

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E**  
**DERIVADOS**

**PARTIÇÃO DO CÁLCIO EM QUEIJO MINAS PADRÃO E SUA**  
**BIOACESSIBILIDADE AO LONGO DO TEMPO DE MATURAÇÃO.**

**JOÃO PABLO FORTES PEREIRA**

**JUIZ DE FORA, 2014**

**JOÃO PABLO FORTES PEREIRA**

**PARTIÇÃO DO CÁLCIO EM QUEIJO MINAS PADRÃO E SUA  
BIOACESSIBILIDADE AO LONGO DO TEMPO DE MATURAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva**

**JUIZ DE FORA, 2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.

Aos meus queridos pais, João Domingos e Léa, pelos ensinamentos, pelo amor e paciência em todos os momentos da minha vida.

A minha esposa, Isabel, pelo amor, paciência e companheirismo.

A meu irmão Diego, pela amizade e apoio.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva, pela paciência, apoio e pelos valiosos ensinamentos que vou levar sempre comigo.

Aos Professores Dr. Rafael Arromba de Sousa, Dr. Ítalo Tuler Perrone e Dr. Renato Moreira Nunes agradeço pela importante disponibilidade na colaboração deste estudo, pelos ensinamentos e atenção.

A Dra Marta Fonseca Martins, Coordenadora do Projeto "Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Garantia da Qualidade, Segurança, Valor Nutricional e Detecção de Fraude em Leite e Produtos Lácteos", Embrapa/Monsanto, pelo apoio financeiro e pela atenção.

Ao Professor Dr. Junio César Jacinto de Paula e ao Instituto de laticínios Cândido Tostes - EPAMIG, por contribuição direta na elaboração dos queijos do presente estudo.

Ao professor Rafael Arromba de Sousa também por ter dado apoio incondicional na realização da determinação de cálcio junto ao Departamento de Química da UFJF.

Ao Professor Dr. Antônio Fernandes de Carvalho por abrir as portas do Laboratório de Qualidade do Leite para execução de parte do trabalho.

Aos colegas (professores e TAE's do Departamento de Nutrição e alunos do Laboratório de Análise Instrumental em Nutrição pelo companheirismo e pelos muitos momentos felizes, em especial aos colaboradores diretos: Leandra Oliveira, Ana Carolina Mageste, Luiz Felipe Araújo, Júlia Francisquini, Náira Campos, Ângela Oliveira e Maria Betânia Amorim.

E às agências de fomento CNPq e FAPEMIG e convênio EMBRAPA/Monsanto, pelo financiamento do projeto.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

*Marcel Proust*

## RESUMO

Os queijos apresentam destaque entre os derivados lácteos pelos elevados teores lipídico, proteico e mineral, uma vez que concentram tais nutrientes presentes no leite. O queijo Minas Padrão teve sua origem no Estado de Minas Gerais a partir dos problemas legais para comercialização dos queijos então produzidos. Surgiu por meio do desenvolvimento tecnológico para atribuir padrão para as muitas variedades de queijos artesanais de expressão regional existentes no Estado. Por ausência de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico para este queijo é possível encontrar variações significativas em queijos no mercado. O cálcio é um cátion bivalente encontrado em muitos alimentos. É um mineral fundamental para funções orgânicas como transmissão nervosa, coagulação do sangue, contração muscular, respiração celular, formação e manutenção de ossos e dentes. Entende-se por bioacessibilidade “a fração de composto que é liberado a partir de sua matriz no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para a absorção intestinal entrando na corrente sanguínea determinado por ensaios *in vitro*”. O presente estudo teve como objetivo avaliar a bioacessibilidade e a partição do cálcio (fase aquosa e livre) em Queijo Minas Padrão, em amostras comerciais, e ao longo do período de maturação, em amostras obtidas experimentalmente, por duas tecnologias de fabricação. No presente trabalho foi observado que durante a maturação ocorreram variações na partição do cálcio, sendo estas alterações ligadas a mudanças físico-químicas e bioquímicas nos queijos sobretudo em relação a variações do pH. Os queijos Minas Padrão comerciais analisados apresentaram grandes flutuações composicionais e em relação à partição do cálcio, tendo por consequência, grandes inconsistências na bioacessibilidade do cálcio. a bioacessibilidade do cálcio diminuiu ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão fabricados para o estudo, independente do tratamento testado, devido ao abaixamento do pH e do teor de cálcio na fase aquosa, voltando a se elevar na fase final do período de maturação. Levando-se em consideração o tempo de maturação, é possível afirmar, sob o ponto de vista nutricional, que maior bioacessibilidade do cálcio é encontrada na fase inicial (até sete dias) e na fase final (aproximadamente 70 dias) de maturação, embora sensorialmente e historicamente trata-se de um queijo consumido com mais de 20 dias de maturação. Em um mesmo tempo de determinação, comparando se os queijos obtidos com e sem massa lavada, evidenciou-se que a bioacessibilidade foi maior no segundo grupo. A falta de um Regulamento Técnico específico para o queijo Minas Padrão permite grande variabilidade na composição deste queijo, prejudicando sua identidade e sua indicação como alimento fonte de cálcio em dietas, já que esta variação interfere na bioacessibilidade do cálcio e, conseqüentemente, no cálculo de porções de alimentos para suprimento de necessidades diárias.

Palavras chave: queijo Minas Padrão, cálcio, bioacessibilidade.

## ABSTRACT

Cheeses are notable among dairy products for their high lipid, protein, and mineral contents, since they concentrate these nutrients present in milk. The "Minas Padrão" cheese originated in the State of Minas Gerais, presents legal problems regarding commercialization issues. This came about through the technological development of assigning a standard to the many varieties of handcrafted cheeses with regional expression existing in the State. Due to the lack of a specific Technical Regulation on the Identity and Quality for this cheese, it is possible to find significant variations of such cheeses in the marketplace. Calcium is a divalent cation found in many foods. It is a key mineral for physiological functions such as nerve transmission, blood clotting, muscle contraction, cellular respiration, formation and maintenance of bones and teeth. Bioaccessibility is understood as "the fraction of a compound that is released from its matrix in the gastrointestinal tract, and thus becomes available for intestinal absorption, entering the bloodstream, as determined by *in vitro* testing." The present study aimed to evaluate the bioavailability and the partition of calcium (aqueous and free phases) in "Minas Padrão" cheese, in commercial samples, and over the entire ripening period, in samples obtained experimentally through two production techniques. In this study it was observed that variations in the partition of calcium occurred during ripening, these being linked to physicochemical and biochemical changes in the cheeses, especially regarding variations in pH. The commercial "Minas Padrão" cheese analyzed showed large desuniformities in composition and in relation to the partition of calcium, thus presenting wide variations in calcium bioaccessibility. Calcium bioaccessibility was adversely affected during the ripening process of the "Minas Padrão" cheese produced for the study, independent of the treatment tested, due to the reduced pH and calcium content in the aqueous phase. Concerning ripening time, it can be stated, from the nutritional point of view, that greater calcium bioaccessibility is found in the initial phase (up to seven days) and in the final phase (approximately 70 days) of ripening, although historically, it is a cheese consumed after more than 20 days of aging. Within the same determination ripening time, comparing the cheeses made with and without the washed mass, it was revealed that the bioaccessibility was greater in the second group. The lack of a specific Technical Regulation for "Minas Padrão" cheese allows for a high variability in the composition of this cheese, undermining its identity and its indication as a dietary source of calcium intake, since this variation affects calcium bioaccessibility, and therefore the calculation of food servings for supplying daily needs.

Keyword: "Minas Padrão" cheese, calcium, bioaccessibility.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Fluxograma básico de fabricação do queijo Minas Padrão proposto por Furtado e Lourenço Neto (1994).....  | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Tecnologia de fabricação do queijo Minas Padrão produzido para o desenvolvimento do presente estudo – Tratamento A (massa não lavada) e Tratamento B (massa lavada).....           | 30 |
| <b>Figura 3.</b> Evolução do pH ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido do teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ ).....                        | 47 |
| <b>Figura 4.</b> Regressões polinomiais do comportamento do pH ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).....                                    | 51 |
| <b>Figura 5.</b> Evolução dos teores de cálcio na fase aquosa ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido do teste de Bonferroni (*** $p < 0,001$ ).....         | 52 |
| <b>Figura 6.</b> Regressões polinomiais do comportamento do cálcio na fase aquosa ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).....                 | 54 |
| <b>Figura 7.</b> Evolução dos teores de cálcio livre ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido de teste Bonferroni (* $p < 0,05$ ).....                        | 56 |
| <b>Figura 8.</b> Regressões polinomiais do comportamento do cálcio livre ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).....                          | 57 |
| <b>Figura 9.</b> Evolução dos percentuais de bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido de teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ )..... | 59 |
| <b>Figura 10.</b> Regressões polinomiais do comportamento da bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).....          | 62 |



## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1.</b> Distribuição de médias do pH ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).....  | 47 |
| <b>Quadro 2.</b> Distribuição de médias dos teores cálcio na fase aquosa ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).....               | 53 |
| <b>Quadro 3.</b> Distribuição de médias dos percentuais de bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ )..... | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Resultados dos atributos composicionais e gordura no extrato seco para os queijos Minas Padrão comerciais estudados.....   | 38 |
| <b>Tabela 2.</b> Resultados dos atributos partição de cálcio, bioacessibilidade e pH para os queijos Minas Padrão comerciais estudados..... | 40 |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados dos atributos composicionais e gordura no extrato seco para os queijos Minas Padrão fabricados.....             | 42 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados dos atributos partição de cálcio, bioacessibilidade e pH para os queijos Minas Padrão fabricados.....           | 44 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de Variância;

cm – centímetro (unidade de medida de comprimento);

°C – graus Celsius (unidade de temperatura);

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais;

FA – fase aquosa;

F AAS - espectrometria de absorção atômica em chama;

FCC – fosfato de cálcio coloidal;

FDA –USA - *Food and Drug Administration of the United State of America*;

GES – gordura no extrato seco;

g – grama (unidade de medida de massa);

*g* – gravidade (unidade de medida de velocidade);

h – hora (unidade de medida de tempo);

kg – quilograma (unidade de medida de massa);

L – litro (unidade de medida de volume);

µm - micrômetros (unidade de medida de comprimento);

mm – milímetro (unidade de medida de comprimento);

min – minutos (unidade de medida de tempo);

mL – mililitro (unidade de medida de volume);

mol – unidade de quantidade de matéria;

nm – nanômetro (unidade de medida de comprimento);

NSLAB - *Non Starter Latic Acid Bacteria*;

% - percentual;

% m/m – percentual de massa em relação à massa;

p – valor p estatístico;

pH – potencial hidrogeniônico;

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem  
Animal;

RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade;

RTIQQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos;

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora;

UFV – Universidade Federal de Viçosa;

USA - *United States of America*.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 16 |
| 2.1. Queijo Minas Padrão.....   | 16 |
| 2.1.1. <i>Tecnologias de fabricação do queijo Minas Padrão</i> .....  | 17 |
| 2.2. Cálcio.....  | 20 |
| 2.3. Partição do cálcio.....  | 22 |
| 2.4. Bioacessibilidade de nutrientes.....   | 24 |
| 2.4.1. <i>Bioacessibilidade do cálcio</i> .....   | 26 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 28 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 29 |
| 4.1. Aquisição de queijos comerciais.....   | 29 |
| 4.2. Fabricação dos queijos Minas Padrão.....   | 29 |
| 4.3. Extração da fase aquosa.....   | 32 |
| 4.4. Potencial hidrogeniônico.....  | 33 |
| 4.5. Determinação de cálcio.....  | 34 |
| 4.5.1. <i>Abertura das amostras</i> .....   | 34 |
| 4.5.2. <i>Determinação analítica</i> .....  | 34 |
| 4.6. Determinação do cálcio livre.....  | 35 |
| 4.7. Determinação da bioacessibilidade de cálcio.....   | 36 |
| 4.8. Análises Estatísticas.....   | 37 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 38 |
| 5.1. Análise estatística descritiva dos queijos Minas Padrão comerciais.....  | 38 |
| 5.2. Análise estatística descritiva dos queijos Minas Padrão produzidos com<br>diferentes tecnologias de fabricação.....          | 42 |
| 5.3. Correlações entre atributos centesimais dos queijos Minas Padrão<br>produzidos com diferentes tecnologias de fabricação..... | 45 |
| 5.4. Potencial hidrogeniônico.....  | 46 |
| 5.5. Cálcio na fase aquosa.....   | 51 |
| 5.6. Cálcio livre.....  | 55 |
| 5.7. Bioacessibilidade de cálcio.....   | 58 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....   | 63 |
| <b>7. DIREÇÃO DE FUTUROS ESFORÇOS</b> .....   | 65 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 67 |

## 1. INTRODUÇÃO

O cálcio é um mineral essencial para o desenvolvimento humano possuindo funções importantes no organismo como a participação na transmissão nervosa, coagulação do sangue, contração muscular, respiração celular, formação e manutenção de ossos e dentes. Tem sua absorção exclusivamente por meio de ingestão de alimentos fontes e/ou suplementação alimentar. A ingestão recomendada de cálcio é de 1 g/dia para adultos. Tal mineral é encontrado em abundância no leite e em seus derivados.

Os queijos representam o principal derivado lácteo tanto na questão de variedades quanto na questão de produção e consumo. Sob o ponto de vista nutricional o queijo tem importante função por ser um alimento de alta densidade de nutrientes principalmente de proteínas, gorduras e cálcio.

O queijo Minas Padrão é um produto tipicamente brasileiro com origem em Minas Gerais. Sua tecnologia inicialmente preservada no Estado foi difundida por todo o país, mas, tem no estado mineiro maior produção e consumo. Trata-se de um queijo de massa semicozida de aroma agradável e sabor variando de ácido a levemente ácido. É consumido, normalmente, após 20 dias de maturação, período em que suas características sensoriais são consideradas ótimas.

Variações do produto, em âmbito nacional, não só devido à diferença da qualidade e composição da matéria prima, mas também devido à implementação de diferentes tecnologias de fabricação vêm promovendo a descaracterização do queijo Minas Padrão. Tal situação é um problema para a identidade do produto bem como no uso deste alimento como fonte de nutrientes para prescrição de dietas equilibradas uma vez que a prescrição de dietas é baseada na composição média

dos nutrientes presentes nos alimentos e variações na composição dificultam a sua adequação às necessidades dos indivíduos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Queijo Minas Padrão

Os queijos apresentam destaque entre os derivados lácteos pelos elevados teores lipídico, proteico e mineral, uma vez que concentra tais nutrientes presentes no leite. Não somente o teor, mas, a qualidade dos ácidos graxos e aminoácidos que compõe as gorduras e proteínas, respectivamente, presentes no queijo aprimoram sua qualidade nutricional (MORENO, 2013).

O queijo Minas Padrão, bem como diz o nome teve sua origem no Estado de Minas Gerais a partir dos problemas legais para comercialização dos queijos então produzidos. Surgiu por meio do desenvolvimento tecnológico para atribuir padrão para as muitas variedades de queijos artesanais de expressão regional existentes no Estado, exercida por inúmeros pequenos produtores estabelecidos, principalmente, na zona rural, onde pequenas variações tecnológicas davam características divergentes a queijos denominados “queijo Minas” (MELO, ALVES, COSTA, 2009).

A história do “queijo Minas” tem influência portuguesa. Com a chegada dos portugueses no estado de Minas Gerais, no século XVIII para exploração das minas de ouro, veio uma receita de queijo de coalhada feito com leite fresco, o queijo da Serra da Estrela que foi adaptada para ser feito no Brasil (IEPHA).

Aparentemente, apenas uma variação quanto ao coagulante foi rearranjada na receita brasileira. O queijo da receita original era produzido com o extrato de flores e brotos de cardo, planta tida como praga da lavoura. Já o queijo de Minas era feito com um coagulante proveniente do estômago seco e salgado de bezerros ou cabritos (IEPHA).



