde foi possível constatar uma redução de até 99 % de bolores e leveduras no queijo ralado. O queijo ralado foi produzido com a combinação do conservador ácido sórbico e Ozônio. Para avaliação dos efeitos do Ozônio sobre os experimentos, os produtos foram submetidos a análise de composição de ácidos graxos, rancidez oxidativa e também a análise sensorial com testes afetivos e descritivos. Quando analisada a composição de ácidos graxos e análise sensorial, foram encontradas diferenças significativas entre as amostras padrão e as amostras tratadas com Ozônio, embora estas diferenças tenham sido pequenas. Constatou-se que a ação do Ozônio sobre os queijos ralados causou danos mínimos ao produto, tanto químicos quanto sensoriais.

Palavras-chave: ozônio, queijo ralado, bolores e leveduras, CATA.

ABSTRACT

Most of the grated cheeses found on the market are dry, salty, acidic, with little taste and low in fat. These factors that impair the sensory quality of the product on the other hand help to inhibit the development of molds and yeasts over the shelf life. The action of ozone on molds and yeasts is quite effective as they are easily achieved in a shorter period of time than bacteria, so using ozone in food processing may be an alternative for industries. This study had as objective to develop a process using ozone for the conservation of grated Grana type cheese and grated Parmesan cheese, seeking to reduce the addition of the chemical preservative in the product. The grated cheeses were conserved using ozone and sorbic acid and affective and descriptive sensorial tests were carried out. During the dehydration process, ozone was applied to the grated cheeses to determine the minimum concentration that presented the best results for the reduction of molds and yeasts where it was possible to observe a reduction of up to 99% of molds and yeasts in the cheese grated. The grated cheese was produced with the combination of the conservative sorbic acid and Ozone. To evaluate the effects of ozone on the experiments, the products were submitted to analysis of fatty acid composition, oxidative rancidity and also the sensorial analysis with affective and descriptive tests. When analyzing the composition of

fatty acids and sensorial analysis, significant differences were found between the standard samples and the samples treated with Ozone, although these differences were small. It was found that the action of ozone on grated cheeses caused minimal damage to the product, both chemical and sensory.

Key words: ozone, grated cheese, molds and yeasts, CATA.

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento muito antigo, e não há qualquer evidência conclusiva indicando onde a produção de queijo teve origem. Dentre os diversos formatos que os queijos podem ser apresentados, um deles é ralado. O queijo ralado é um produto com muitas superfícies de contato sendo assim um produto vulnerável a contaminação por microrganismos deteriorantes, tais como bolores e leveduras.

O crescimento de bolores e leveduras em queijo ralado é um problema, pois além de serem contaminantes microbiológicos, alguns tipos de bolores produzem toxinas as quais são nocivas para a saúde, sendo assim um risco para o consumidor. Eles representam prejuízos para a indústria alimentícia, acarretando em devoluções e descarte de produtos, reclamações, penalizações, insatisfação dos clientes em relação ao produto e marca.

Grande parte dos queijos ralados encontrados no mercado apresentam-se secos, salgados, ácidos e com baixo teor de gordura. Estes fatores que prejudicam a qualidade sensorial do produto por outro lado inibem o desenvolvimento de bolores e leveduras ao longo da vida de prateleira. Outro fator que inibe o crescimento de bolores e leveduras é o conservador químico ácido sórbico o qual pode ser utilizado em concentração máxima de 0,1 % (BRASIL, 1997).

O ozônio é um gás que vem sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia, a fim de sanitizar equipamentos e utensílios e ainda diretamente sobre alimentos. O tratamento utilizando ozônio está entre as tecnologias emergentes de grande potencial para a indústria alimentar. Após a sua declaração como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) as promessas do tratamento de alimentos com ozônio tornam-se ainda mais visíveis nos últimos anos. A utilização do tratamento com ozônio em alimentos é em grande parte atribuída às propriedades físico-químicas da molécula de ozônio, tais como seu poder oxidativo.

Deve ainda ser ressaltado, que para queijos ralados poucos estudos sobre novas tecnologias de conservação foram publicados em periódicos científicos. São encontrados apenas estudos que verificaram produtos fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação

vigente e, também, impróprios para o consumo devido a contaminações de origem microbiana ou química.

A fim de atender a demanda por alimentos saudáveis e a necessidade da indústria em explorar as diferentes tecnologias para a produção e conservação deste tipo de alimento são necessários maiores estudos, tais como o emprego do ozônio para conservação e melhoria da vida de prateleira do queijo ralado e conseqüente redução do conservador químico.

Neste contexto, o presente projeto enquadra-se na linha de pesquisa de processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes, desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos. O presente estudo visou melhorar a qualidade microbiológica e sensorial do produto queijo ralado. Este projeto é de grande interesse para as indústrias produtoras de queijo ralado por ser uma grande inovação tecnológica para este tipo de produto.

Este estudo teve como objetivo desenvolver um processo utilizando a aplicação do ozônio para a conservação de queijo ralado. Como objetivos específicos: avaliar a conservação dos queijos ralados e danos químicos frente a aplicação de ozônio e adição do conservador químico ácido sórbico; avaliar o efeito da aplicação de ozônio sobre as características sensoriais do produto.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento prático deste trabalho a empresa Rasip Alimentos LTDA, Unidade Láctea cedeu os seus equipamentos, matérias-primas e laboratórios. A Rasip Alimentos LTDA está localizada na cidade de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil.

O queijo ralado foi obtido em duas variedades:

- a) **Queijo Tipo Grana Ralado:** formulação 100% queijo Tipo Grana produzido na própria empresa.
- b) **Queijo Parmesão Ralado:** formulação 75% queijo Parmesão e 25% de queijo Tipo Grana ambos produzidos na própria empresa.

2.1 Adição do O₃ em queijos ralados

O equipamento que foi utilizado para os testes é um gerador de O₃ modelo IDP 20, da marca O3R. O abastecimento de ar ao equipamento ocorre através de compressores, os quais geram ar mais puro e com baixo teor de umidade.

Foram realizados testes de adição de O₃ no ar que entra no secador em duas etapas diferentes no processo de desidratação: 1º) nos primeiros 10 minutos de aquecimento do queijo ralado; 2º) nos três minutos finais de resfriamento (nesta etapa o O₃ não entra em contato com o calor gerado na desidratação).