Auguste de Saint-Hilaire, um botânico e naturalista francês, no início do século XIX, deu a receita: “Tão logo o leite é tirado, coloca-se nele o coalho, o que o faz talhar-se instantaneamente. O coalho mais usado é o de capivara, por ser mais facilmente encontrado. As fôrmas são de madeira e de feitio circular, tendo o espaço livre interno mais ou menos o tamanho de um pires. [...] O leite talhado é colocado dentro delas em pequenos pedaços, até enchê-las. Em seguida a massa é espremida com a mão, e o leite cai dentro de uma gamela colocada em baixo. À medida que a massa talhada vai sendo comprimida na fôrma, nova porção é acrescentada, continuando-se a espremê-la até que a fôrma fique cheia de uma massa totalmente compacta. Cobre-se de sal a parte superior do queijo, e assim ele é deixado até a noite, quando então é virado ao contrário, pulverizando-se também de sal a parte agora exposta” (PARQUE NACIONAL SERRA DA CANASTRA, 2005).

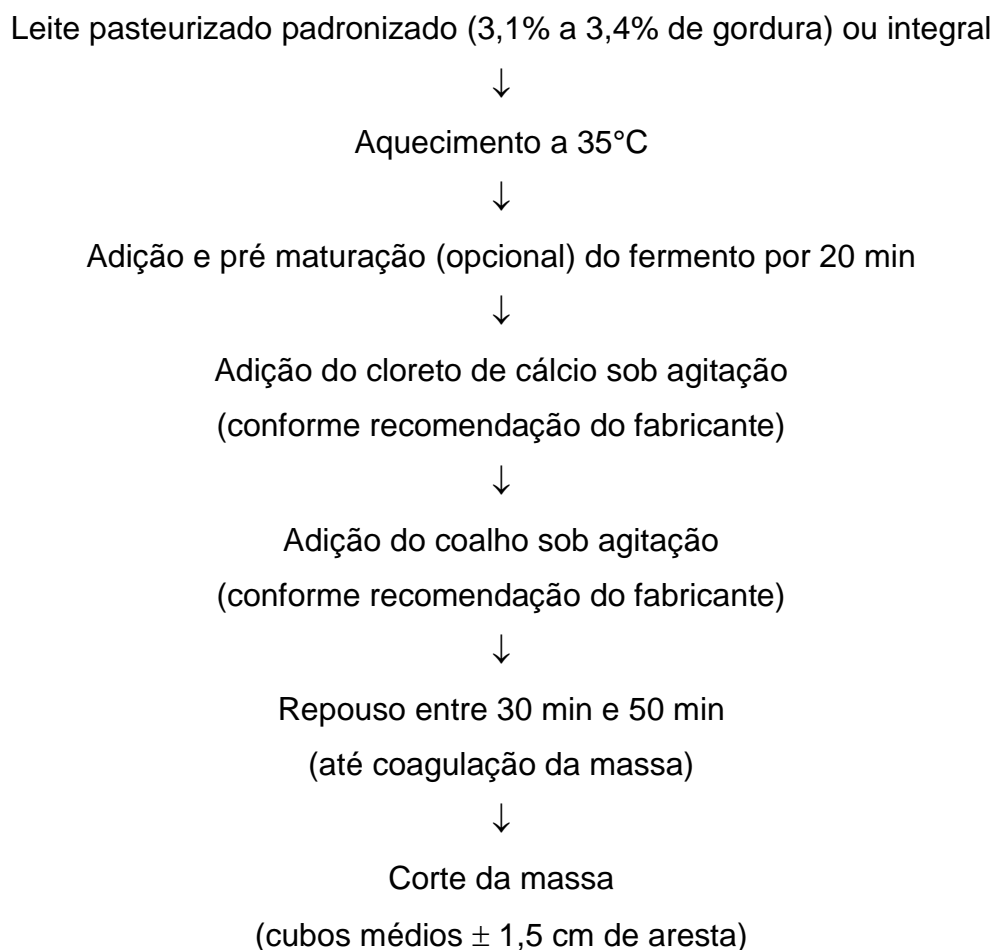
O queijo Minas Padrão é “o produto obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante 20 dias. Deve apresentar formato cilíndrico, de faces planas e bordos retos, formando ângulo vivo. Apresenta crosta fina e são comercializados com massa entre 1,0 kg e 1,2 kg, consistência semidura, macia, de untura manteigosa; textura com buracos mecânicos e em cabeça de alfinete, pouco numerosos; cor branco-creme, homogênea; odor e sabor próprios, ácidos, agradáveis e não picantes segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA” (BRASIL, 1997).

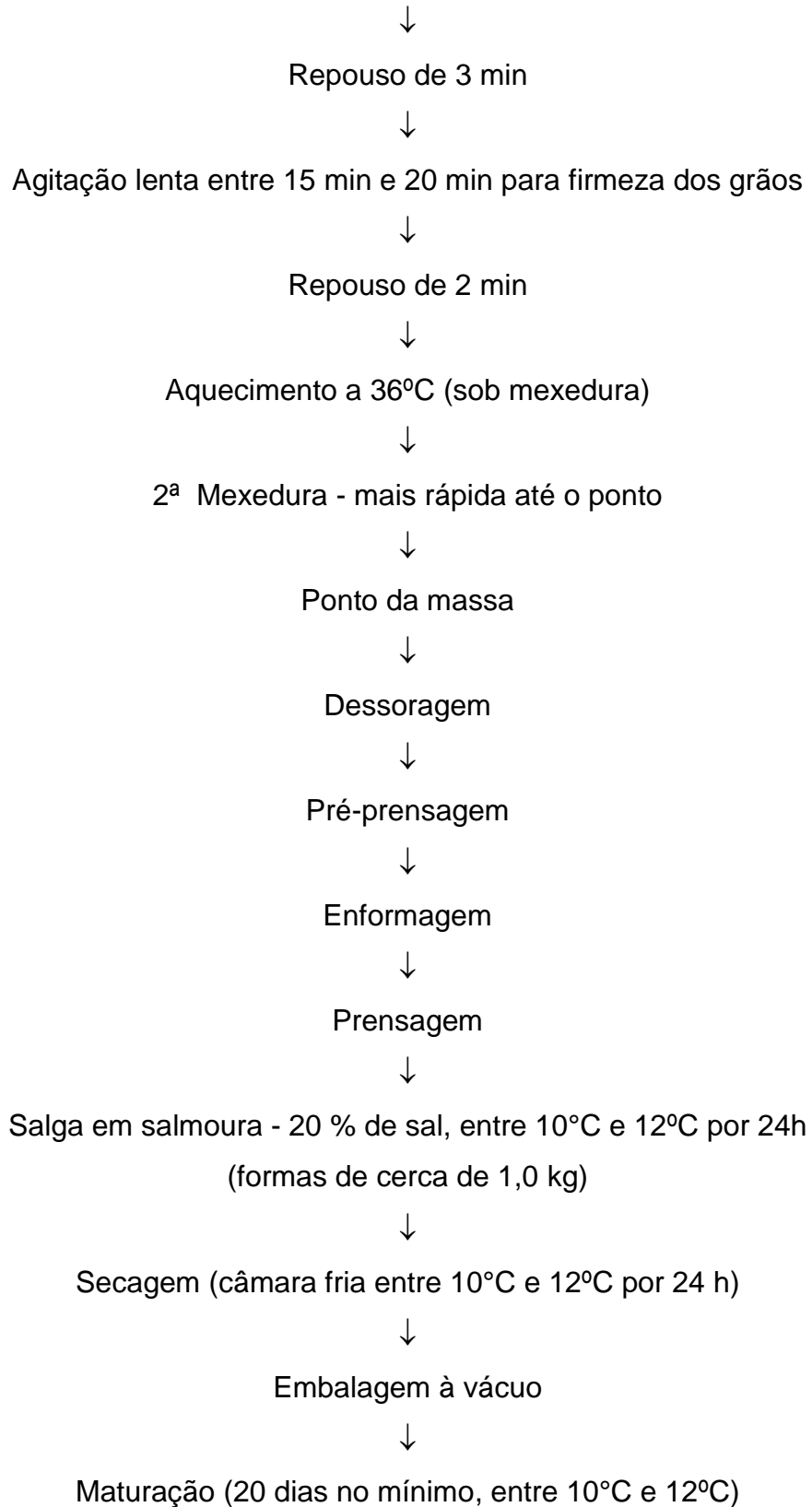
### **2.1.1 Tecnologias de fabricação do queijo Minas Padrão**

A tecnologia de queijos tem evoluído constantemente, principalmente acerca dos fermentos e coagulantes utilizados durante a fabricação (ANTUNES & SAITO,

2011). Não só a variação de insumos com também pequenas alterações no modo de fazer o queijo impacta amplamente nas suas características (FURTADO, 1990). Por ausência de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico para este queijo é possível encontrar variações significativas em queijos no mercado. É uma verdadeira despadronização do queijo Minas Padrão (BRUMANO, *et. al.* 2011).

A tecnologia básica do queijo Minas Padrão segundo Furtado e Lourenço Neto (1994) consiste na pré-fermentação do leite pasteurizado com fermentação mesofílica, seguida de coagulação enzimática, sinérese do grão por mexedura e cozimento da massa até o ponto, pré prensagem e prensagem do queijo anterior a salga e maturação, conforme Figura 1 a seguir:





**Figura 1.** Fluxograma básico de fabricação do queijo Minas Padrão proposto por Furtado e Lourenço Neto (1994).

Variações são encontradas principalmente na questão da escolha do tipo e dose do fermento, retirada de parte do soro e adição de água aquecida após a 1ª mexedura (lavagem da massa) e ponto final do queijo. Tais alterações tecnológicas creditam ao produto uma verdadeira despadronização.

## 2.2 Cálcio

O cálcio foi descoberto em 1808 pelo químico inglês Humphry Davy. O nome deste mineral é derivado do latim *calx* (cal) – hoje carbonato de cálcio que já era utilizado desde o século I. O cálcio na forma de metal só tornou-se disponível em larga escala no início do século XX (COMINETTI, 2013).

O cálcio é um mineral classificado como metal alcalino terroso. É um cátion bivalente encontrado em muitos alimentos, tendo destaque o leite e derivados além de verduras folhosas como couve e agrião e algumas oleaginosas como amêndoas. É fundamental para funções orgânicas como transmissão nervosa, coagulação do sangue, contração muscular, respiração celular, formação e manutenção de ossos e dentes, sendo o nutriente mais importante na composição destes. Atua de forma direta ou como cofator enzimático. Compõe aproximadamente 2% da massa do corpo humano, sendo o mineral que mais contribui para tal. Do total, em massa de cálcio, aproximadamente 99% são atribuídos na composição de ossos e dentes, sendo o restante encontrado no sangue, fluidos extracelulares, músculos e outros tecidos. (DE LA FUENTE, BELLOQUI e JUÁREZ, 2004; COZZOLINO, 2010; GROPPER, SMITH, GROFF, 2011).

A ingestão de cálcio deve ser constante para manutenção, em limites estreitos, da concentração plasmática do cálcio para assim, o organismo obter o equilíbrio do mineral que é armazenado sob a forma de massa óssea, a qual pode passar a cálcio

circulante na corrente sanguínea. Com o avançar da idade, fatores genéticos e maus hábitos alimentares podem implicar na má absorção e excreção acentuada do mineral sendo a complementação alimentar ou medicamentosa necessária (MARTINI & WOOD, 2002; MOTTA, 2000).

O cálcio tem absorção entérica, a qual pode ser dividida em duas partes: uma via transcelular também chamada de via ativa saturável, mediada pela vitamina D (hormônio calcitriol), e uma via paracelular também chamada de passiva não saturável, por meio da difusão simples ou facilitada. Em condições fisiológicas apenas o intestino delgado participa da absorção embora todo o intestino é capaz de realizar tal função (BUZZINARO, ALMEIDA e MAZETO, 2006; GUÉGUEN, 2000).

A via ativa é responsável pela maior parte da absorção quando os níveis de ingestão são moderados. Neste caso o mineral é absorvido através da membrana celular pelos canais de cálcio a favor de um gradiente eletroquímico, difunde pelo citoplasma e sai pela membrana basolateral da célula. A difusão intracelular do íon cálcio é a etapa limitante na velocidade. Na ausência de vitamina D essa velocidade é reduzida cerca de 70 vezes e o mineral é encontrado somente na região da borda em escova e não difundido por todo citoplasma como ocorre na presença de vitamina D (COZZOLINO, 2010).

A absorção por meio da rota paracelular é percebida mais acentuadamente quando a concentração plasmática do cálcio é elevada. O transporte é feito também a favor de um gradiente eletroquímico por junções delgadas encontradas entre as células. A proporção do mineral que será absorvido por essa via é determinada pelo teor de cálcio presente no lúmen intestinal, pela permeabilidade celular ao íon e pelo tempo de permanência do alimento (quimo) no intestino (COZZOLINO, 2010; DAWSON-HUGHES, HARRIS e FINNERAN, 1995. GUÉGUEN, 2000).

A excreção do cálcio é realizada por via urinária, fecal e também por outros fluidos corporais como suor, menstruação e sêmen. A excreção renal pode indisponibilizar a um organismo adulto até 0,2 g/dia de cálcio, dependendo, obviamente, da taxa de filtração glomerular e concentração plasmática do mineral. A perda pelo suor é de, em média, 0,02 g/dia. O cálcio excretado via fecal inclui o cálcio não absorvido da dieta e o cálcio endógeno (células, saliva, bile, suco gástrico, etc). Considerando só a perda de cálcio endógeno, as fezes são responsáveis por eliminar do organismo até 0,12 g/dia (COZZOLINO, 2010).

O leite e derivados lácteos são considerados as principais fontes alimentares de cálcio devido ao alto teor do mineral e também por não conterem fibras, uma vez que as fibras aumentam o peristaltismo gastrointestinal diminuindo a absorção do mineral. O alto teor de proteína deste grupo de alimentos também pode ser considerado um fator importante para a absorção orgânica do cálcio por exercer função de proteção frente à eliminação renal do cálcio. A lactose do leite aumenta a solubilidade e a osmolaridade do cálcio no íleo, que estimulam a absorção do mineral por difusão passiva uma vez que no leite, por ter pH quase neutro, grande parte do cálcio permanece em suspensão na forma de caseinato de cálcio, citrato de cálcio e complexado a lactose (CORMAN, 1993; PEREIRA *et. al.*, 2009). Estes três componentes do leite auxiliam na manutenção da solubilidade do cálcio e são, possivelmente, os responsáveis pela melhor absorção de cálcio no leite do que em outras fontes (GRÜDTNER *et. al.*, 1997).

### **2.3 Partição do Cálcio**

A composição mineral, especialmente o cálcio, é um requisito bem conhecido que influencia nas propriedades funcionais (derretimento e filagem) e de textura (dureza

e elasticidade) de queijos (LUCEY & FOX,1993; LUCEY *et. al.*, 2003). Detalhes na forma de apresentação do cálcio no queijo antes, durante e após a fabricação é essencial para as características que o queijo apresentará.

O cálcio no queijo pode estar compondo proteínas complexas que formam a estrutura do queijo; pode estar difundido na fase aquosa (FA) do queijo, estando este livre ou associando-se a ions solúveis. Atributos físico-químicos são responsáveis por este equilíbrio entre as formas de apresentação do mineral e, conseqüentemente, influenciam diretamente nas características do queijo. O principal atributo relacionado é o pH. Os efeitos do pH em si são frequentemente difíceis de separar das outras alterações concomitantes, tais como a solubilização de fosfato de cálcio coloidal (FCC), alterações na carga elétrica sobre a caseína, e hidratação das moléculas dessa proteína. O FCC tem um papel estrutural importante em micelas de caseína, o qual é facilmente demonstrado uma vez que há a sua remoção na desintegração da micela durante a acidificação a baixas temperaturas.

Embora tenha havido muitos estudos na solubilização de FCC no leite, é muito menos conhecido o seu grau de solubilização no queijo durante a maturação. Há relatos sobre o impacto de alterações nas condições de fabricação de queijos (por exemplo, os valores de pH durante a coagulação, drenagem, ou enformagem, bem como no dia seguinte a fabricação) em composição e atributos funcionais. Todas essas modificações durante a fabricação de queijos podem alterar a concentração do cálcio residual em queijos, embora seja também verdade que dois queijos com o mesmo pH podem ter diferenças marcantes de textura.

Lucey e Fox (1993) propuseram que a concentração total de cálcio não é o melhor indicador de textura de queijos. Eles sugeriram que é a quantidade de cálcio

ainda dentro das partículas de caseína de queijo, que se apresenta na forma de cálcio insolúvel, desempenha o papel chave na características de textura dos queijos. Isto é demonstrado uma vez que há mudanças significativas nas proporções de cálcio insolúvel e solúvel durante as fases de maturação do queijo Cheddar. A maturação, principalmente a mudança de pH em decorrência da proteólise e a proteólise em si desloca o equilíbrio mineral e podem estar contribuindo para as mudanças de textura durante a maturação.

As primeiras tentativas para estudar a composição da FA do queijo envolvendo sua extração física utilizando alta pressão, designado como “suco de soro de queijo”, foram desenvolvidas nas décadas de 1920 e 1930. Eles estavam preocupados que a extração da FA alterasse as propriedades físico-químicas do queijo (LUCEY E FOX, 1993; SALVAT-BRUNAUD et al, 1995). Tal método é ideal para estudar o equilíbrio mineral no queijo por não alterar suas propriedades químicas de forma significativa.

A dissociação do cálcio é dependente do sal a qual está associado, mas de forma geral, quanto maior o pH do meio maior é o grau de dissociação do sal de cálcio que são sais provenientes de ácido fraco. No leite (pH 6,7) os sais de cálcio presentes, em quase sua totalidade, estão na forma dissociada. Durante a fabricação do queijo, devido a fermentação e conseqüentemente ao abaixamento do pH, grande parte desses sais passam a estar não dissociados no meio (FURTADO, 2005).

#### **2.4 Bioacessibilidade de nutrientes**

Os nutrientes são compostos encontrados nos alimentos, ou um grupo de substâncias ativas assimiladas por um organismo, e necessária para o crescimento, reparação e metabolismo normal. São classificadas em macronutrientes e micronutrientes. Macronutrientes são macromoléculas que podem ser digeridas,



absorvidas e utilizadas como fonte de energia e substrato para a síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos para manutenção das funções fisiológicas do organismo. Os macronutrientes são compostos por proteínas, carboidratos e lipídeos, compondo a maior parte de uma dieta diária. Os micronutrientes como as vitaminas e minerais são importantes para as funções orgânicas porém em quantidades menores na dieta diária, sendo encontrados nos alimentos na ordem de miligrama ou micrograma (TOGNON, 2012).

Entende-se por bioacessibilidade “a fração de composto que é liberado a partir de sua matriz no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para a absorção intestinal entrando na corrente sanguínea”. A bioacessibilidade é determinado por ensaios *in vitro*. Tal estudo é importante por se tratar de uma ferramenta inicial de previsão da biodisponibilidade já que os estudos *in vivo* são mais onerosos, complexos e demandam mais tempo (GARCÍA, LÉRIDA, GÁLVEZ, 2009).

Bioacessibilidade e biodisponibilidade são constantemente confundidos ou até mesmo indiferenciados. Como dito a bioacessibilidade responde a testes de simulação gastrointestinal *in vitro*. A biodisponibilidade, termo proposto pelo *Food and Drug Administration of United States of America* (FDA-USA, 2003), “é uma área da farmacologia que determina a proporção em que determinada substância ativa absorvida e distribuída pelo organismo até seu sítio de ação”. Vários fatores podem interferir nesta biodisponibilidade como tamanho da partícula, forma química, extensão do metabolismo, dentre outros. Tal terminologia foi incorporada posteriormente para estudos de nutrição (COZZOLINO, 2010; GARCÍA, LÉRIDA, GÁLVEZ, 2009). Bronner e Pansu (1993) caracterizam biodisponibilidade como uma sequência de eventos metabólicos que inclui digestibilidade, solubilização, absorção,

retenção e utilização pelo organismo, transformação enzimática, secreção e excreção.

As definições de ambas as terminologias, bioacessibilidade e biodisponibilidade, no âmbito da nutrição, foram bastante e ainda são discutidas e alteradas ao longo da evolução dos estudos, principalmente acerca dos micronutrientes, sendo mantidos sempre “pilares” de sustentação como aspectos de bioconversão, bioeficácia e bioeficiência.

É importante a determinação da bioacessibilidade de nutrientes em dietas, considerando intervalos, obviamente, devido às variações intrínsecas do metabolismo de cada indivíduo e variações referentes a hábitos alimentares e fenotípicos de populações. Desta forma, o teor realmente disponibilizado aos indivíduos será determinado dando maior fidedignidade às necessidades reais na saúde e homeostasia do corpo (SIQUEIRA, MENDES, ARRUDA, 2007).

#### **2.4.1 Bioacessibilidade de Cálcio**

O acesso aos minerais é dependente de variáveis ligadas a alimentação, hábitos de vida e também a saúde do organismo. Ao avaliar fontes de cálcio, se avalia seus teores e não o quanto realmente está disponível para absorção e execução das funções fisiológicas. Isto não é problema a não ser para parcelas da população nas quais a ausência de cálcio torna-se mais crítica como em crianças e idosos. A eficiência na absorção do cálcio é similar na maioria dos alimentos, com exceção de alimentos ricos em oxalatos e fitatos. Como por exemplo, o espinafre, embora tenha um teor de cálcio de 98 mg/100g tem apenas 5% deste absorvido por ser rico em ácido oxálico. Alimentos como isolados de soja, sementes, castanhas e cereais também proporcionam baixa absorção de cálcio por conterem teores consideráveis

de ácido fítico. Tanto as fibras solúveis quanto as insolúveis diminuem a absorção do cálcio por diminuírem o tempo de permanência do quimo no intestino, tendo as solúveis, menor relevância neste fator (COZZOLINO, 2010; GROPPER, SMITH, GROFF, 2011; MARTINI & WOOD, 2002).

O cálcio interage com outros nutrientes, este fator também é importante na bioacessibilidade se pensarmos no alimento complexo que é um queijo, matriz do estudo. Acreditou-se por muitas décadas que a relação cálcio / fósforo fosse fundamental para o organismo. Este conceito ainda é aplicado para nutrição de bebês e crianças, mas não tão importante para adultos embora uma relação elevada de fósforo frente ao cálcio por período prolongado possa levar a um hiperparatiroidismo secundário brando. O cálcio também interage com o ferro, uma vez que ambos competem pela absorção no mesmo sítio de adesão. Outra interação importante é do cálcio com a cafeína que reduz a absorção de cálcio por elevar a excreção urinária diminuindo a eficácia da reabsorção renal e elevar a excreção fecal do cálcio endógeno (GRUPPER, SMITH, GROFF, 2011).

O leite, pensando em biodisponibilidade, é um excelente alimento fonte de cálcio, principalmente para crianças porque além do alto teor do mineral, contém lactose, o que parece aumentar a absorção do mineral neste grupo possivelmente através da melhoria da solubilidade (GRUPPER, SMITH, GROFF, 2011; ZIEGLER & FOMON, 1983). Em derivados lácteos fermentados (baixo teor de lactose) a absorção de cálcio é similar a do leite. Outra vantagem do leite frente a outras fontes é seu alto teor de citrato, uma vez que estudos em suplementos medicamentosos apontam que o citrato de cálcio é mais bem absorvido que o cálcio encontrado na composição de outros sais como carbonatos e gluconatos (COZZOLINO, 2010; COMINETTI, 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a bioacessibilidade e a partição do cálcio (fase aquosa e livre) em Queijo Minas Padrão, em amostras comerciais, e ao longo do período de maturação, em amostras obtidas experimentalmente, por duas tecnologias de fabricação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar, com base na análise de diferentes amostras comerciais de Queijo Minas Padrão adquiridas nos mercados de Juiz de Fora - MG e Viçosa - MG, a composição físico-química, a partição do cálcio e o pH.
- Avaliar a bioacessibilidade do cálcio nos queijos Minas Padrão fabricados com duas diferentes tecnologias ao longo do período de maturação e em amostras comerciais.
- Avaliar a evolução do pH ao longo da maturação do queijo Minas Padrão;
- Avaliar a influência das partições do cálcio na sua bioacessibilidade ao longo do período de maturação do queijo Minas Padrão.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

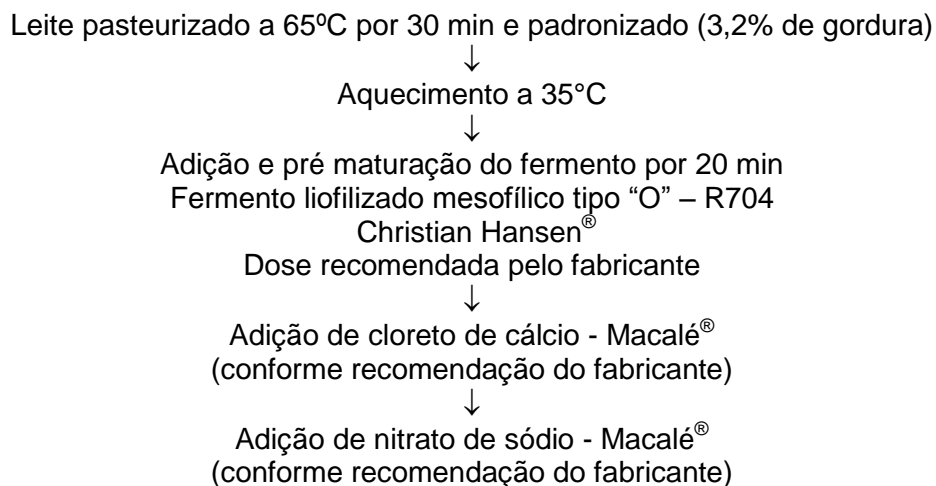
### 4.1 Aquisição de queijos comerciais

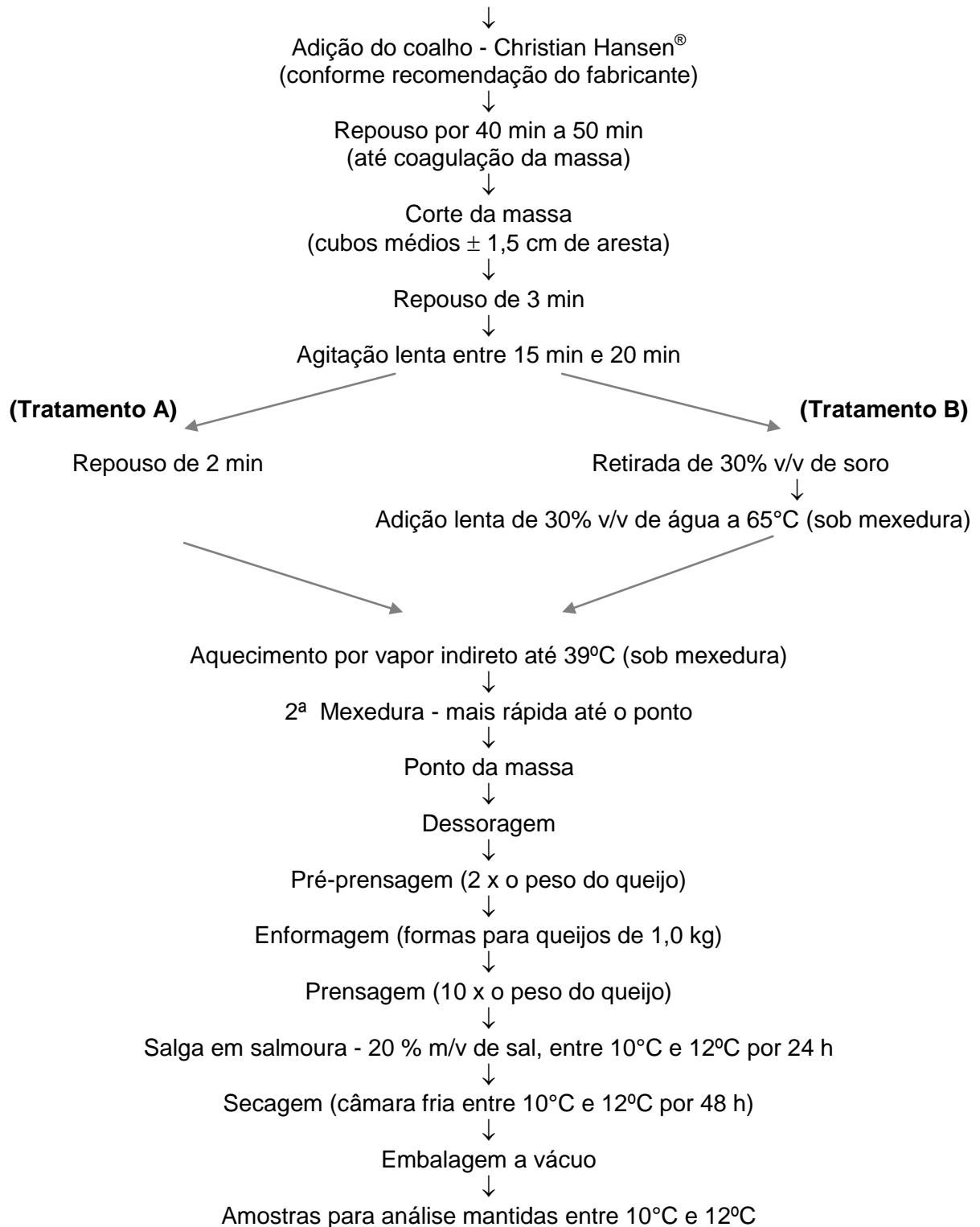
Foram adquiridas dez amostras de queijo Minas Padrão no comércio de Juiz de Fora - MG e outras duas amostras comerciais de queijo Minas Padrão em Viçosa - MG. Foram analisados os queijos comerciais quando estavam com um intervalo entre 15 dias e 30 dias a partir da data de fabricação.

### 4.2 Fabricação dos queijos Minas Padrão

Os queijos Minas Padrão do estudo foram fabricados no Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG. Para tal, foram cedidos em três semanas subsequentes dois tanques de fabricação com capacidade para 100 L de leite cada. Desta forma foram aplicados dois tratamentos tecnológicos distintos em cada dia de fabricação (mesmo leite utilizado como matéria-prima). Os tratamentos foram repetidos mais duas vezes, obtendo-se então um total de seis fabricações, sendo três repetições para cada tratamento.

As tecnologias de fabricação utilizadas em cada tratamento (A) e (B) são descritas na Figura 2 a seguir:





**Figura 2.** Tecnologia de fabricação do queijo Minas Padrão produzido para o desenvolvimento do presente estudo – Tratamento A (massa não lavada) e Tratamento B (massa lavada).

Para determinação da análise centesimal, Gordura no Extrato Seco (GES) e dos atributos de cálcio na FA, cálcio livre, pH do queijo e pH da FA para elaboração da análise descritiva analisou-se os queijos após 28 dias de fabricação .

### **4.3 Extração da Fase Aquosa**

Para extração da fase aquosa (FA) dos queijos Minas Padrão, transportaram-se os queijos resfriados até a cidade de Viçosa – MG, onde, no Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Viçosa foi realizado por meio de prensagem mecânica das amostras. As amostras foram preparadas por meio da mistura do queijo triturado com microesferas de vidro com 150 µm a 250 µm de diâmetro durante três horas com pressurização crescente periódica seguindo metodologia descrita por Salvat-Brunaud *et. al.* (1995).

Realizou-se tal procedimento para os queijos comerciais quando estavam com um intervalo entre 15 dias e 30 dias da data de fabricação e para os produzidos para acompanhamento de efeitos ao longo da maturação procedeu as extrações quando os queijos estavam com 6, 27, 48 e 69 dias de fabricado. No dia seguinte a cada um dos tempos, no Laboratório de Análise Instrumental em Nutrição da UFJF os extratos foram centrifugados a 2990 g por 5 minutos e filtrados em algodão. Desta forma obteve-se a FA para as posteriores análises.