As quantidades de O₃ que foram escolhidas para serem aplicadas nos testes seguem detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de O₃ aplicado nos queijos durante a o processo de desidratação

Experimento	Etapa de aplicação do processo de desidratação	Produção de O₃ (mg de O₃ / kg de queijo desidratado)
B1		0
B2		9
B3	10 minutos durante aquecimento	23
B4		31
B5		38
B6		0
B7		3
B8	3 minutos finais durante resfriamento	7
B9		9
B10		11

A matéria-prima passou pelo processo de ralagem e após esta etapa foi coletada uma amostra de queijo ralado em triplicata, para avaliação do queijo ralado antes do processo de adição de ozônio e desidratação. Após o processo de desidratação e tratamento com O₃, as amostras de queijo ralado foram novamente coletadas em triplicata enviadas ao laboratório da empresa Rasip.

Em todas as amostras coletadas nesta etapa foram realizadas análises de bolores e leveduras nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias e análises físico-químicas: gordura, umidade, rancidez oxidativa e atividade de água.

2.2 Conservação do queijo ralado com uso de O₃ e ácido sórbico

A matéria-prima foi ralada e após foi enviada para a desidratação, onde ocorreu a adição do conservador ácido sórbico e tratamento com O₃ conforme determinado em cada formulação.

Os queijos ralados foram coletados em porções de 100 g. As porções foram armazenadas em câmara de estocagem própria para produtos lácteos em uma temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 150 dias. O queijo ralado foi acondicionado em embalagens plásticas padrão para queijo ralado, seladas em máquina embaladora específica. Os queijos ralados foram analisados no tempo zero logo após a produção e também ao longo do tempo de prateleira. Foram realizadas análises de bolores e leveduras para avaliação da estabilidade microbiológica e também foram realizadas análises de ácido sórbico, gordura, umidade, atividade de água e ácidos graxos.

Também foi realizada a análise sensorial dos queijos ralados fabricados com a nova tecnologia verificando a aceitabilidade e também os atributos ressaltados através da metodologia CATA (*Check All That Apply*) ou marque tudo que se aplica.

2.3 Análise de ácidos graxos

A análise de ácidos graxos foi realizada nos queijos ralados logo após a produção de acordo com a metodologia detalhada abaixo.

2.3.1 Preparo dos Ésteres Metílicos

Os ácidos carboxílicos foram derivatizados a ésteres metílicos, por possuírem volatilidade e estabilidade térmica adequadas para serem determinadas por cromatografia a gás. Realizou-se a esterificação no Laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentos (CEPA), na cidade Passo Fundo, Rio Grande do Sul. A gordura extraída foi contida em um algodão e transferida para um tubo de vidro com tampa. Adicionou-se 4 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio $0,5\text{ mol L}^{-1}$, para solubilizar a gordura no meio. A seguir, fechou-se o tubo e o conteúdo foi aquecido em banho-maria em temperatura de ebulição por 5 minutos até a total dissolução dos glóbulos de gordura, o tubo foi retirado do banho-maria e resfriado sob água corrente. Então, 5 mL de solução esterificante foram adicionadas ao tubo, o mesmo novamente fechado e aquecido em banho-maria por 5 min. A solução esterificante é composta por cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico, sendo, o metanol o agente esterificante e o ácido sulfúrico o reagente com função de neutralizar a base para a esterificação, garantindo assim, que o processo ocorra. Após este tempo, o tubo foi resfriado e nele adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl, com o objetivo de solvatar a água e deixar a fase orgânica mais disponível, em seguida o tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos. Ao final, adicionou-se ao tubo 5 mL de hexano. O tubo foi novamente agitado vigorosamente e após a separação das fases, a fase orgânica (sobrenadante), onde estão contido os ésteres

metílicos, foi retirada. Foi injetado 1 μ L de cada amostra no cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas.

2.4 Análise dos ácidos graxos por cromatografia a gás

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do CEPA, cidade Passo Fundo, Rio Grande do Sul. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada utilizando-se cromatografia à gás acoplada a um espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo GCQT8030. Efetuou-se a separação cromatográfica usando-se uma coluna RTXWAX 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, com a seguinte programação de temperatura: 60 °C (por 2 min.), aumentando a temperatura em 10 °C/min. até 200°C (0 min.) e em seguida, 5 °C/min. até 240 °C (5 min.). Utilizou-se uma razão de split de 1:50. O gás de arraste utilizado foi o hélio ultrapuro, com vazão de 1,8 mL/min. A temperatura do injetor, da fonte ionização e da interface foi de 250 °C.

2.5 Tratamento dos dados

Os resultados obtidos neste estudo foram avaliados ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95 %.

2.6 Análise sensorial

O projeto foi encaminhado ao comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo, número do parecer 2.642.625, antes da realização da análise sensorial, sendo aprovado pela Comissão de avaliação.

A aplicação dos testes de análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo.

Por se tratar de uma pesquisa com seres humanos, a análise sensorial exigiu o termo de consentimento livre e esclarecido, como apresentado no Apêndice A. Não puderam fazer parte desta pesquisa os participantes alérgicos ao leite. Para isso, utilizou-se uma ficha de avaliação, conforme apresentado no Apêndice B.

O levantamento dos termos descritivos foi realizado por um painel de 15 avaliadores previamente selecionados, utilizando o método rede ou Kelly's Repertory Grid Method segundo Moskowitz (1983). Foram utilizadas as amostras de queijo ralado controle e queijo ralado tratado com O₃ para representar a variação entre as amostras a serem analisadas posteriormente, devido a diferenças quanto às características sensoriais.

As amostras foram apresentadas em pares aos avaliadores. Solicitou-se para que descrevessem as similaridades e diferenças percebidas entre as amostras com relação à aparência e cor, aroma, sabor e textura. Após o levantamento dos termos descritivos pelo método de rede e de acordo com o consenso da equipe, foi elaborada uma lista de termos que melhor caracterizava as amostras. A lista com os termos foi utilizada para a aplicação da metodologia CATA (*Check All That Apply*) ou marque tudo que se aplica.

Os consumidores, totalizando 50, receberam as amostras das 4 formulações de queijo ralado (queijo Tipo Grana ralado: amostra controle e a tratada com O₃; queijo Parmesão ralado: amostra controle e a tratada com O₃), de forma monádica, aleatorizadas e codificadas, utilizando luz branca, e uma ficha (Apêndice C) para avaliar os 2 testes propostos, sendo, aceitabilidade e CATA. Entre cada amostra, foi disponibilizada água para os participantes realizarem a limpeza da cavidade oral.