Foi observada dificuldades operacionais durante a extração da FA, para ambos os tratamentos testados, no ultimo tempo determinado no estudo (69 dias) devido a elevada maturação e conseqüente proteólise.

O presente trabalho optou por denominar o resultado da extração mecânica do queijo de FA, uma vez que com a extração além do cálcio presente na forma solúvel

há fragmentos de proteínas insolúveis (caseínas) ou caseínas intactas ligadas ao cálcio.

#### **4.4 Determinação do potencial hidrogeniônico**

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) nos queijos e FAs foram realizadas com auxílio do medidor de pH Gehaka<sup>®</sup> modelo PG 1800, devidamente calibrado com soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00. As leituras foram determinadas com a imersão do eletrodo do equipamento em diferentes pontos, quando a determinação era feita nos queijos, e nas FAs quando estas eram o objeto de medida. Para análise dos queijos, foram realizados, imediatamente antes da leitura de pH, orifícios com auxílio de bastão de vidro para a introdução do eletrodo. Foram realizadas três medidas de cada amostra e a média dos três resultados foi definida como valor adotado. Realizou-se medições de pH tanto nos queijos comerciais quanto nos queijos fabricados. O mesmo critério foi utilizado para medição de pH na FA.

Realizaram-se tais procedimentos para os queijos comerciais quando estavam com um intervalo entre 15 dias e 30 dias da data de fabricação e para os queijos produzidos para acompanhamento de efeitos ao longo da maturação procederam as medições em seis períodos, quando os queijos estavam com 1, 2, 7, 28, 49 e 70 dias de fabricação. Para as FAs dos queijos foram determinados os pH nos tempos 7, 28, 49 e 70 dias de fabricação.



## **4.5 Determinação de cálcio**

### **4.5.1 Abertura das amostras**

As amostras (queijos, FAs e conteúdos do saco de diálise) foram abertas (retirada de possíveis interferentes analíticos do analito de interesse) por método de via seca, onde foram pesadas no cadinho de porcelana em balança analítica Shimadzu<sup>®</sup> modelo AY 220, e colocadas em forno de mufla marca Jung<sup>®</sup> a 550°C por 12 h. Tomou-se cuidado com a rampa de elevação da temperatura a fim de não haver projeção das amostras líquidas durante as primeiras horas de incineração devido as amostras apresentarem teores consideráveis de umidade. O resíduo mineral fixo resultante da incineração foi ressuspendido com solução de ácido clorídrico 0,5% v/v em balão volumétrico de capacidade 50,00 mL.

### **4.5.2 Determinação analítica**

Após abertura, as amostras foram submetidas à espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) no Departamento de Química da UFJF para a determinação do teor de cálcio. Trabalhou-se com espectrômetro de absorção atômica da marca Termo Scientific<sup>®</sup> com as seguintes condições de operação: chama de óxido nitroso – acetileno com fluxo de 4,2 L/min e com altura do queimador em 11 mm; comprimento de onda de 422,4 nm com varredura de  $\pm 0,5$  nm. Tais condições foram obtidas após sucessivos testes para padronização da metodologia utilizando adição e recuperação do padrão de cálcio. Com mistura de acetileno e ar comprimido não obteve-se êxito, embora seja referido como mistura ideal para determinação de cálcio. Partiu-se, então, para a chama de óxido nitroso –

acetileno. Para a calibração do equipamento utilizou solução padrão de cálcio com concentração entre 0,00 mg/L e 7,00 mg/L.

Realizou-se as medições para obtenção do teor de cálcio nas amostras de queijos comerciais (quando estavam com um intervalo entre 15 dias e 30 dias a partir da data de fabricação), suas FAs e os conteúdos do saco de diálise resultantes das análises de bioacessibilidade. Da mesma forma realizaram-se determinações de cálcio para os queijos produzidos, suas FAs e os conteúdos do saco de diálise resultantes das análises de bioacessibilidade para acompanhamento de efeitos durante os quatro períodos de maturação avaliados (7, 28, 49 e 70 dias de fabricação). Foram realizadas três medidas de cada amostra e a média dos resultados foi definida como valor adotado.

#### **4.6 Determinação do cálcio livre**

A determinação do cálcio livre foi realizada na FA do queijo, previamente extraída, por meio do Medidor Orion<sup>®</sup> modelo 4-Star, com eletrodo íon seletivo para cálcio a 25°C. O equipamento foi calibrado com solução padrão de cálcio nas concentrações de 10 mg/L e 100 mg/L, sendo a leitura realizada diretamente por imersão do eletrodo na FA dos queijos. Realizaram-se medições de cálcio livre tanto nas FAs dos queijos comerciais (com maturação entre 15 dias e 30 dias) quanto nos queijos fabricados, estes, ao longo dos quatro períodos de maturação avaliados (7, 28, 49 e 70 dias de fabricação). Foram realizadas três medidas de cada amostra e a média dos resultados foi definida como valor adotado.

O presente trabalho denominou o resultado da extração mecânica do queijo de fase aquosa (FA), uma vez que com a extração além do cálcio presente na forma

solúvel há fragmentos de proteínas insolúveis (caseínas) ou caseínas intactas associadas ao cálcio.

O cálcio quando solúvel pode apresentar-se na forma de sais ou estar “livre” no meio aquoso na forma de um cátion bivalente chamado no presente trabalho de cálcio livre.

#### **4.7 Determinação da bioacessibilidade de cálcio**

A bioacessibilidade foi determinada segundo Luten *et. al.*, 1996 – modificado, pesando-se 7 g de queijo triturado, em balança analítica Shimadzu® modelo AY 220 e submetidos à “digestão gástrica” simulada, com solução de pepsina em ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ajustado para pH entre 1,7 a 2,0. A mistura foi colocada em béquer e submetida a agitação sendo mantida a 37°C durante 2 horas. Após o fim da digestão simulada, determinou-se a acidez do digerido e preparou-se as membranas de diálises (Spectra/Por® - modelo MWCO: 12.000 D – 14.000 D), as quais foram adicionadas de solução equimolar de bicarbonato de sódio.

As membranas foram usadas para simular a digestão entérica de 30 g do digerido gástrico, colocadas em béqueres sob agitação e mantidas a 37°C por 4 horas (digestão entérica). Após a mistura atingir pH próximo a 5,0 (por volta de 40 minutos), adicionou-se solução de pancreatina e extrato biliar. No final do período de 4 horas, cada saco de diálise foi removido e o conteúdo foi retirado para determinação do cálcio presente, empregando F AAS – 4.2.2 (1). Para obtenção da fração bioacessível do cálcio, determinou-se, também por F AAS – 4.2.2, o teor de cálcio nos queijos, após abertura das amostras e dissolução em ácido nítrico diluído (2). O percentual de bioacessibilidade = [(1) / (2)] x 100. Realizou-se as determinações dos queijos comerciais (com maturação entre 15 dias e 30 dias) e

nos queijos fabricados, estes ao longo dos quatro períodos de maturação avaliados (7, 28, 49 e 70 dias de fabricação).

Foram realizadas três medidas de cada amostra e a média dos três resultados foi definida como valor adotado.

#### **4.8 Análises Estatísticas**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, CA, USA). Os dados relativos à composição e aos atributos de partição de cálcio e pH no queijo, bioacessibilidade de cálcio e pH da FA dos queijos comerciais e fabricados para o estudo foram avaliados por análise descritiva. Para a análise dos atributos citados nos queijos fabricados foram utilizados resultados referentes a 28 dias de fabricação dos queijos.

A partição do cálcio, pH da FA e bioacessibilidade do mineral nos queijos fabricados foram analisados, ao longo da maturação em quatro tempos de maturação (7, 28, 49 e 70 dias). Para avaliação do pH no queijo, além dos tempos citados realizou-se determinações no dia da fabricação (1 dia) e no dia seguinte (2 dias), não sendo utilizada as médias desses tempos para a elaboração da regressão polinomial da evolução dos pH. Avaliou-se desses atributos a regressão polinomial, análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguidos pelo teste de Bonferroni para variáveis com distribuição paramétrica estatisticamente significativa. Os atributos composicionais foram analisados quanto à correlação. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da estatística descritiva dos queijos Minas Padrão comerciais

Experimentos para determinação da composição centesimal, além da gordura no extrato seco (GES) que tem importância tecnológica e para classificação legal dos queijos foram desenvolvidos, sendo os resultados apresentados na Tabela 1:

**Tabela 1.** Resultados dos atributos composicionais e gordura no extrato seco (GES) para os queijos Minas Padrão comerciais estudados.

|                  | Umidade<br>(% m/m) | Proteína<br>(% m/m) | Gorduras Totais<br>(% m/m) | GES<br>(%) | Cálcio Total<br>(mg/100g) |
|------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|------------|---------------------------|
| Média            | 42,37              | 22,54               | 26,67                      | 46,3       | 686,95                    |
| Desvio<br>Padrão | 3,78               | 1,40                | 1,87                       | 2,7        | 86,35                     |
| Amplitude        | 9,76               | 4,07                | 6,02                       | 7,6        | 320,85                    |
| Máximo           | 49,4               | 24,57               | 30,22                      | 49,5       | 825,15                    |
| Mínimo           | 35,42              | 20,50               | 24,20                      | 41,9       | 504,30                    |

De acordo com resultados apresentados na Tabela 1 o queijo Minas Padrão pode ser classificado, conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos – RTIQQ (BRASIL, 1996) como um queijo de média umidade (entre 36,0% m/m e 45,9% m/m) e gordo (entre 45,0% e 59,9%) por apresentar média de 42,37% m/m de umidade e GES de 46,3%. Porém ao analisar, levando-se em conta o desvio padrão ( $\pm 3,78\%$  m/m para umidade e  $\pm 2,7\%$  para GES), percebe-se que o queijo passa a integrar mais de uma faixa do critério de classificação tanto para umidade, podendo ser classificado como queijo de média (entre 36,0% m/m e 45,9% m/m) a alta umidade (entre 46,0% m/m e 54,9% m/m), quanto para GES, podendo ser classificado como queijo semigordo (entre 25,0% e 44,9%) ou gordo (entre 45,0% e

59,9%). A falta de um RTIQ específico para o queijo Minas Padrão é um grande agravante na descaracterização do produto já que legalmente, não existe critério para exclusão de produtos tão divergentes comercializados sob o nome de queijo Minas Padrão. É o que conclui Brumano *et. al.* (2011) ao avaliar resultados de aspectos físico-químicos do queijo Minas Padrão comercializados ao longo de doze anos. O referido trabalho observou que a umidade dos queijos variou de 43,4% m/m a 57,4% m/m e a GES variou de 43,9% a 70,4%.

Resultados divergentes dos valores do presente estudo foram encontrados por Paula (2010) ao fabricar queijo Minas Padrão com a tecnologia tradicional para usar como controle para aplicação de duas novas tecnologias quanto ao teor de umidade. O teor de umidade foi de 48,23%  $\pm$  1,24% m/m. Silva *et. al.* (2013) ao avaliar a composição físico-química de dezenove marcas de queijo Minas Padrão comercializado no Brasil encontraram resultados médios de composição centesimal semelhantes ao presente trabalho: umidade 42,67% m/m; proteína 18,97% m/m; gorduras totais 28,71% m/m; GES de 50,03. Porém, o pH médio dos queijos foi superior (5,66).

Outra divergência da tecnologia empregada nos laticínios para o que diz a legislação se dá no aquecimento da massa durante a fabricação do queijo. Segundo o RIISPOA (BRASIL, 1997) o queijo Minas Padrão deveria ser um queijo de massa crua, porém é comumente aplicado calor na massa que chega próximo a 40°C, portanto segundo o mesmo regulamento, um queijo de massa semicozida.

O teor de cálcio no leite é importante para a formação da estrutura do queijo. Nutricionalmente, o teor também é importante, porém é fundamental o conhecimento acerca da partição do cálcio, sendo esta determinante para uma boa absorção do mineral pelo organismo. Na Tabela 2 são apresentados os atributos da partição do

cálcio (cálcio na FA e cálcio livre), bioacessibilidade e pH do queijos Minas Padrão adquiridos no comércio para o estudo.

**Tabela 2.** Resultados dos atributos partição de cálcio, bioacessibilidade e pH para os queijos Minas Padrão comerciais estudados.

|                  | Cálcio Total<br>(mg/100 g) | Cálcio na FA<br>(mg/100 g) | Cálcio Livre<br>(mg/100 mL FA) | Bioacessibilidade<br>(%) | pH<br>queijo |
|------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|
| Média            | 686,95                     | 481,85                     | 99,31                          | 37,11                    | 5,14         |
| Desvio<br>Padrão | 86,35                      | 139,16                     | 10,73                          | 13,45                    | 0,20         |
| Amplitude        | 320,85                     | 434,68                     | 33,47                          | 39,55                    | 0,69         |
| Máximo           | 825,15                     | 671,31                     | 116,67                         | 59,23                    | 5,60         |
| Mínimo           | 504,30                     | 236,63                     | 83,20                          | 19,68                    | 4,91         |

Os testes realizados com os queijos Minas Padrão comerciais demonstraram grande variação na bioacessibilidade (desvio padrão de  $\pm 13,45\%$  com uma amplitude de 39,55%), sendo o valor médio de 37,11%. Fatores de variação na qualidade e composição não só do queijo como também da matéria prima (contaminação inicial, tempo e temperatura de estocagem refrigerada); variações de atributos como pH e partição do cálcio; alterações na condições de armazenamento, maturação e comercialização podem influenciar na bioacessibilidade do cálcio e também de outros nutrientes já que altera a velocidade das reações bioquímicas ocorridas durante a maturação e armazenamento do queijo o que pode disponibilizar ou indisponibilizar o cálcio para a absorção pelo organismo.

Quanto à partição do cálcio nos queijos Minas Padrão comerciais percebeu-se que aproximadamente 70% do cálcio total presente nos queijos estava disponível em sua FA e 14,46% do cálcio total estava disponível como cálcio livre. Trabalhos semelhantes com o mesmo queijo não foram relatados na literatura, mas trabalhos

com queijos de características distintas foram realizados. Morris *et. al.* (1988) analisaram a FA de um único tempo de maturação do queijo Cheddar e relataram que 43% do cálcio estava presente na FA. Lucey e Fox (1993) em outro estudo relataram que aproximadamente 28% do cálcio estava presente na FA do queijo Cheddar. Guinee *et. al.* (2000) analisaram uma série de amostras de queijo Cheddar comerciais com idade e condições de fabricação desconhecidas e relataram uma variação de 26% a 44% no teor de cálcio solúvel frente ao cálcio total. Thierry *et. al.* (1998) relataram que a proporção de cálcio solúvel no queijo Emmental foi de aproximadamente 30% e que o valor praticamente não mudou durante a maturação. Guinee *et. al.* (2000) também analisaram amostras de queijo Mussarela comercial e relataram que a proporção de cálcio solúvel variou de 17% a 25%. É possível que mudanças na proporção de cálcio solúvel durante a maturação seja devido à diferentes condições de fabricação e maturação (HASAN, JOHNSON, LUCEY, 2004).

Tal elevação na proporação do cálcio encontrado na FA frente ao cálcio total pode ser facilmente explicado uma vez que o Minas Padrão é um queijo de elevada acidez o que favoreceu a migração do cálcio retido na massa ligado as proteínas para a FA do queijo tanto na forma de cálcio livre ou na forma de sais.

O teor de cálcio associado à matriz proteica não foi estabelecido pela simples subtração do teor de cálcio na FA frente ao teor de cálcio total do queijo, uma vez que a extração da FA pode não ser completa e peptídeos solúveis podem carrear cálcio para a FA.