A lista com os atributos sensoriais foi utilizada para os consumidores selecionarem o que caracterizava a amostra, de forma fácil e rápida (ARES et al., 2014).

A aceitabilidade é um teste afetivo que expressa o quanto o consumidor gostou ou desgostou da amostra. O teste foi aplicado utilizando uma escala hedônica, balanceada com o mesmo número de categorias positivas e negativas. A consideração de aceitabilidade da amostra foi com índice de aceitabilidade igual ou superior a 70 % (DUTCOSKY, 1996).

O índice de aceitabilidade foi calculado utilizando a Equação 1.

$$IA (\%) = A \times \frac{100}{B} \quad (3)$$

Em que:

A = nota média obtida para o produto;

B = nota máxima dada ao produto.

2.7 Tratamento dos dados

O índice de aceitabilidade foi calculado para todos os atributos avaliados. Os resultados das formulações de queijo ralado foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95 %.

A análise dos dados obtidas com a metodologia CATA foi realizada através de análise estatística multivariada (Análise de Componentes Principais) utilizando o Programa *Statistica* 7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Adição do O₃ em queijos ralados

Em relação a alteração química nos queijos ralados, foram realizadas as análises de rancidez oxidativa no tempo zero, as quais apresentaram resultado negativo para todas as análises, conforme pode ser observado na Tabela 2. A análise de rancidez oxidativa foi realizada nos queijos ralados antes do processo de desidratação e após a desidratação com adição de O₃, representando assim que a injeção do O₃ na etapa de desidratação e resfriamento do queijo ralado não provocou oxidação nos lipídeos ali presentes.

Tabela 2 - Análise de Rancidez Oxidativa em queijos ralados após o tratamento com O₃

Experimento	Etapa de aplicação do processo de desidratação	Produção de O ₃ (mg de O ₃ / kg de queijo desidratado)	Rancidez Oxidativa Queijo Tipo Grana ralado	Rancidez Oxidativa Queijo Parmesão ralado
B1		0	negativo	negativo
B2		9	negativo	negativo
B3	10 minutos durante aquecimento	23	negativo	negativo
B4		31	negativo	negativo
B5		38	negativo	negativo
B6		0	negativo	negativo
B7		3	negativo	negativo
B8	3 minutos finais durante resfriamento	7	negativo	negativo
B9		9	negativo	negativo
B10		11	negativo	negativo

Quanto a análise microbiológica, pôde ser observada que a contaminação inicial do queijo Parmesão ralado foi em média superior a contaminação do queijo Tipo Grana ralado, mas mesmo assim puderam ser observados níveis de redução de bolores e leveduras de até 99 % para ambos os queijos.

Os testes de injeção de O₃ foram realizados em duas etapas diferentes da desidratação dos queijos ralados. No primeiro caso o O₃ foi adicionado durante os 10 minutos iniciais do processo de desidratação dos queijos ralados e no segundo caso o O₃ foi adicionado nos 3 minutos finais do processo de desidratação, onde ocorre o resfriamento do queijo ralado, não havendo assim a interferência do calor no processo de injeção de O₃, e assim sendo possível um comparativo se o calor de 65 °C no processo de desidratação interfere na eficiência do O₃.

A uma injeção de 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado, já pôde ser percebida uma redução de 96 % dos bolores e leveduras. A redução máxima de bolores e leveduras deu-se a uma aplicação de 31 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de desidratação, durante 10 minutos,

a qual foi de 99 % para o queijo Parmesão ralado e 97 % para o queijo Tipo Grana ralado e também a uma aplicação de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento, durante 3 minutos, a qual foi de 98 % para o queijo Parmesão ralado e para o queijo Tipo Grana Ralado.

Pode-se observar que os resultados de redução de bolores e leveduras a uma exposição de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento foi mais eficiente, onde a quantidade de O₃ por kg de queijo foi menor e o tempo também, somente 3 minutos, sendo que a 31 mg O₃ / kg de queijo desidratado o produto ficou exposto por 10 minutos e obteve o resultado muito similar e a 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de desidratação o percentual foi menor, 94 % para o queijo Parmesão ralado e 91 % para o queijo Tipo Grana ralado.

Os resultados apresentados a uma injeção de O₃ a 11 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 38 mg O₃ / kg de queijo desidratado ficaram com uma redução de bolores e leveduras abaixo do que para as injeções 31 mg O₃ / kg de queijo desidratado; 23 mg O₃ / kg de queijo desidratado; 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado, isto se deu provavelmente porque tivemos neste caso uma menor produção de O₃ do que o informado pelo equipamento (11 mg O₃ / kg de queijo e 38 mg O₃ / kg de queijo).

De acordo com outros autores, Wickramanayake (1991), Serra et al. (2003), Lanita e Silva (2008), Pinto et al. (2007), Alexopoulos et al. (2017), que avaliaram em suas pesquisas a redução de bolores e leveduras com a aplicação do O₃, se os fatores de tempo e concentração de O₃ estiverem configurados corretamente, a ozonização pode ser uma abordagem promissora salvaguardando a produção de produtos alimentícios, onde em suas pesquisas houveram grandes reduções de contagens de bolores e leveduras, conforme esta pesquisa apresentou também.

Quando o produto completou 30 dias de validade foi realizada a análise de bolores e leveduras, porém os resultados para os dois tipos de queijos e em todas as concentrações testadas foram muito elevados e na análise dos queijos já percebeu-se a presença de mofo visual. Sendo assim, a análise da estabilidade microbiológica desta etapa encerrou-se nos 30 dias de estocagem do produto visto que não houve estabilidade microbiológica ao longo do tempo de prateleira.

Ao finalizar a etapa 2, têm-se que ao analisar somente o tempo zero, a 23 mg O₃ / kg de queijo desidratado e 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado, já é possível obter uma grande redução de bolores e leveduras, tanto na etapa de desidratação do queijo ralado, onde houve uma exposição durante 10 minutos, quanto na etapa de resfriamento, onde houve uma exposição durante 3 minutos. Se levado em consideração o tempo de exposição, a etapa de resfriamento

apresentou os melhores resultados, sendo que a 7 mg O₃ / kg de queijo desidratado por 3 minutos ocorreu uma redução mínima de 96 % em ambos os queijos ralados.

Ou seja, a adição do O₃ na etapa de desidratação do queijo ralado é influenciada pelo calor de 65 °C pois, as moléculas de O₃ podem sofrer uma degradação a esta temperatura e voltar a sua forma de oxigênio, conforme outros autores mencionam no caso do O₃ em meio aquoso, quanto maior a temperatura, maior a degradação do O₃. Outro fator é que a etapa de desidratação do queijo ralado é responsável por uma redução média de 70 % dos bolores e leveduras presentes nos queijos ralados sem a ação do ácido sórbico ou O₃.

Embora tenha-se observado uma redução de bolores e leveduras de até 99 % no tempo zero, quando observamos o produto armazenado em teste de prateleira o crescimento de bolores e leveduras foi exponencial, não havendo nenhuma estabilidade microbiológica com o passar do tempo. Com isso é possível dizer que o O₃ age momentaneamente na redução dos bolores e leveduras, mas que, para manter a estabilidade microbiológica dos queijos ralados ao longo da vida de prateleira é necessário um outro agente antimicrobiano na formulação, neste caso o ácido sórbico, que é o conservador permitido em queijo ralados.

Com o experimento de exposição do queijo ralado ao O₃ em um menor tempo as chances de alterações químicas reduzem também, já que as exposições a grandes fatores de oxidação são reduzidas. Para dar sequência na etapa 3 a concentração de ozônio escolhida foi 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa do resfriamento durante 3 minutos.

3.2 Conservação do queijo ralado com uso de O₃ e ácido sórbico

3.2.1 Formulações dos experimentos

As formulações dos experimentos seguem detalhadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Formulação para produção de queijo Tipo Grana ralado

Experimentos	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C11 (padrão)	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C12	Queijo Tipo Grana ralado	Com tratamento	0,08%	15 ± 1 %
C13	Queijo Tipo Grana ralado	Sem tratamento	0,08%	15 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

Tabela 4 - Formulação para produção de queijo Parmesão ralado

Experimentos	Tipo de Queijo	Tratamento com O ₃	Concentração Ácido Sórbico	Umidade média
C14 (Padrão)	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	13 ± 1 %
C15	Queijo Parmesão ralado	Com tratamento	0,08%	15 ± 1 %
C16	Queijo Parmesão ralado	Sem tratamento	0,08%	15 ± 1 %

Tratamento com O₃: injeção de 9 mg O₃ / kg de queijo desidratado na etapa de resfriamento por 3 minutos.

3.2.2 Análises físico-químicas

Após a produção dos experimentos de queijos ralados com as formulações determinadas, foram realizadas análises de umidade, gordura e atividade de água, conforme podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 5 - Análise físico-química queijos ralados

Formulação	Umidade (%)	Gordura (%)	Aw	Teor residual de ácido sórbico (%)
C11	13,20 ± 0,01 ^b	37,9 ± 0,34 ^f	0,681 ± 0,010 ^b	0,06 ± 0,01 ^a
C12	15,12 ± 0,09 ^d	36,2 ± 0,10 ^d	0,702 ± 0,000 ^d	0,06 ± 0,01 ^a
C13	15,00 ± 0,01 ^c	36,4 ± 0,34 ^e	0,712 ± 0,010 ^c	0,05 ± 0,01 ^a
C14	13,10 ± 0,02 ^a	35,5 ± 0,87 ^c	0,691 ± 0,010 ^c	0,06 ± 0,01 ^a
C15	16,56 ± 0,06 ^f	34,1 ± 0,27 ^a	0,720 ± 0,010 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
C16	16,21 ± 0,05 ^e	34,6 ± 0,39 ^b	0,720 ± 0,000 ^a	0,06 ± 0,01 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).; C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

Pode-se observar que os experimentos de queijo ralado padrão mantiveram a umidade em média de 13 % e os demais experimentos a uma umidade mais próxima de 15 % e a atividade de água ficou próxima a 0,7.

3.2.3 Análise de estabilidade microbiológica

Ao longo do tempo de prateleira, que são 150 dias, foram realizadas análises de bolores e leveduras dos novos experimentos para avaliação da estabilidade microbiológica. As análises de bolores e leveduras podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 - Análise de bolores e leveduras queijo Tipo Grana Ralado

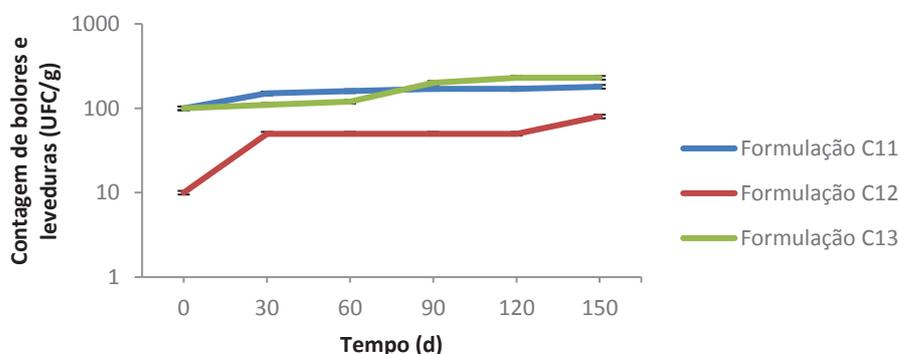
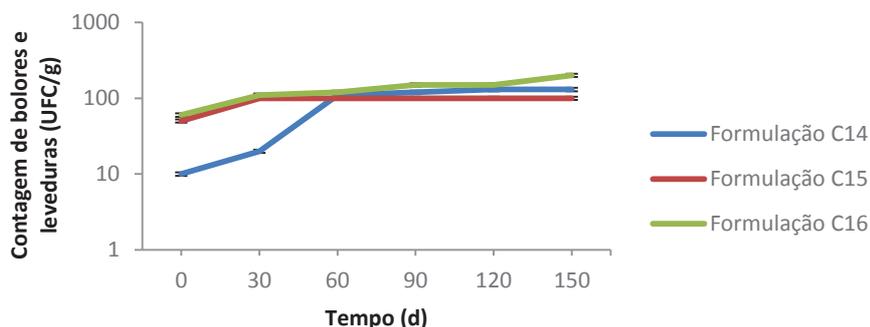


Figura 2 - Análise de bolores e leveduras queijo Parmesão ralado



É possível perceber o surgimento de uma estabilidade microbiológica em todas as formulações. Nas formulações C11 e C14 temos o queijo ralado padrão com umidade baixa, com média de $13\% \pm 1\%$ fator este que auxiliou na estabilidade microbiológica, já que a atividade de água também é reduzida e sendo assim mantendo o queijo ralado em condições favoráveis por um período de tempo mais longo.