O queijos comercializados apresentaram 5,14 como pH médio sendo o desvio padrão de 0,20. A variação pode ser responsável por alterações consideráveis nas condições físico-químicas e sensoriais do produto, acarretando ao produtos



características bem distintas. Por não ter conhecimento sobre a tecnologia e condições de maturação e armazenamento dos queijos não se pode afirmar os principais fatores que possam ter causado tal variação.

## 5.2 Análise da estatística descritiva para os queijos Minas Padrão produzidos com diferentes tecnologias de fabricação

Assim como foram realizados com os queijos Minas Padrão comerciais foram determinados para ambas às tecnologias (A e B) utilizadas para estudo dos atributos de interesse durante o tempo de maturação. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas a estatística descritiva de ambos tratamentos utilizados na elaboração dos queijos Minas Padrão. Na Tabela 3 (composição e GES) e Tabela 4 (partição do cálcio, bioacessibilidade, pH do queijo e pH da FA).

**Tabela 3.** Resultados dos atributos composicionais e gordura no extrato seco (GES) para os queijos Minas Padrão fabricados.

| Atributo      | Umidade (% m/m) |       | Proteína (% m/m) |       | Gorduras Totais (% m/m) |       | GES   |       | Cálcio Total (mg/100g) |        |
|---------------|-----------------|-------|------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|------------------------|--------|
|               | A               | B     | A                | B     | A                       | B     | A     | B     | A                      | B      |
| Média         | 48,50           | 49,43 | 19,12            | 19,12 | 24,70                   | 24,34 | 47,95 | 48,14 | 549,47                 | 643,60 |
| Desvio Padrão | 1,92            | 1,57  | 1,21             | 0,68  | 1,09                    | 0,79  | 0,91  | 0,24  | 32,31                  | 80,88  |
| Amplitude     | 3,82            | 3,12  | 2,42             | 1,21  | 1,92                    | 1,58  | 1,60  | 0,48  | 64,60                  | 146,10 |
| Máximo        | 50,54           | 50,90 | 20,27            | 19,91 | 25,36                   | 25,11 | 49,00 | 48,40 | 581,20                 | 736,70 |
| Mínimo        | 46,72           | 47,78 | 17,85            | 18,70 | 23,44                   | 23,53 | 47,39 | 47,92 | 516,60                 | 590,60 |

Apesar de fabricados com diferentes tecnologias (A e B), os queijos não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quanto aos atributos de composição

centesimal dos macrocomponentes (umidade, proteína e gorduras totais), mas ao analisar os resultados de ambos os tratamentos frente aos resultados de umidade apresentado para os Tabela 1 queijos comerciais (Tabela 1), uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada. Os queijos fabricados obtiveram médias de umidade superiores (A = 48,50% m/m e B = 49,43% m/m) aos 42,37% m/m obtido como valor médio de umidade dos queijos Minas Padrão comerciais estudados. Estes resultados são corroborados com os resultados já mencionados apresentados por Paula (2010).

O GES teve valores médios semelhantes entre os tratamentos (47,95% para o tratamento A e 48,14% para o Tratamento B), sendo este um indicativo do controle do experimento. Classificando os queijos fabricados de acordo com o RTIQQ (BRASIL, 1996) as duas tecnologias proporcionaram classificar os queijos como queijos de alta umidade (entre 46,0% m/m e 54,9% m/m) e gordo (entre 45,0% e 59,9%), mantendo-se na mesma faixa de classificação mesmo levando-se em conta os respectivos desvios padrões. Tal classificação é coincidente com a classificação para queijo Minas Padrão descrita por Furtado & Lourenço Neto (1994).

Percebeu-se um ligeiro aumento do teor de cálcio total nos queijos do Tratamento B. Isto está intimamente ligado com a questão do pH que no referido tratamento apresenta ligeira alta. Ocorre maior desmineralização do queijo quanto menor for o pH do queijo, portanto maior quantidade de cálcio pode migrar para o soro do queijo já durante o processo de fabricação (FOX *at. al.*, 2000; FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

O cálcio adicionado durante a fabricação, sob a forma de cloreto de cálcio não foi relacionada com os resultados. Trata-se de um procedimento padrão para fabricação de queijos produzidos com leite pasteurizado para aumento do cálcio

solúvel em razão da insolubilização do cálcio que ocorre durante o aquecimento do processo de pasteurização. Foram adicionadas, em todas as fabricações, quantidades idênticas de cloreto de cálcio.

**Tabela 4.** Resultados dos atributos partição de cálcio, bioacessibilidade e pH para os queijos Minas Padrão fabricados.

| Atributos     | Cálcio Total (mg/100g) |        | Cálcio na FA (mg/100g) |        | Cálcio Livre (mg/100mL FA) |       | Bioacessibilidade (%) |       | pH queijo |      | pH FA |      |
|---------------|------------------------|--------|------------------------|--------|----------------------------|-------|-----------------------|-------|-----------|------|-------|------|
|               | A                      | B      | A                      | B      | A                          | B     | A                     | B     | A         | B    | A     | B    |
| Média         | 549,47                 | 643,60 | 459,65                 | 404,30 | 108,83                     | 92,29 | 17,94                 | 12,15 | 4,89      | 4,96 | 5,38  | 5,50 |
| Desvio Padrão | 32,31                  | 80,88  | 53,49                  | 79,22  | 13,46                      | 10,63 | 4,80                  | 2,82  | 0,03      | 0,14 | 0,03  | 0,22 |
| Amplitude     | 64,60                  | 146,10 | 94,95                  | 156,32 | 25,17                      | 18,84 | 8,40                  | 4,91  | 0,05      | 0,24 | 0,05  | 0,42 |
| Máximo        | 581,20                 | 736,70 | 521,36                 | 474,99 | 118,67                     | 98,87 | 19,22                 | 14,47 | 4,91      | 5,04 | 5,40  | 5,68 |
| Mínimo        | 516,60                 | 590,60 | 426,41                 | 318,67 | 93,50                      | 80,03 | 10,82                 | 9,56  | 4,86      | 4,80 | 5,35  | 5,26 |

Ao analisar a relação cálcio na FA frente o cálcio total para os Tratamentos A e B, observou-se que 83,65% do cálcio estava presente na FA para os queijos produzidos no tratamento A, estando 19,79% do cálcio total como cálcio livre e 62,82% do mineral estava na FA dos queijos fabricados de acordo com a tecnologia B, estando 14,34% do cálcio total como cálcio livre, o que pode ser justificado pelo mais baixo valor de pH, mesmo que sensivelmente menor, encontrado nos queijos submetidos a tecnologia de fabricação A (A = 4,83 e B = 4,96).

A determinação da bioacessibilidade de cálcio para os queijos submetidos às tecnologias A e B apresentaram os respectivos resultados: 17,94% e 12,15% (queijos analisados com 28 dias de fabricação), sendo o desvio padrão 2,82 e 4,80, respectivamente. Embora o pH seja menor nos queijos do Tratamento A, o mesmo

apresentou maior bioacessibilidade de cálcio que os queijos do Tratamento B. O fato pode ser decorrente do maior teor de cálcio na FA do Tratamento A (A = 459,65 mg/100g e B = 404,30 mg/100g), decorrente da maior desmineralização provocada pelo efeito do pH, mesmo que o teor de cálcio total do Tratamento B seja maior que do Tratamento A (A = 549,47 mg/100g e B = 643,60 mg/100g).

### **5.3 Correlações entre atributos centesimais dos queijos Minas Padrão produzidos com diferentes tecnologias de fabricação**

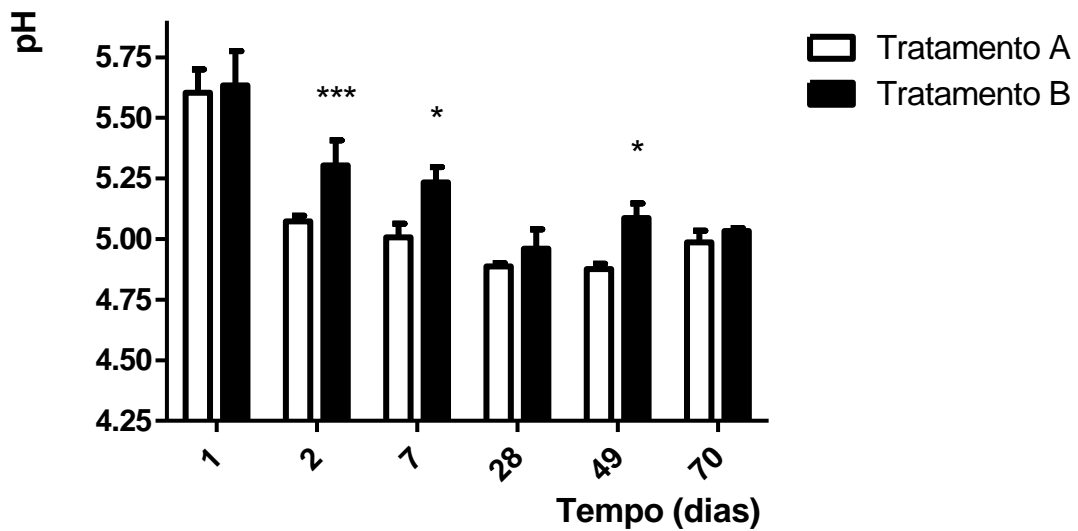
Por se tratar de um alimento de alta complexidade correlações significativas entre componentes de um queijo são raramente encontradas. No presente estudo foi possível obter, dentre os queijos fabricados (ambos os tratamentos), índices de correlação de - 0,999 entre teor umidade e teor de proteína. A correlação é negativa pois a proteína compõe os sólidos totais do queijo e este é inversamente proporcional ao teor de umidade; - 0,905 entre teor umidade e teor de gordura total. De igual forma a correlação é negativa uma vez que a gordura também compõe os sólidos totais do queijo e este é inversamente proporcional ao teor de umidade. Foi observada uma correlação positiva de 0,889 entre teor proteína e teor de gordura total. Isto ocorreu pois a matriz do queijo é composta de uma “rede” proteica que “aprisiona” a gordura para assim formar a quase totalidade da parte sólida da massa do queijo, portanto maior teor de proteína para composição da “rede” implica em maior “aprisionamento” de gordura (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

Tais correlações significativas corroboram a importância da utilização da correlação entre proteína e gordura nos queijos e, especificamente, a adequação da correlação caseína/gordura no leite, para melhoramento de rendimento e padronização composicional de queijos descrito por Costa Junior e Pinheiro (1998).

#### 5.4 Potencial hidrogeniônico

Percebeu-se constante variação do pH dos queijos Minas Padrão ao longo da maturação. Com a realização da análise de variância constatou-se efeito do tratamento ( $p < 0,01$ ), ou seja, o Tratamento A diferiu significativamente do Tratamento B. O Tratamento A resultou em médias de pH mais baixas que o Tratamento B ao longo da maturação em decorrência de uma maior lactose residual no queijo, uma vez que não houve lavagem da massa ao longo da fabricação. Com mais lactose distribuída na massa ocorreu maior fermentação da mesma com produção de ácido lático e consequente redução do pH.

Observou-se também efeito do tempo de maturação na variação de pH ( $p < 0,001$ ). Com o avançar do tempo de maturação a lactose vai sendo consumida por ação de bactérias do fermento ou por NSLAB (*Non Starter Latic Acid Bacteria*), o que resulta no abaixamento do pH. O pH volta a ser elevado, no presente experimento, com aproximadamente 49 dias. Esse aumento pode ser atribuído, principalmente, à proteólise com liberação de amônia a partir da degradação das proteínas do queijo em aminoácidos os quais também são degradados. O pH também pode ser elevado com a degradação do ácido lático presente no queijo. Após obtenção das médias e análise de variância de duas vias seguido do teste de Bonferroni (Figura 3) foi possível também à realização da distribuição de médias conforme demonstra o Quadro 1:



**Figura 3.** Evolução do pH ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido do teste de Bonferroni (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) já no dia seguinte à fabricação (A = 5,07 e B = 5,30) e ( $p < 0,05$ ) entres os tratamentos do estudo nas determinações realizadas com sete dias de fabricação (A = 5,01 e B = 5,23) e com 49 dias de fabricação (A = 4,88 e B = 5,09). A diferença expressiva entre os tratamentos nos queijos com 2 dias de fabricação demonstra o efeito da ausência de lavagem da massa no Tratamento A que deixou a massa do queijo com elevado teor de lactose e números de bactérias fermentadoras.

**Quadro 1.** Distribuição de médias do pH ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

|         | pH<br>Tecnologia A | pH<br>Tecnologia B |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1 dia   | 5,60 A             | 5,63 a             |
| 2 dias  | 5,07 B             | 5,30 b             |
| 7 dias  | 5,01 B             | 5,23 b             |
| 28 dias | 4,89 B             | 4,96 c             |

|         |        |         |
|---------|--------|---------|
| 49 dias | 4,88 B | 5,09 bc |
| 70 dias | 4,99 B | 5,03 c  |

Médias seguidas da mesma letra, em um mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade.

Houve alteração significativa ( $p < 0,001$ ) do pH no Tratamento A ao longo da maturação percebido logo entre o primeiro e segundo dia de fabricação. Por não ter tido a massa lavada, os queijos ficaram com maior teor de lactose residual e também maior quantidade de bactérias fermentadoras que permitiu logo nas duas primeiras determinações (5,60 no primeiro dia e 5,07 no segundo dia) intensa fermentação não tendo, nas determinações posteriores, abaixamento intenso por ter baixa concentração de substrato. Nos queijos do Tratamento B a fermentação foi mais lenta e devido à menor quantidade de lactose. Com isso possibilitou que diferenças significativas fossem encontradas ao longo das determinações. Tal diferenciação foi percebida logo nas duas primeiras determinações ( $p < 0,01$ ) (5,63 com 1 dia e 5,30 com 2 dias), voltando a ser percebida entre sete dias e 28 dias ( $p < 0,01$ ) com médias 5,23 e 4,96, respectivamente. O pH dos queijos submetidos ao Tratamento B voltaram a se elevar sensivelmente com 49 dias de fabricação (5,09), possivelmente em decorrência da proteólise.

Os valores médios de pH encontrados neste experimento foram ligeiramente superiores aos observados por Londoño (1998) que obteve valores médios de pH variando de 4,91, nos tempos 3 dias a 5 dias, a 4,85, nos tempos 28 dias a 32 dias ao avaliar a composição físico-química de sete marcas de queijos Minas Padrão, porém são semelhantes ao encontrado por Paula (2010) ao avaliar o efeito do dióxido de carbono e da água carbonatada na fabricação do queijo Minas Padrão.

O pH dos queijos normalmente apresenta comportamento inverso ao teor de lactose na massa que, dependendo do tipo de queijo, é consumida em

aproximadamente 15 dias. Em queijos com elevado teor de lactose, o pH pode continuar a decrescer durante quase toda a maturação. No entanto, o aumento no pH é comum em diversas variedades de queijos. Esse aumento pode ser decorrente do processo de degradação do ácido láctico presente na massa do queijo juntamente com a proteólise e liberação de amônia a partir da degradação de aminoácidos (FOX *et. al.*, 2000). Tal proteólise é favorecida pelo alto teor de umidade do queijo Minas Padrão.

No presente estudo, o abaixamento do pH se estendeu até próximo de 30 dias. Hipóteses acerca de tal resultado podem ser levantadas. Por ser um queijo livre de cultivos aromáticos tipo “LD” e possuir elevado teor de umidade, o Minas Padrão possui significativo teor residual de ácido cítrico, um ácido fraco que ao dissociar de forma lenta prorroga o tempo de abaixamento de pH. Deve ser considerada também a presença eventual de lactose residual embora este açúcar tenda a ser degradado nos primeiros dias. Uma combinação de baixa temperatura na maturação e um teor razoável de sal que abaixe substancialmente a atividade de água na massa do queijo possibilita que resíduos da lactose permaneçam por varias semanas em pontos do queijo sendo esta degradada lentamente, por ação de bactérias do fermento ou por NSLAB, à medida que o sal se difunde no queijo (FURTADO, 2005).

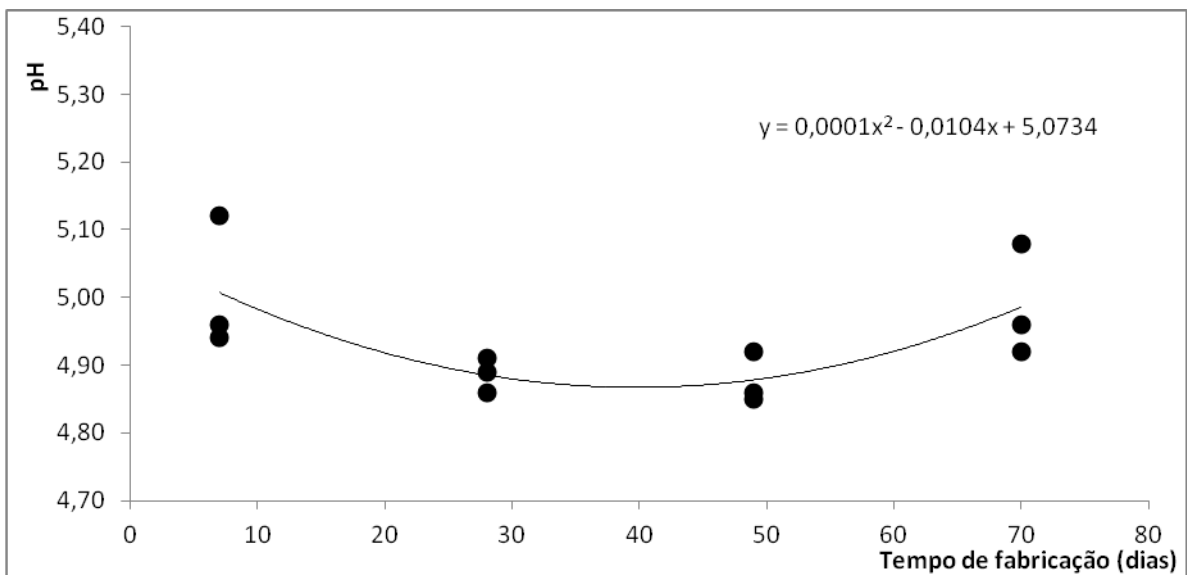
Fermentações de outros substratos que não a lactose gera outros ácidos nos queijos, por exemplo, a fermentação do lactato de cálcio leva a formação de ácido propiônico e de ácido acético, que podem deslocar ligeiramente o pH para baixo. O mesmo lactato pode formar ácido butírico, em presença de bacilos esporulados. Às vezes estes fenômenos são observados devido ao efeito tamponante exercido pela liberação de radicais aminas no queijo, em razão de intensa proteólise. Em certos



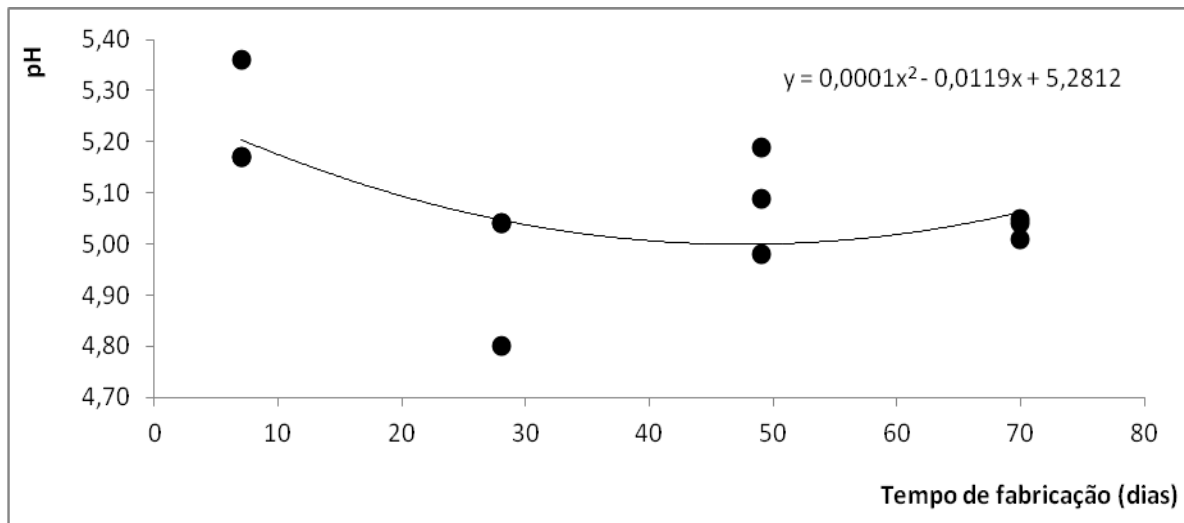
queijos mais ácidos, como o queijo Minas Padrão, a proteólise costuma ser limitada, e assim, tem menor efeito tampão (FURTADO, 2005).

Estabeleceu-se também, com as medições de pH uma regressão polinomial, para cada tratamento, que permitiu delinear o comportamento da maturação dos queijos estudados e estimar valores de pH não determinados conforme é demonstrado na Figura 4. Não foram considerados as duas primeiras determinações (1 dia e 2 dias) para a construção das regressões por estas determinações apresentarem comportamento distinto das demais, havendo acentuada fermentação nas primeiras 24 horas devido ao grande teor de substrato para fermentação por ação microbiana.

(I)



(II)



**Figura 4.** Regressões polinomiais do comportamento do pH ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).

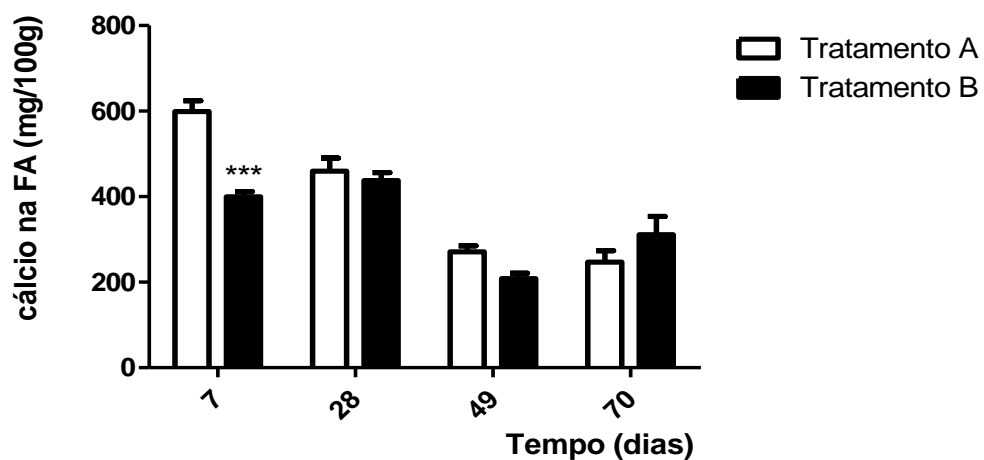
Os modelos matemáticos propostos, com coeficientes significativos a ( $p < 0,05$ ), para demonstração do comportamento do pH ao longo do tempo de maturação dos dois tratamentos efetuados no estudo foram bastante semelhantes, apresentando pouca variação na estimativa do pH no tempo inicial ( $b$  (I) = 5,0734 e  $b$  (II) = 5,2812) e igual comportamento no quadrado da inclinação da curva  $ax^2 = 0,0001$ .

### 5.5 Cálcio na Fase Aquosa

Ao analisar os teores de cálcio nas FAs ao longo da maturação observou-se certa relação direta com o pH, uma vez que durante a maturação com o decréscimo do pH percebeu-se um comportamento semelhante do teor de cálcio na FA. Porém avaliando o teor de cálcio na FA entre os tratamentos, percebeu-se maior teor no Tratamento A no qual o pH era mais baixo. Com a realização da análise de variância percebeu-se efeito do tratamento ( $p < 0,01$ ), ou seja, o Tratamento A diferiu significativamente do Tratamento B. Para o Tratamento A foi observado médias do teor de cálcio na FA mais altas que no Tratamento B em decorrência da maior

solubilização do cálcio uma vez que os queijos apresentam menor pH, efeito também chamado de desmineralização. Na análise de variância foi perceptível também o efeito de tempo ( $p < 0,0001$ ). Com o avançar do tempo o teor de cálcio na FA é diminuído. Isto ocorre, possivelmente, devido à intensa proteólise ao longo da maturação e a quebra da proteína em fragmentos de menor tamanho, (proteínas de menor massa molar e peptídeos). A quebra de um fragmento grande em diversos fragmentos menores desestabiliza o equilíbrio da distribuição do cálcio no queijo. O cálcio transferido para a FA é importante para estabilização dos peptídeos formados, carreando juntamente consigo a água, a qual tem seu papel na estabilização por solvatar os peptídeos formados. A pressão exercida para extração da FA dos queijos não é suficiente para deslocar fisicamente tal camada de solvatação da massa do queijo.

Os teores médios de cálcio na FA ao longo da maturação para os dois tratamentos efetuados, submetidos à análise de variância de duas vias e ao teste de Bonferroni, são representados na Figura 5, sendo o quadro de distribuição das médias mostrado no Quadro 2.



**Figura 5.** Evolução dos teores de cálcio na fase aquosa ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido do teste de Bonferroni (\*\* $p < 0,001$ ).

A diferença significativa entre os tratamentos testados é devido à diferença percebida somente no tempo de sete dias ( $p < 0,001$ ) que teve médias de teor de cálcio na FA de 599,03 mg/100g (A) e 399,65 mg/100g (B). Para o Tratamento A foram observadas médias dos teores de cálcio nas FAs mais altas que no Tratamento B na primeira determinação (sete dias) em decorrência já mencionada da desmineralização, a qual perde efeito no decorrer da maturação.

**Quadro 2.** Distribuição de médias dos teores cálcio na fase aquosa ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

|         | <b>Cálcio na FA (mg/100g)<br/>Tecnologia A</b> | <b>Cálcio na FA (mg/100g)<br/>Tecnologia B</b> |
|---------|--|--|
| 7 dias  | 599,03 A                                       | 399,65 a                                       |
| 28 dias | 459,65 B                                       | 437,63 a                                       |
| 49 dias | 271,22 C                                       | 208,00 b                                       |
| 70 dias | 246,85 C                                       | 311,09 b                                       |

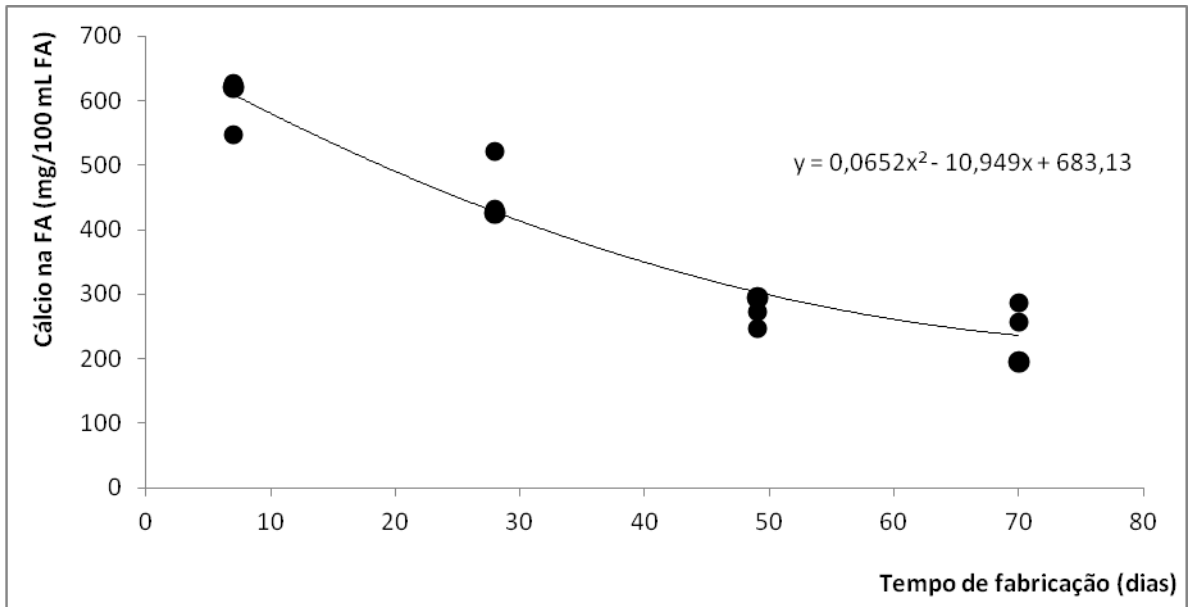
Médias seguidas da mesma letra, em um mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade.

Os teores de cálcio nas FAs para os queijos fabricados seguindo tecnologia chamada Tratamento B decresce significativamente ( $p < 0,001$ ) entre 28 dias (437,63 mg/100g) e 49 dias de maturação (208,00 mg/100g), não sendo significativa a diferença entre sete dias e 28 dias e, entre 49 dias e 70 dias. Mais pontos de variação foram percebidos nos queijos fabricados de acordo com tecnologia denominada Tratamento A, entre sete dias (599,03 mg/100g) e 28 dias (459,65 mg/100g) ( $p < 0,01$ ) e, 28 dias (459,65 mg/100g) e 49 dias (271,22 mg/100g) ( $p < 0,001$ ) se estabilizando desde então.

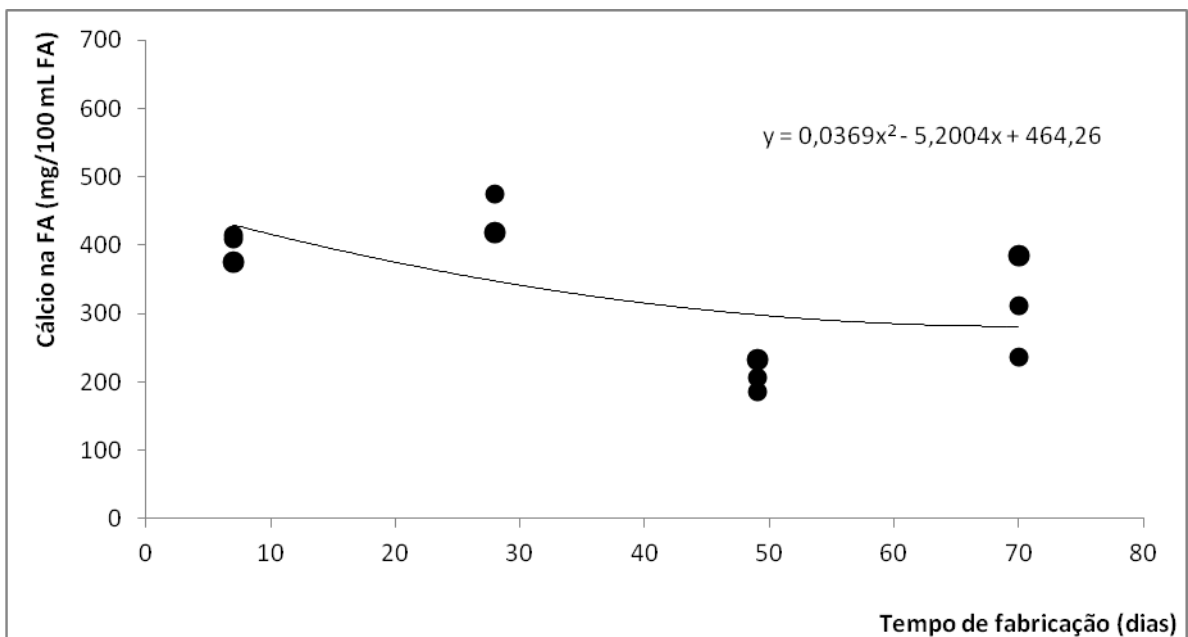
Por meio das medições dos teores de cálcio nas FAs, determinaram-se regressões polinomiais, uma para cada tratamento, que permitiu delinear o

comportamento da maturação dos queijos estudados e estimar os teores de cálcio na FA não determinados conforme é demonstrado na Figura 6.