Nas formulações C12 e C15 temos a umidade das amostras em média de $15\% \pm 1\%$ e a adição do ozônio, e foi percebida um crescimento de bolores e leveduras muito baixo e estável, sendo assim satisfatório. Nas formulações C13 e C16 onde também temos a umidade em torno de $15\% \pm 1\%$, porém não ocorreu a adição do ozônio, também foi possível perceber um baixo crescimento microbiológico, porém ainda se destacando positivamente as formulações C12 e C15 com a adição do ozônio.

Todas as formulações atenderam os requisitos de bolores e leveduras estabelecidos na RDC 357/1997 - Regulamento para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado (BRASIL, 1997).

3.2.4 Análises de composição de ácidos graxos

Para uma avaliação mais precisa dos danos que o O_3 possa ter causado na estrutura química dos queijos ralados, foi realizada a análise da composição dos ácidos graxos dos experimentos comparando os experimentos que sofreram tratamento com O_3 dos que não sofreram tratamento com ozônio. Os resultados seguem apresentados nas Tabelas 6 e 7 para ácidos graxos saturados e insaturados.

Tabela 6 - Análise de ácidos graxos saturados (%)

Ácidos graxos saturados		Quantidade de ácidos graxos (%) nos experimentos					
Simbologia	Nomenclatura	C11	C12	C13	C14	C15	C16
C12:0	Ácido láurico	0,61±0,03 ^{ab}	0,54±0,02 ^a	0,75±0,03 ^a	0,71±0,08 ^b	0,68±0,07 ^{ab}	0,66±0,02 ^a
C14:0	Ácido mirístico	2,86±0,07 ^{ab}	2,63±0,05 ^a	3,67±0,02 ^c	3,10±0,07 ^b	2,91±0,17 ^{ab}	4,00±0,05 ^c

C16:0	Ácido palmítico	12,77±0,05 ^b	12,20±0,05 ^a	14,09±0,03 ^c	13,22±0,38 ^b	12,16±0,02 ^a	14,66±0,02 ^d
C18:0	Ácido esteárico	5,97±0,01 ^a	5,85±0,04 ^a	5,73±0,05 ^{ab}	5,53±0,18 ^{ab}	5,34±0,15 ^b	5,91±0,04 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão; C15 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

Tabela 7 - Análise de ácidos graxos insaturados (%)

Ácidos graxos insaturados		Quantidade de ácidos graxos (%) nos experimentos					
Simbologia	Nomenclatura	C11	C12	C13	C14	C15	C16
C16:1	Ácido palmitoléico	0,52±0,02 ^{ab}	0,50±0,03 ^a	0,68±0,02 ^c	0,46±0,05 ^a	0,53±0,08 ^{ab}	0,65±0,05 ^{bc}
C18:1	Ácido oléico	13,63±0,07 ^c	13,07±0,08 ^a	12,63±0,03 ^a	11,17±0,54 ^b	11,10±0,11 ^b	12,57±0,07 ^a
C18:1 TRANS	Ácido elaidico	0,11±0,05 ^a	0,10±0,02 ^a	0,14±0,06 ^a	0,12±0,08 ^a	0,10±0,03 ^a	0,05±0,01 ^a
C18:2	Ácido linoleico	1,40±0,06 ^{ab}	1,27±0,05 ^{abc}	1,33±0,01 ^{ab}	1,13±0,09 ^c	1,25±0,04 ^{ac}	1,44±0,03 ^b

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão; C15 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

Pode-se observar que houve uma leve diminuição dos ácidos graxos saturados nos queijos ralados tratados com O₃, porém não havendo diferenças significativas entre os experimentos tratados com O₃ quando comparados aos que não receberam tratamento com O₃, exceto em relação ao ácido palmítico, onde estatisticamente pode-se observar uma diferença significativa.

Para a composição de ácido láurico, ácido mirístico e ácido esteárico os queijos ralados padrão quando comparados com os queijos ralados que receberam tratamento com O₃ não apresentaram diferenças significativas. Quando comparado um tipo de queijo com o outro, apresentaram diferenças significativas para o ácido mirístico e esteárico.

Os queijos ralados tratados com O₃ apresentaram diferenças significativas para a composição de ácido palmítico quando comparado aos experimentos sem tratamento com O₃. Se comparado um tipo de queijo com o outro, não apresentaram diferenças significativas para o ácido palmítico.

Analisando a Tabela 7 onde tem-se os resultados da composição de ácidos graxos insaturados dos experimentos, pode-se observar que na maioria dos casos houve redução dos ácidos graxos, porém sem diferenças significativas quando comparados os queijos ralados sem tratamento com O₃ com os experimentos tratados com O₃. Quando comparado um tipo de queijo com o outro somente houve diferença significativa para o ácido oléico.

A análise da composição de ácidos graxos foi fundamental para concluir que os danos causados pela ação do O₃ são mínimos, já que praticamente não houveram diferenças

significativas entre os experimentos tratados com O₃ em relação aos que não receberam tratamento com O₃, exceto para o ácido graxo saturado palmítico que houve uma diferença.

Como este estudo utilizou como matéria prima os queijos maturados Tipo Grana e Parmesão, deve ser levado em consideração que, além da ação do O₃ sobre os ácidos graxos, durante o processo de maturação ocorre a lipólise das gorduras com formação de ácidos graxos de baixo peso molecular. Tais reações ocorrem por ação dos microrganismos presentes e/ou através de enzimas adicionadas especificamente para esse fim. Os principais ácidos formados são butírico, caprótico, caprílico, cáprico e láurico; sua proporção relativa varia de acordo com o agente lipolítico utilizado o qual, por sua vez, é escolhido de acordo com o queijo. Embora a maturação esteja longe de ser um processo completamente entendido, já se sabe que a glicólise é efetuada integralmente pela microbiota láctica iniciadora, enquanto que a lipólise e a proteólise requerem a participação também da microbiota secundária para se completarem (PERRY, K, 2004).

No estudo de Malacarne et al. (2009) o teor de ácidos graxos livres aumentou continuamente ao longo de 24 meses de maturação do queijo Parmigiano Reggiano. A comparação das partes das peças de queijo mostrou uma distribuição não foi uniforme para o processo lipolítico. As porções periféricas da forma de queijo foram caracterizadas por um maior teor de ácidos graxos livres do que a região interna. Isso foi consistente com o "centrípeto" tendência do processo bioquímico responsável pelo amadurecimento de Queijo Tipo Grana. Os processos enzimáticos responsáveis para a hidrólise de triglicerídeos mostrou uma especificidade para ácidos graxos de cadeia curta, que proporcionalmente (em relação ao soma dos ácidos graxos individuais) aumentou durante a maturação.