(I)



(II)



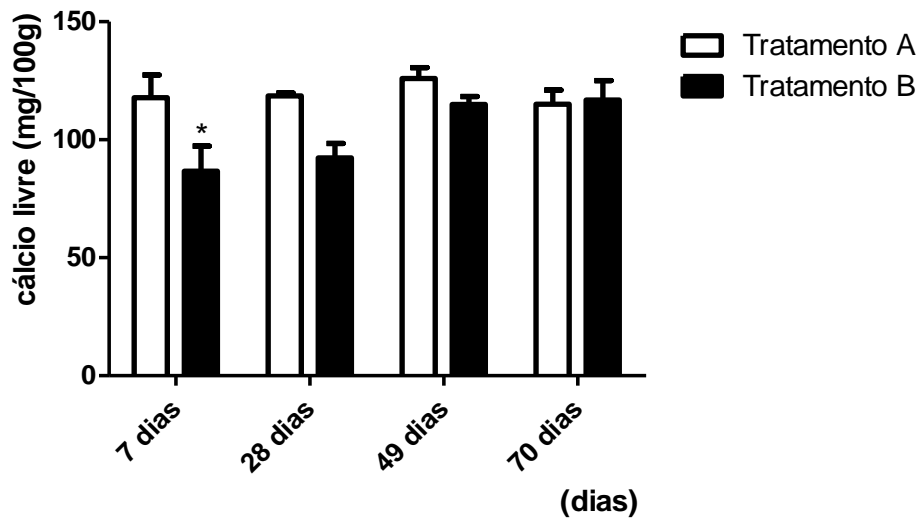
**Figura 6.** Regressões polinomiais do comportamento do cálcio na fase aquosa ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o Tratamento A – (I) e Tratamento B – (II).

Observa-se um decréscimo constante do teor de cálcio na FA ao longo da maturação do queijo Minas Padrão, sendo este mais acentuado do Tratamento A (I) onde  $ax = - 10,949$  que no Tratamento B (II) onde  $ax = - 5,2004$ . No primeiro ponto de análise percebeu-se que os queijos do Tratamento A tinham maiores teores de cálcio na FA, efeito da desmineralização causada pelo menor pH do tratamento em questão. A diferença entre teores de cálcio na FA passa a não ser perceptível, entre os tratamentos, a partir do segundo ponto de medição (28 dias) devido a um reequilíbrio do cálcio entre as fases no queijo, promovida provavelmente, pelo aumento da ação de enzimas proteolíticas diminuindo o tamanho das cadeias proteicas, requerendo assim, maior quantidade de água para solvatação destes compostos nitrogenados, carreando consigo o cálcio na FA.

## 5.6 Cálcio Livre

Cálcio livre é o cátion bivalente do mineral presente na FA. O cálcio nesta natureza eleva-se com a diminuição do pH. Ao realizar análise de variância foi percebido efeito de tratamento sobre o cálcio livre ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os tempos de maturação para nenhum dos tratamentos.

Os teores médios de cálcio livre ao longo da maturação para os dois tratamentos efetuados, submetidos à análise de variância de duas vias e ao teste de Bonferroni, são representados na Figura 7.

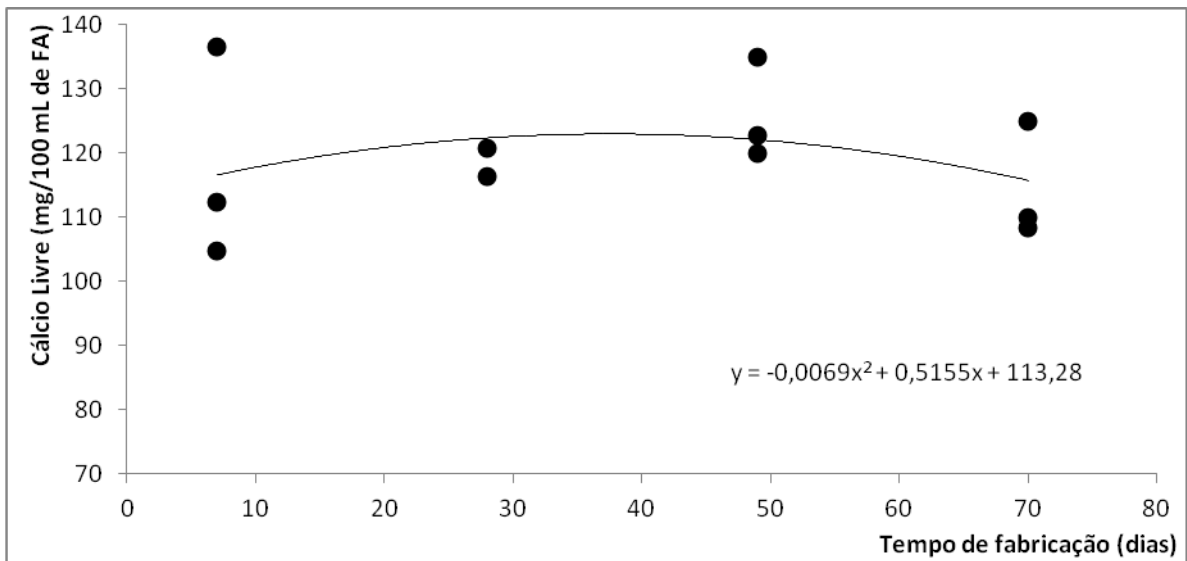


**Figura 7.** Evolução dos teores de cálcio livre ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido de teste Bonferroni (\* $p < 0,05$ ).

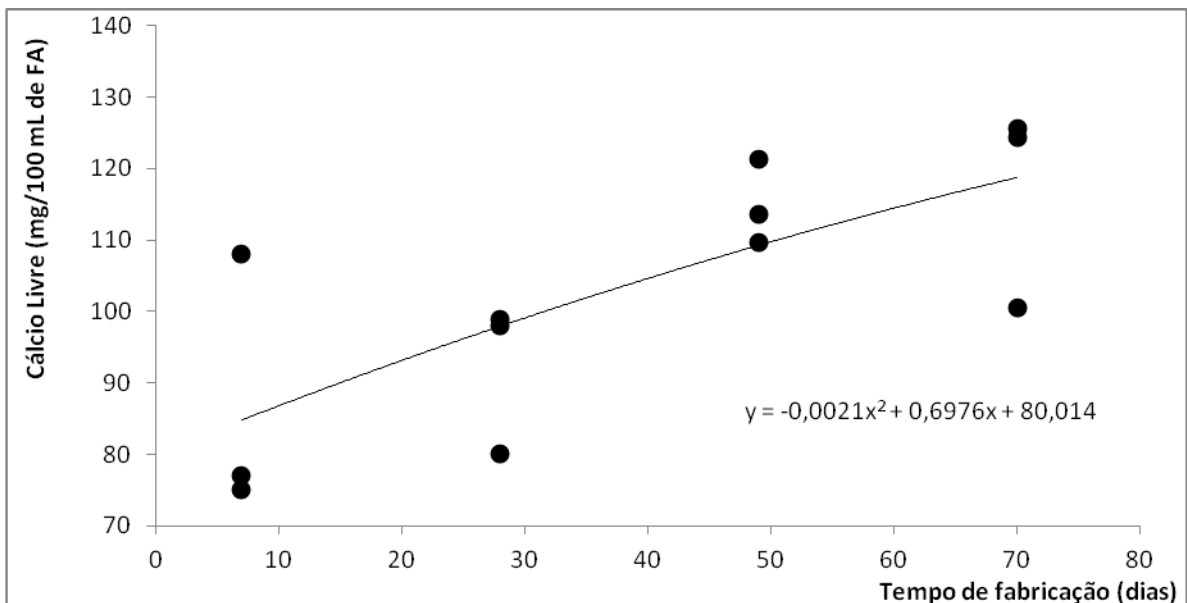
Os teores de cálcio livre para os queijos produzidos para o estudo (Tratamentos A e B) apresenta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente no tempo de sete dias que conta com médias de teor de cálcio livre de 117,83 mg/100g de FA (A) e 86,68 mg/100g de FA (B). Para o Tratamento A foram observadas médias mais altas nos teores de cálcio livre que no Tratamento B. No tratamento A foi observado também menor variação do teor de cálcio livre ao longo da maturação, ou seja, uma certa estabilização do mineral na FA. Isto é percebido porque na primeira determinação (sete dias) o teor de cálcio livre já é elevado 117,83 mg/100g de FA, também em decorrência de um pH baixo neste tempo de determinação.

Por meio das medições dos teores de cálcio livre, determinaram-se regressões polinomiais, uma para cada tratamento, que permitiu delinear o comportamento da maturação dos queijos estudados e estimar os teores de cálcio livre não determinados conforme é demonstrado na Figura 8.

(I)



(II)



**Figura 8.** Regressões polinomiais do comportamento do cálcio livre ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o Tratamento A – (I) e Tratamento B – (II).

É observada uma tendência a aumento do teor de cálcio livre ao longo da maturação do queijo Minas Padrão, com coeficientes significativos ( $p < 0,05\%$ ), bem representado por (II), cujo valor de  $ax$  (0,6979) representa um aumento mais significativo (maior inclinação) que o tratamento A (I) que teve como  $ax$  (0,5155).



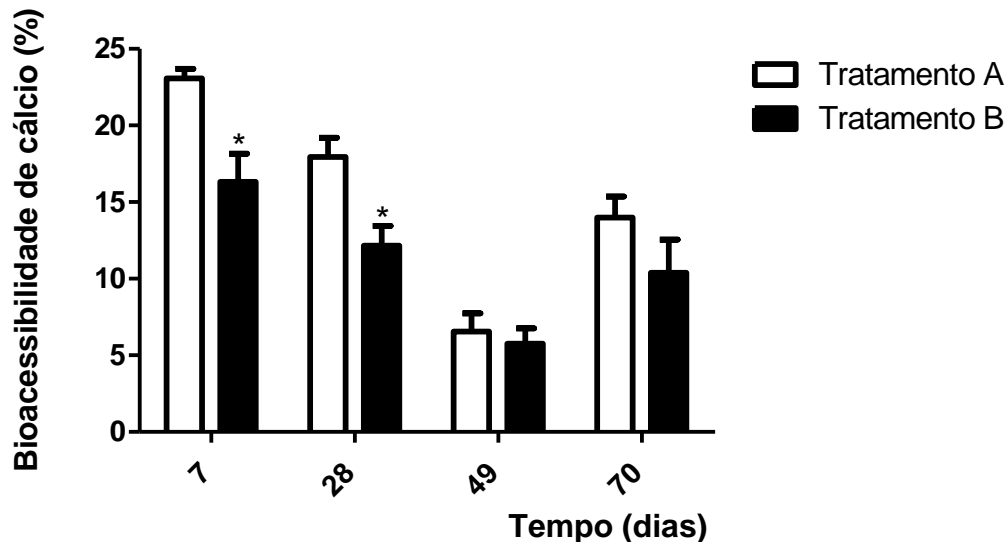
Como dito, no tratamento A (I) não foi observado tal característica, tendo a linha de tendência da repressão gráfica uma leve característica de parábola. Ao analisar os valores, é percebido, entretanto, que ao longo da maturação, os queijos fabricados sem lavagem da massa (Tratamento A) tiveram no tempo inicial representado no modelo ( $b = 113,28$ ) e ao longo dos pontos analisados maior quantidade de cálcio livre, uma vez que se tem uma relação inversa entre dissociação dos sais presentes no queijo com seu pH. O tratamento B apresenta na origem estimada no modelo, menor quantidade de cálcio livre ( $b = 80,014$ ).

### **5.7 Bioacessibilidade de cálcio**

Observou-se constante variação da bioacessibilidade ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão. Com a realização da análise de variância percebeu-se efeito do tratamento ( $p < 0,001$ ), ou seja, o Tratamento A diferiu significativamente do Tratamento B. Os experimentos com os queijos do Tratamento A demonstraram médias de percentual de bioacessibilidade de cálcio maiores que com os do Tratamento B em decorrência de vários fatores dentre eles os estudados, cálcio na FA e cálcio livre, sendo estes coordenados principalmente pelas variações do pH.

Foi verificado também efeito do tempo de maturação ( $p < 0,001$ ) na variação do percentual de bioacessibilidade do cálcio. Com o avançar do tempo de maturação o pH é diminuído. Isto reduz a bioacessibilidade do mineral no queijo. O teor de cálcio na FA também diminui na fase inicial da maturação impactando também negativamente na bioacessibilidade do cálcio. Com a elevação do pH (decorrente da proteólise e degradação do ácido láctico) na fase final da maturação a bioacessibilidade volta a elevar-se, influenciado também pela sensível elevação do teor de cálcio na FA. Após obtenção das médias e análise de variância de duas vias

seguido do teste de Bonferroni (Figura 9) foi possível também à realização da distribuição de médias conforme demonstra o Quadro 3:



**Figura 9.** Evolução dos percentuais de bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para os tratamentos A e B seguido de teste de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando analisado o efeito dos tratamentos, ou seja, as tecnologias de fabricação estudadas, nos dois primeiros tempos avaliados (7 dias e 28 dias). Na determinação realizada aos sete dias de fabricação a bioacessibilidade do cálcio foram de 23,07% para o Tratamento A e de 16,32% para o Tratamento B. Na determinação com 28 dias de fabricação os resultados médios encontrados foram de 17,94% de bioacessibilidade do mineral para o Tratamento A e 12,15% para o Tratamento B.

Por ser escassa a literatura citando a referida metodologia de bioacessibilidade para pesquisas com cálcio em queijos, foi, portanto, necessário para o presente estudo, a utilização de trabalhos de biodisponibilidade de cálcio para busca da construção do conhecimento acerca do assunto.

Recker *et. al.* (1988) ao avaliarem a absorção de cálcio em produtos lácteos encontrou que 22,9% do cálcio presente no queijo (*cream cheese*) era absorvido. Valores semelhantes foram encontrados para outros derivados a se destacar o iogurte com 25,4%.

Van Dokkum *et. al.* (1995) ao controlarem a dieta de mulheres, com grupos consumindo queijo fresco para um estudo de biodisponibilidade de cálcio encontrou resultados maiores do que o presente estudo. Obteve resultados onde 37,7% do cálcio ingerido era biodisponibilizado. Ressalta-se que a dieta não constava exclusivamente do alimento marcado com isótopos, e, uma dieta complementar padrão era fornecida aos participantes.

**Quadro 3:** Distribuição de médias dos percentuais de bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão submetido a diferentes tecnologias de fabricação (A e B) analisadas por meio do teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

|         | <b>Bioacessibilidade (%)<br/>Tecnologia A</b> | <b>Bioacessibilidade (%)<br/>Tecnologia B</b> |
|---------|---|---|
| 7 dias  | 23,07 A                                       | 16,32 a                                       |
| 28 dias | 17,94 B                                       | 12,15 a                                       |
| 49 dias | 6,56 C  | 5,75 b  |
| 70 dias | 13,99 B                                       | 10,38 ab                                      |

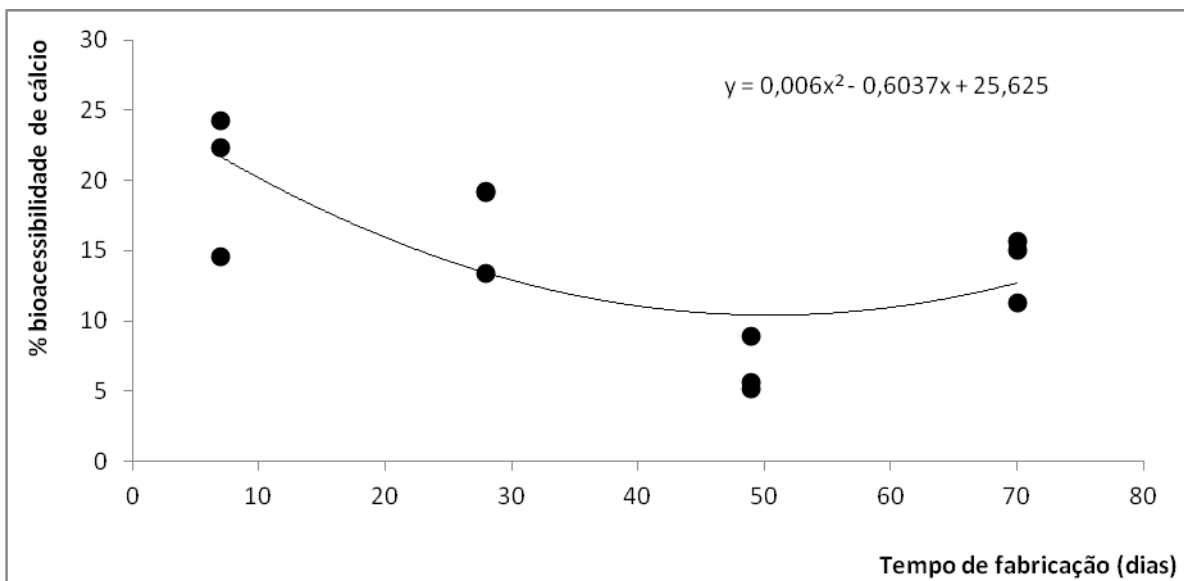
Médias seguidas da mesma letra, em um mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade.