Para McCarthy et al. (2017) as concentrações de ácidos graxos livres aumentaram gradualmente em queijos gordurosos, reduzidos em gordura e meio gordos durante a maturação, até certo ponto dependente dos níveis de gordura e sal.

3.2.5 Análise sensorial

3.2.5.1 Análise de aceitabilidade

Na Tabela 8 estão apresentados os valores médios para cada atributo das amostras de queijos ralados utilizados para avaliar a aceitabilidade do consumidor.

Analisando a avaliação da aceitabilidade dos queijos ralados, pode-se perceber que para todos os atributos, exceto sabor, não houveram diferenças significativas entre os experimentos.

Pode-se observar que para os experimentos de queijo Tipo Grana ralado e para o queijo Parmesão ralado o atributo da cor da amostra foi o melhor pontuado, seguido da aparência e o menos pontuado foi o sabor.

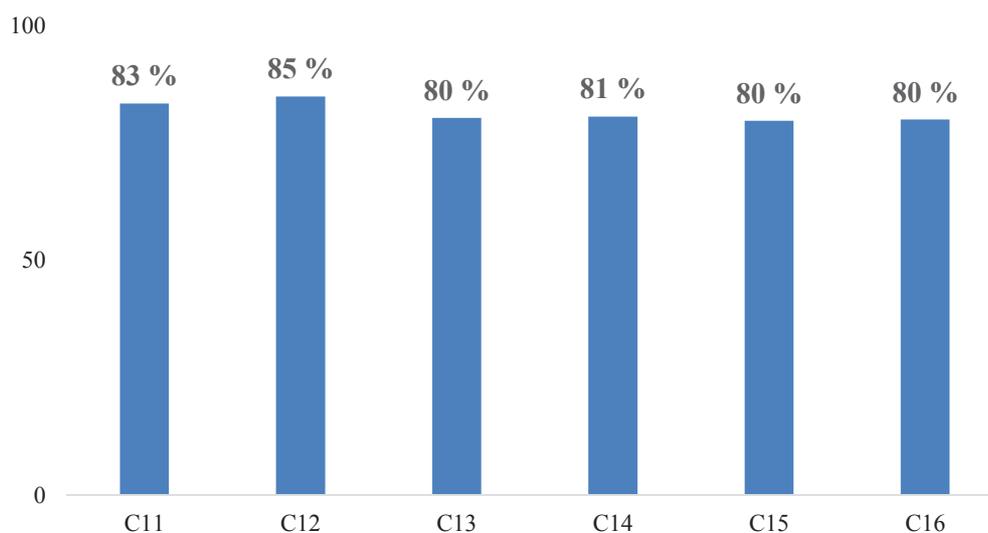
Tabela 8 - Médias dos atributos utilizados para avaliar a aceitabilidade do consumidor para os queijos ralados

Experimentos	C11	C12	C13	C14	C15	C16
Cor	8,06 ± 1,11 ^a	7,86 ± 1,27 ^a	8,02 ± 1,10 ^a	7,87 ± 1,12 ^a	7,80 ± 1,18 ^a	7,72 ± 1,02 ^a
Textura	7,56 ± 0,99 ^a	7,68 ± 1,06 ^a	7,36 ± 1,22 ^a	7,18 ± 1,14 ^a	7,38 ± 1,09 ^a	7,38 ± 1,25 ^a
Aparência	7,78 ± 1,11 ^a	7,82 ± 1,03 ^a	7,38 ± 0,89 ^a	7,74 ± 1,10 ^a	7,60 ± 1,16 ^a	7,40 ± 1,06 ^a
Odor/Aroma	7,16 ± 1,60 ^a	7,51 ± 1,34 ^a	7,32 ± 1,50 ^a	7,36 ± 1,38 ^a	6,84 ± 1,58 ^a	7,36 ± 1,32 ^a
Sabor	7,08 ± 1,60 ^{ab}	7,45 ± 1,44 ^b	6,71 ± 1,61 ^{ab}	6,31 ± 2,03 ^a	6,57 ± 1,95 ^{ab}	6,70 ± 1,46 ^{ab}
Impressão Global	7,35 ± 1,33 ^a	7,51 ± 1,37 ^a	7,12 ± 1,22 ^a	7,18 ± 1,45 ^a	6,90 ± 1,66 ^a	7,08 ± 1,40 ^a

Resultados de média ± desvio padrão; Valores seguidos de letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão; C15 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

De acordo com a Figura 3, nota-se que a amostra mais aceita foi a de queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ com 95 % de aceitabilidade, seguido das amostras padrão de queijo Tipo Grana ralado com 83 % e queijo Parmesão ralado com 81 % de aceitabilidade.

Figura 3 - Índice de aceitabilidade (%)



C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão; C15 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

O índice de aceitabilidade com boa repercussão tem sido considerado $\geq 70\%$ (DUTCOSKY, 1996). Considerando o presente trabalho, todos os experimentos ficaram com índice de aceitabilidade acima de 80 %.

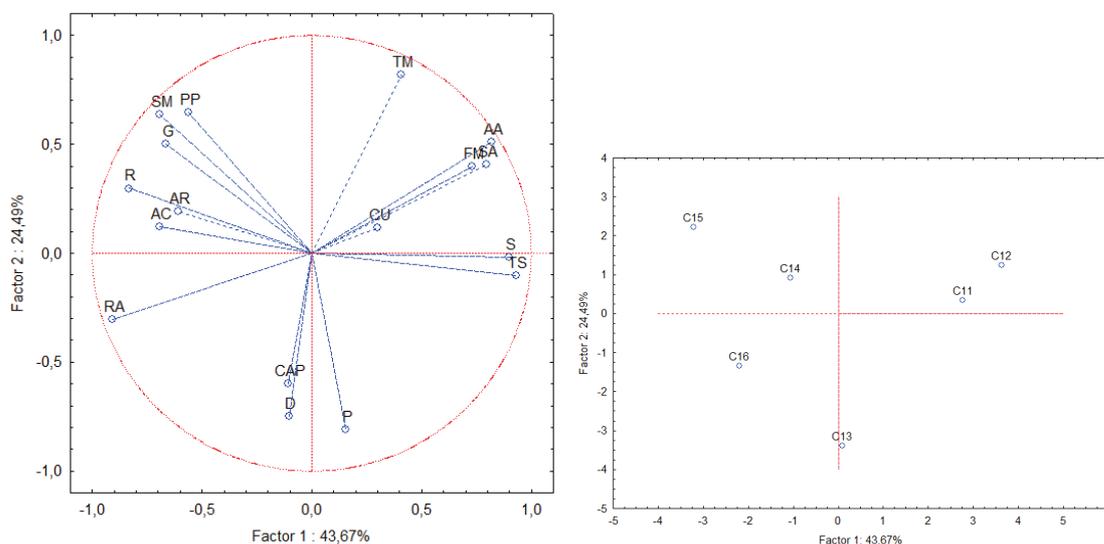
3.2.5.2 Análise CATA

A utilização da metodologia CATA é uma boa ferramenta para coletar informações sobre a percepção dos consumidores em relação às características sensoriais dos produtos, isso pode contribuir para as melhorias no desenvolvimento do produto (BRUZZONE et al., 2015).

O questionário CATA tem como finalidade reunir as informações dos produtos em relação à percepção das características sensoriais do consumidor. A análise dos componentes principais do método CATA, representado na Figura 4 mostra que a variabilidade das amostras pôde ser explicada 68,16 % por dois componentes principais.

O componente 1 se caracterizou mais acentuadamente pelos atributos aroma de creme de leite, residual amargo, textura seca e solto enquanto que o componente 2 ficou mais marcado pelos atributos textura macia, cor amarelo palha, duro e picante.

Figura 4 - Projeção dos atributos sensoriais para as amostras de queijo ralado a partir da análise CATA.



RA: residual amargo; CAP: cor amarelo palha; S: solto; FM: fiapos médios; A: adesividade; PP: presença de pontos verdes; TS: textura seca; SM: sabor de mofo; CU: cor uniforme; D: duro; R: ranço; P: picante; AA: aroma adocicado; TM: textura macia; G: gorduroso; AR: ardido; AC: aroma de creme de leite, SA: sabor adocicado. C11 – queijo Tipo Grana Ralado Padrão; C12 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C13 – Queijo Tipo Grana ralado com 0,08 % de ácido sórbico sem tratamento com O₃; C14 – queijo Parmesão ralado Padrão; C15 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico + tratamento com O₃; C16 – Queijo Parmesão ralado com 0,08% de ácido sórbico sem tratamento com O₃.

O queijo Tipo Grana ralado padrão (C11) e o queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ (C12) foram mais bem representados pelos atributos textura seca, solto, cor uniforme, fiapos

médios, sabor adocicado e aroma adocicado. Já o queijo Tipo Grana ralado sem tratamento com O₃ (C13) foi representado pelos atributos picante, duro e cor amarelo palha.

Enquanto que para o queijo Parmesão ralado padrão (C14) e para o queijo Parmesão ralado tratado com O₃ (C15), os atributos que mais se destacaram foram ardido, presença de pontos verdes, ranço, gorduroso e aroma de creme de leite. E para o queijo Parmesão ralado sem tratamento com O₃ (C16) os atributos que mais se acentuaram foi o residual amargo.

O queijo Tipo Grana ralado padrão (C11) apresenta atributos sensoriais semelhantes aos do queijo Tipo Grana ralado tratado com O₃ a 15 % de umidade (C12) por estarem no mesmo quadrante como pode ser observado na Figura 19. Já o queijo Tipo Grana sem tratamento com O₃ a 15 % de umidade (C13) apresentou atributos diferentes dos demais por ter ficado situado em outro quadrante.

O queijo Parmesão ralado com e sem tratamento com O₃ com umidade de 15 % ficaram no mesmo quadrante e assim havendo relação, já o queijo Parmesão padrão ficou em outro quadrante, não se relacionando com os outros dois e se acentuando o atributo de residual amargo.

Os atributos que apareceram com maior frequência nas quatro formulações de queijos ralados foram: Cor amarelo palha, solto, fiapos médios, textura seca, cor uniforme e duro. O queijo Parmesão ralado padrão foi mais vezes citado com textura rugosa, residual amargo e duro do que para o Queijo Tipo Grana ralado Padrão e com adição de O₃.

Um fator positivo foi que as amostras com adição de O₃ apresentaram menor pontuação para o item textura seca do que as amostras padrão, ou seja, mesmo com a umidade média de 15 % ± 1 % já é possível sentir uma textura melhor do que a amostra padrão que possui umidade média de 13 % ± 1 %.

No atributo ranço, o qual é muito importante para esta pesquisa, onde podemos comparar as amostras com tratamento de O₃ e sem tratamento com O₃, percebe-se que as amostras foram pouco pontuadas neste atributo, sendo a formulação mais pontuada a de queijo Parmesão ralado com adição de O₃ e a amostra menos pontuada foi a de queijo Tipo Grana ralado com tratamento de O₃, a análise sensorial coincide com os resultados obtidos na análise realizada para composição de ácidos graxos, onde foi constatado diferença significativa entre amostras, porém diferenças pequenas.

Quando se observa a análise sensorial frente a análise da composição de ácidos graxos, pode-se perceber que o ozônio oxidou uma fração muito pequena dos ácidos graxos que compõe a estrutura química dos queijos ralados, porém a composição de ácidos graxos quando olhada estatisticamente apresentou pequenas diferenças significativas entre as amostras analisadas

($p > 0,05$). Analisando estudos de outros autores sobre a aplicação de O_3 e seus efeitos sobre os ácidos graxos dos alimentos, análise sensorial e rancidez oxidativa, encontram-se diversos resultados e conclusões, positivos e negativos.

Roberto et al. (2016) estudaram o efeito do O_3 sobre a composição dos ácidos graxos do produto amendoim, no que se refere à qualidade dos grãos ozonizados, e não foi detectada variação significativa para o percentual de ácidos graxos e índice de peróxidos ($p > 0,05$).

De acordo com o estudo dos autores Kim et al. (2003), o ozônio teve um efeito negativo na qualidade sensorial de alguns produtos como grãos, especiarias e leite em pó, devido à oxidação de lipídios. Porém, outros investigadores demonstraram que o tratamento com ozônio melhorou a qualidade sensorial em carne de boi e de ovos e não alterou significativamente a qualidade sensorial de algumas frutas e legumes. Lanita e Silva (2008) não constataram o surgimento de processos adicionais de rancidez oxidativa em queijo parmesão submetido à ação do ozônio durante a maturação. O poder de oxidação do O_3 pode provocar descoloração e odores indesejáveis em alguns alimentos, ou componentes nutricionais como vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais podem ser alterados pela oxidação (KIM et al., 2003).