Este queijo tem indicação para o consumo após 20 dias de maturação como cita o RIISPOA (BRASIL, 1997), obtendo notas de avaliação sensorial superiores até com maior tempo de maturação (PAULA, 2011), mas sob o ponto de vista nutricional, sobretudo do queijo Minas Padrão como fonte de cálcio, seria adequado o consumo do queijo fresco onde teve média, no Tratamento A, 23,07% do mineral bioacessível com sete dias de fabricação. Nas determinações posteriores a

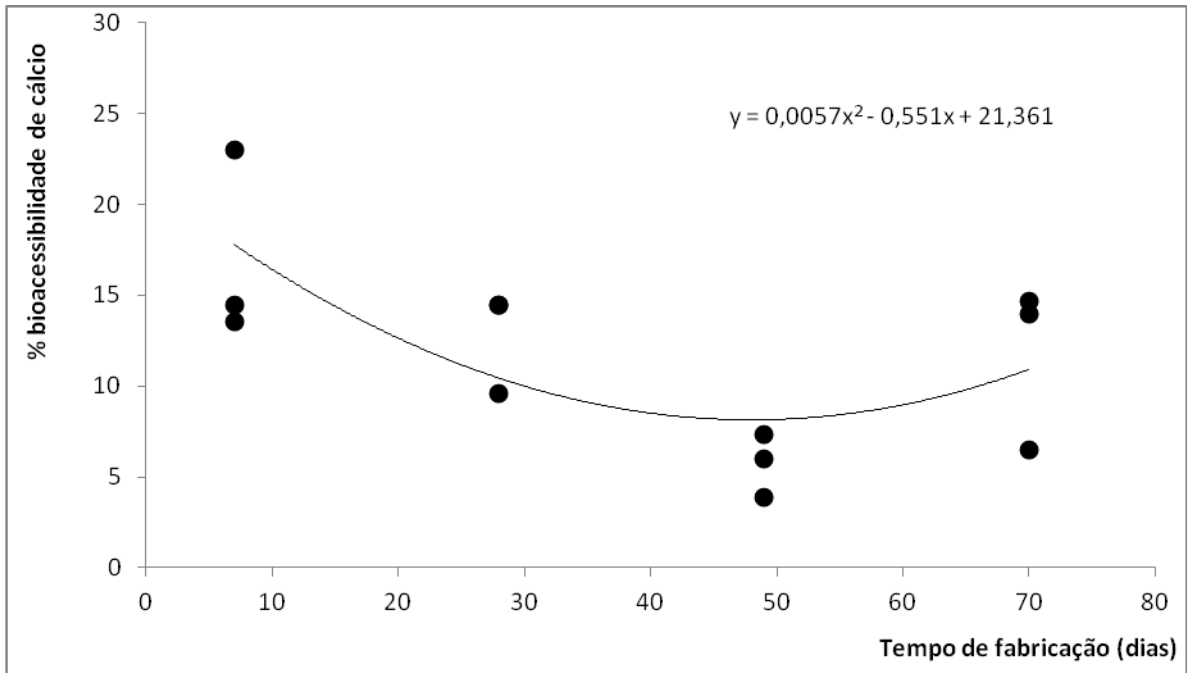
bioacessibilidade média do cálcio nos queijos deste tratamento diminuiu ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) sendo as médias 17,94% com 28 dias e 6,56% com 49 dias, voltando a elevar-se ( $p < 0,05$ ) na ultima determinação do estudo com 70 dias (13,99%), fato este que concorda com o ligeiro aumento do pH observado.

Para o tratamento B determinou-se que 16,32% do mineral estava bioacessível com sete dias de fabricação, valor não diferente estatisticamente ( $p > 0,05$ ) da média determinada aos 28 dias (12,15%). Já na determinação da bioacessibilidade aos 49 dias notou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) com média de 5,75. Na ultima determinação a bioacessibilidade do cálcio foi elevada 10,38%, também concordante com a ligeira elevação do pH nesta fase da maturação.

(I)



(II)



**Figura 10.** Regressões polinomiais do comportamento da bioacessibilidade do cálcio ao longo da maturação do queijo Minas Padrão para o tratamento A – (I) e tratamento B – (II).

A curva de bioacessibilidade do cálcio acompanha a tendência de outros atributos já discutidos. Com o abaixamento do pH é evidenciado uma diminuição da bioacessibilidade do mineral que volta a subir, menos acentuadamente, com a retomada do aumento do pH.

Os modelos propostos em (I) e (II) demonstraram bastante semelhança evolução da bioacessibilidade ao longo do tempo, com coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ), destacando-se uma maior bioacessibilidade estimada no tempo inicial para os queijos submetidos ao Tratamento A frente aos queijos do Tratamento B,  $b$  (I) = 25,625 e  $b$  (II) = 21,361, respectivamente. Fato ocorrido pela maior desmineralização em um primeiro momento, e, conseqüente maior transferência de cálcio para a FA no Tratamento A que no Tratamento B, o que elevou a bioacessibilidade.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nas condições utilizadas neste trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- durante a maturação ocorreram variações na partição do cálcio, teor de cálcio na FA e dissociação do mineral na FA, sendo estas alterações ligadas a mudanças físico-químicas e bioquímicas nos queijos, sobretudo em relação a variações do pH;
- os queijos Minas Padrão comerciais analisados revelaram desuniformidades composicionais e em relação à partição do cálcio, tendo, por consequência, grandes variações na bioacessibilidade do cálcio;
- a bioacessibilidade do cálcio diminuiu ao longo da maturação dos queijos Minas Padrão fabricados para o estudo, independente do tratamento testado, devido ao abaixamento do pH e do teor de cálcio na FA, voltando a se elevar na fase final do período de maturação. Levando-se em consideração o tempo de maturação, é possível afirmar, sob o ponto de vista nutricional, que maior bioacessibilidade do cálcio é encontrada na fase inicial (até sete dias) e na fase final (aproximadamente 70 dias) de maturação, embora sensorialmente e historicamente trata-se de um queijo consumido com mais de 20 dias de maturação. Em um mesmo tempo de determinação, comparando se os queijos obtidos com e sem massa lavada, evidenciou-se que a bioacessibilidade foi maior no segundo grupo;
- a falta de um Regulamento Técnico específico para o queijo Minas Padrão contribui para a grande variabilidade na composição deste queijo, prejudicando sua identidade e sua indicação como alimento fonte de cálcio

em dietas, visto que esta variação interfere na bioacessibilidade do cálcio e, conseqüentemente, no cálculo de porções de alimentos para suprimento de necessidades diárias.

## 7. DIREÇÃO DE FUTUROS ESFORÇOS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, a discussão acerca da relação entre atributos físico-químicos e seus impactos na bioacessibilidade de nutrientes em queijos, ganha ainda maior importância. Especificamente, a bioacessibilidade do cálcio por meio da metodologia implantada, reforça a necessidade de estudos com maior detalhamento nos aspectos físico-químicos e bioquímicos envolvidos na elaboração de alimentos, sobretudo naqueles que envolvem processos mais complexos como os queijos.

A elevada diversidade composicional dos queijos e o seu potencial de reações químicas, faz com que esses alimentos mereçam maior atenção nos fatores que abrangem sua qualidade desde a matéria-prima, a tecnologia de fabricação e as condições de maturação. Tais fatores modificam o fracionamento do cálcio e, possivelmente, de outros elementos no queijo, o que pode influenciar suas bioacessibilidades.

A pesquisa da bioacessibilidade de outros constituintes dos queijos, como as proteínas e os peptídeos, é importante sob o ponto de vista nutricional, uma vez que os resultados obtidos podem compor tabelas utilizadas por profissionais de saúde, contribuindo para uma melhor adequação de dietas alimentares às necessidades individuais.

A relação da partição e distribuição de outros elementos com atributos encontrados nos queijos tem importância corroborada com a apresentação dos resultados do presente estudo, o que atribui às variações tecnológicas destacado valor na elaboração de produtos com melhor qualidade nutricional.



A realização de pesquisas de bioacessibilidade de cálcio e outros nutrientes, tanto em queijos quanto em outros produtos industrializados podem subsidiar com informações científicas os órgãos que elaboram as legislações nacionais de alimentos, os centros de pesquisas e a indústria na melhoria de processos produtivos e no desenvolvimento de produtos.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, L.; SAITO, M. M. A evolução das enzimas coagulantes. **Food Ingredients Brasil**. n. 16, p. 38 – 39, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 de março de 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto n. 2.244 de 04 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 de junho de 1997.

BRONNER, F.; PANSU, D. Nutritional aspects of calcium absorption. **Journal of Nutrition**. n.129, v.1, p.9 – 12, 1999.

BRUMANO, L. P.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D. Avaliação de Aspectos físico-químicos do queijo Minas Padrão comercializados nos últimos 12 anos e suas variações. **Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia. EPAMIG**. Belo Horizonte, 2011.

BUZINARO, E. F.; ALMEIDA, R. N. A.; MAZET, G. M. F. S. Biodisponibilidade do Cálcio Dietético. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. n.5, v.50, p.852 – 861, 2006.

COMINETTI, C. Capítulo 7. Cálcio. **Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição**. Org. COZZOLINO, S. M. F; COMINETTI, C. Editora: Manole, São Paulo, p.177 – 194, 2013.

CORMAN, L. C. **Nutrição clínica**. Clínicas Médicas da América do Norte. v.4, p.958-969, 1993.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-química do Queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 53, n. 305, p.29 - 49, 1998.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4ª edição. Editora: Manole, São Paulo, 2010. 1334p.

DAWSON-HUGHES B.; HARRIS S. S.; FINNERAN S. Calcium Absorption on High and Low Calcium Intakes in Relation to Vitamin D Receptor Genotype. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabology**. n.80, v.12, p.3657 – 3661, 1995.

DE LA FUENTE, M. A.; BELLOQUE, J.; JUÁREZ, M. Mineral contents and distribution between the soluble and the micellar phases in calcium-enriched UHT milks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. n.84, p.1708 -1714. 2004.

FDA- USA. Food and Drug Administration. **U.S. Department of Health and Human Services**. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). BP Revision 1, 2003.

FOX, P. F.; TIMOTHY P. G.; TIMOTHY M. C.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science** 1 Ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication, 2000. 545p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. Edição Revisada e Ampliada**. Comunicação e Editora, São Paulo, 2005. 200 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1a ed.: Dipemar, São Paulo, 1994. 118p.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do Queijo**. 2ºed. Ed. Globo, São Paulo, 1990. 295p.

GARCÍA, E. F.; LÉRIDA, I. C.; GÁLVEZ, A. P. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. n.29, p.751–760, 2009.

GRÜDTNER, V. S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A. L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.37, n.3, p.143 – 151, 1997.

GRUPPER, S. S.; SMITH, J. L.; GROFF, J. L. **Nutrição Avançada e Metabolismo Humano**. Editora: Cengage Learning, São Paulo, 2011. 612p.

GUÉGUEN, L. The Bioavailability of Dietary Calcium. **Journal of the American College of Nutrition**. v.19, n.2, p.119S – 136S, 2000.

HASSAN, A.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Changes in the Proportions of Soluble and Insoluble Calcium During the Ripening of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**. n. 87, p.854 - 862, 2004.

IEPHA – Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico do estado de Minas Gerais.

LONDOÑO, M. M. D.; FURTADO, M. M.; ABREU, L. R. Comparação dos processos de fabricação, composição centesimal e sensorial do queijo Minas Meia Cura com os queijos Minas Padrão e Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 54, n. 306, p.20 - 22, 1999.

LUCEY, J. A.; FOX, P. F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. **Journal of Dairy Science**. n. 76, p.1714 - 1724, 1993.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**. n. 86, p.2725 - 2743, 2004.

LUTEN, J.; CREW, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L. H.; FAINVEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FRARHLICHJ, W. Interlaboratory Trial on the Determination of the *In Vitro* Iron Dialysability from Food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.72, p.415 – 424, 1996.

MARTINI, L.; WOOD, R. J. Relative bioavailability of calcium-rich dietary sources in the elderly<sup>1-4</sup>. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.76, p. 1345 – 1350, 2002.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na Cidade de São Luis, MA. **Arq. Inst. Biol.**, v.76, n.4, p.547-551, São Paulo, 2009.

MORENO, V. J. Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microregião Campo das Vertentes. **Dissertação de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – área: Qualidade do Leite e Derivados**). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. 2013. 131p.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica – métodos e interpretações**. 2ª ed. Editora: Médica Missau, v. 11, Rio de Janeiro, p. 143 – 166, 2000.

PARQUE NACIONAL SERRA DA CANASTRA, MMA/IBAMA, 2005. 223p.

PAULA, J. C. J. Efeito do uso de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) na fabricação de queijos Minas Frescal e Minas Padrão. **Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010. 120p.

PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M., SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Estratégias para otimizar o consumo de cálcio. **Revista Brasileira de Reumatologia**. N.49, v.2, p.164 – 180, 2009.

RECKER, R. R.; BAMMI, A.; BARGER-LUX, J. HEANEY, R. P. Calcium Absorbility from milk products, an imitation milk and carbonate. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.47, p. 93 – 95, 1988.

SALVAT-BRUNAUD, D.; MAUBOIS, J. L.; LE GRAËT, Y.; PIOT M.; MAILLARD, M. B.; CORRE, C.; THIERRY, A. Extraction et analyse de la phase aqueuse de l'emmental à 4 stades d'affinage. **Lait**. n.75, p.239 – 249, 1995.

SILVA, M. D. S.; CARVALHO, A. M. O.; OLIVEIRA, P. M.; RENHE, I. R. T.; PEREIRA, D. B. C. Composição físico-química de queijo Minas Padrão comercializado no Brasil. **II Seminário de Iniciação Científica Júnior da zona da mata mineira**. 2013.

SIQUEIRA, E. M. A.; MENDES, J. F. R; ARRUDA, S. F. Biodisponibilidade de minerais em refeições vegetarianas e onívoras servidas em restaurante universitário. **Revista de nutrição**. v.20, n.3, p.229 – 237, 2007.

TONGON, A. L. Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais. **Dissertação de Mestrado em Ciências – área: Química**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 2012. 111p.

VAN DOKKUM, W.; DE LA GUERONNIÈRI, V.; SCHAAFSMA, G.; BOULEY, C.; LUTEN, J.; LATGE, C. Bioavailability of calcium of fresh cheeses, enteral food and mineral water. A study with stable calcium isotopes in young adult women. **British Journal of Nutrition**. v.75, p.893 – 903, 1996.

ZIEGLER, E. E.; FOMON, S. J. Lactose Enhances Mineral Absorption in Infance.  
**Journal of Pediatric, Gastroenterology and Nutrition.** n.2, p.288 – 294, 1983.