Compostos voláteis relacionados à oxidação lipídica, como heptanal e hexanal, foram observados em concentração crescente na farinha após tratamento com ozônio (OBADI et al., 2018). A solução de gás ozônio e ozônio tem sido aplicada para modificar as funcionalidades de vários produtos de grãos, incluindo proteína, amido e farinha. Os tratamentos com intensidade excessiva tendem a oxidar os componentes químicos, eliminando em grande parte as micotoxinas e fungos relacionados. O tratamento introduz grupos carbonilo e carboxilo no amido, cria dissulfeto de ligações em proteínas, oxida os lipídios, diminui os teores de polifenóis e inativar as enzimas endógenas (ZHU, 2018).

Apesar desses obstáculos técnicos, o ozônio tem se mostrado eficaz na descontaminação de vários alimentos. Os benefícios do ozônio, em muitos casos, superam as desvantagens e suas aplicações em alimentos devem aumentar em popularidade nos próximos anos (CHAWLA et al., 2012).

Comparando-se os resultados obtidos nesta pesquisa (onde somente foi realizado tratamento com O_3) com outros métodos existentes, tais como: radiofrequência, micro-ondas, radiação ultravioleta, irradiação, processamento a altas pressões, luz pulsada, entre outros, tem-se que cada método possui seus pontos positivos e negativos, e todos os métodos existentes causam reduções de populações microbianas nos alimentos. Todos estes métodos são promessas para o futuro da segurança alimentar, o que depende muito é o valor a ser investido

nestes equipamentos, legislação ainda pouco existente ou não existente e a realização de testes no alimento que se pretende trabalhar (KHAN et al., 2017).

No estudo de Thierry et al. (2017) é relatado que a relação entre gordura e sabor dos produtos lácteos é complexo. Primeiro que a gordura é um “reservatório” de sabores, porque a maioria dos sabores compostos são mais solúveis em gordura do que em água. A interface entre as várias fases da matriz dos queijos fornece um local onde podem ocorrer diversas reações de formação de sabor. Em segundo lugar, a proporção e estrutura de gordura pode afetar a reologia do produto, e assim sua dispersão na boca. Como resultado a dispersão de compostos de sabor e a percepção do sabor pode ser modificado. Em terceiro lugar, gordura, e especialmente triglicerídeos, são precursores de compostos de sabor, tais como ácidos graxos livres, ésteres, tioésteres, metil cetonas, álcoois secundários e lactonas, que são comumente produzidos durante a maturação do queijo.

4 CONCLUSÃO

Com a aplicação de O₃ em queijo ralado na etapa de desidratação, as contagens de bolores e leveduras foram reduzidas em até 99 % quando analisadas no tempo zero. Porém, para a conservação do produto queijo ralado ao longo da vida de prateleira, somente a ação do O₃ não foi suficiente para garantir uma estabilidade microbiológica, para tanto é necessário adicionar um outro agente conservador, no caso o conservador químico permitido em queijos ralados, o ácido sórbico

Avaliando o impacto da ação do O₃ sobre os queijos ralados, não foi detectada variação significativa para a composição de ácidos graxos e atributos sensoriais. Os produtos tratados com O₃ apresentaram alterações significativas, porém pequenas, ficando muito parecidos com o padrão, onde se ressaltaram os atributos cor amarelo palha, solto, fiapos médios, textura seca, cor uniforme e duro. Diante disso, este estudo mostrou elevada aceitabilidade tanto para os queijos ralados padrão quanto para os experimentos tratados com O₃, onde a amostra mais aceita foi a de queijo Tipo Grana ralado com tratamento de O₃. Ainda existem muitas oportunidades de pesquisa para uma melhor utilização do gás ozônio como um aliado para o processamento de alimentos.

REFERENCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 357, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, Brasília, 1997.

LEITE E QUEIJOS. Revista da Associação das Pequenas Indústrias de Laticínios do Rio Grande do Sul. **Como o ozônio pode auxiliar produtores e indústria na higienização**. Ano VI, 34. ed., Agosto 2017.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 182-190, 1991.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENANCIO, A.; LIMA, N. **Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room**. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2355 - 2358, 2003.

LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 182-189, 2008.

PINTO, A. T.; SCHMIDT, V.; RAIMUNDO, S. A.; RAIHMER, F. Uso do ozônio no controle de fungos em sala de maturação de queijos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, p. 333-337, 2007.

ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; KOURKOUTAS, Y.; STEFANIS, C.; VAVIAS, S.; VOIDAROU, C.; MANTZOURANI, I.; BEZIRTOGLOU, E. Experimental effect of ozone upon the microbial flora of commercially produced dairy fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 5–11, 2017.

ARES, G.; DAUBER, C.; FERNÁNDEZ, E.; GIMÉNEZ, A.; VARELA, P. Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation. **Food Quality and Preference**, v. 32, p. 65-76, 2014.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.

BRUZZONE, F.; VIDAL, L.; ANTÚNEZ, L.; GIMÉNEZ, A.; DELIZA, R.; ARES, G. Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterisation and directions for product reformulation of milk desserts. **Food Quality and Preference**, v. 44, p. 183-193, 2015.

ROBERTO, M.; ALENCAR, E.; FERREIRA, W.; MENDONÇA, M.; ALVES H. Saturação do ozônio em coluna contendo grãos de amendoim e efeito na qualidade. **Food Technology**. Campinas, v. 19, 2016.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 182-189, 2008.

OBADI, M., ZHU, K. X., PENG, W., & ZHOU, H. M. Shelf life characteristics of bread produced from ozonated wheat flour. **Journal of Texture Studies**, DOI: 10.1111/jtxs.12309, 2018.

ZHU, F. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. **Food Chemistry**. SO308-8146(18)308422, May, 2018.

CHAWLA, A.S.; KASLER, D.R.; SASTRY, S.K.; YOUSEF, A.E. Microbial decontamination of food using ozone. **Food Industry**. p. 495-532, 2012.

KHAN, I.; TANGO, C. N.; MISKEEN, S.; LEE, B. H.; OH, D. Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. **Food Control**, V. 73, p. 1426 – 1444, 2017.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27 n.2, São Paulo, Março/Abril, 2004.