

# O DIÓXIDO DE CARBONO (CO<sub>2</sub>) E SEUS EFEITOS TECNOLÓGICOS NO LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS

## The carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and its technological effects in milk and dairy products

*Junio César Jacinto de PAULA<sup>1</sup>*

*Antônio Fernandes de CARVALHO<sup>2</sup>*

*Felipe Alves de ALMEIDA<sup>3</sup>*

*Renata Golin B. COSTA<sup>4</sup>*

*Denise SOBRAL<sup>5</sup>*

### SUMÁRIO

O serviço de Inspeção Federal brasileiro atualmente proíbe a adição de CO<sub>2</sub> ao leite para a fabricação de queijos e outros produtos lácteos. A justificativa contra a adição é que os possíveis efeitos microbiológicos relatados na literatura possam gerar algum tipo de negligência com relação às boas práticas de produção do leite e de fabricação dos produtos lácteos. No entanto, os principais efeitos benéficos para diversos produtos lácteos, como os queijos, são de caráter tecnológico e econômico. Esses benefícios gerados pela utilização do CO<sub>2</sub> são suficientes para justificar a sua aplicabilidade e incentivar as pesquisas futuras. Conforme relatos de indústrias que trabalharam com leite acidificado por meio de injeção de CO<sub>2</sub> para a fabricação de queijos, somente as economias geradas com a diminuição de uso de coagulante seriam suficientes para garantir o retorno do investimento na implantação do sistema em apenas dois meses e meio. Sendo assim, acredita-se que a legislação sobre o assunto possa avançar particularmente se houver interesse da indústria de laticínios. Os efeitos tecnológicos provocados no leite devido à utilização de CO<sub>2</sub> sugerem a necessidade de modificação do processo de fabricação de alguns produtos visando melhorar os benefícios obtidos. Modificações bem sucedidas serão necessárias para dar subsídios às indústrias de laticínios na tomada de decisão quanto à utilização dessa tecnologia. O presente trabalho apresenta uma revisão sobre as propriedades e os efeitos da utilização do CO<sub>2</sub> no leite e em produtos lácteos buscando entender e aumentar o aporte de conhecimento científico a respeito dessa tecnologia por parte de pesquisadores e empresas do setor lácteo brasileiro.

**Termos para indexação:** Carbonatação; Processamento de leite e derivados; Tecnologia.

### 1 INTRODUÇÃO

A pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> para a fabricação de queijos e outros produtos lácteos pode trazer benefícios tecnológicos e econômicos. Ao contrário de outros ácidos, grande parte do ácido carbônico formado pela solubilização do CO<sub>2</sub>

é perdida durante o processo de fabricação e pode ser removida por processos de centrifugação ou degaseificação a vácuo, sem efeito prejudicial para o alimento. É considerado inócuo ao consumo humano, como substância GRAS (Generally Recognized as Safe), e não precisa ser declarado no rótulo dos produtos. O CO<sub>2</sub> apresenta solubilidade

- 1 Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV). Pesquisador e Professor da EPAMIG-CEPE/ILCT. Rua Tenente Freitas, 116, Juiz de Fora – MG-Brasil. Tel: 32-3224-3116. E-mail: junio@epamig.br.
- 2 Pós-Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV). Professor Adjunto do DTA/UFV. Campus Universitário – Viçosa – MG – Brasil. Tel: 31-3899-1800. E-mail: antoniofernandes@ufv.br.
- 3 Biomédico (UNIPAC). Campus VI – Juiz de Fora. Av. Juiz de Fora, 1100, Granjas Betania. CEP 36047-362. Juiz de Fora – MG – Brasil. E-mail: felipealvesdealmeida@yahoo.com.br.
- 4 Doutora em Ciência dos Alimentos (UFLA). Pesquisadora e Professora da EPAMIG-CEPE/ILCT. Rua Tenente Freitas, 116, Juiz de Fora – MG – Brasil. Tel: 32-3224-3116. E-mail: renata.costa@epamig.br.
- 5 Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV). Pesquisadora e Professora da EPAMIG-CEPE/ILCT. Rua Tenente Freitas, 116, Juiz de Fora – MG- Brasil. Tel: 32-3224-3116. E-mail: denisesobral@epamig.br.

*Recebido/ Received: 04/08/2011*

*Aprovado / Approved: 29/08/2011*

no leite mesmo durante o processo de fabricação de queijos de massa crua, em temperatura de 38°C, podendo permanecer nos produtos durante a maturação, estocagem e distribuição. Nos alimentos com alto teor de umidade, o CO<sub>2</sub> pode se dissolver na fase aquosa, formando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que se dissocia nas espécies iônicas bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e hidrogênio (H<sup>+</sup>) (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

Diversos efeitos podem ser visivelmente observados na tecnologia e no produto final, quando se utiliza a pré-acidificação do leite para fabricação de queijos. Dentre eles, vários autores têm relatado efeitos tecnológicos como diminuição do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada, maior liberação de soro, redução da dose de coalho, melhor controle do processo e alterações no rendimento.

A injeção de CO<sub>2</sub> normalmente é feita na linha de alimentação do tanque de fabricação sendo que a taxa de injeção e o tempo de contato com o leite tem de ser calculados quando o sistema for instalado e o teor de CO<sub>2</sub> pode ser medido pelo pH final do leite. Queijarias que utilizam o dióxido de carbono relatam que a quantidade de coalho pode ser reduzida pela metade sem efeitos adversos, o que seria uma grande vantagem do ponto de vista econômico.

## 2 O CO<sub>2</sub> E SEUS EFEITOS ANTIMICROBIANOS

Quando dissolvido no meio aquoso, o CO<sub>2</sub> pode retardar a multiplicação de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo que seu efeito inibidor varia em função do micro-organismo e da fase na curva de crescimento em que ele se encontra. O dióxido de carbono é muito usado para estender a vida de prateleira de alimentos perecíveis, por meio da inibição de diversas enzimas naturais e microbianas e do retardamento da multiplicação de bactérias, particularmente aquelas encontradas no leite e nos produtos lácteos. O efeito combinado do CO<sub>2</sub> e outras técnicas de conservação de alimentos como refrigeração, pasteurização ou embalagens impermeáveis tem sido demonstrado (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

As moléculas de gás carbônico são apolares e, portanto, mais solúveis em lipídios do que em água. Essa característica aumenta seu efeito antimicrobiano ao facilitar sua dissolução na membrana plasmática bacteriana, alterando sua fluidez e permitindo maior entrada de ácido carbônico, na forma não dissociada, para o interior da célula, criando um ambiente tóxico e modificando seu pH interno (LOSS e HOTCHKISS, 2003). O mecanismo pelo qual o CO<sub>2</sub> afeta a multiplicação microbiana e seu metabolismo ainda não foi totalmente

elucidado, sendo que quatro principais teorias foram propostas por Loss e Hotchkiss (2003):

- A solubilidade do CO<sub>2</sub> nos lipídeos pode afetar a estabilidade da membrana celular;
- As reações de solubilização resultam na redução do pH intracelular criando estresse ambiental, além de provocar também gasto de energia para manter a homeostase por meio da força motriz ao ativar o mecanismo de bomba de hidrogênio.
- Como metabólito de diversas reações, o CO<sub>2</sub> pode provocar desperdício de energia celular;
- CO<sub>2</sub> pode provocar alterações físico-químicas e regular diversas enzimas importantes.

Dependendo dos fatores intrínsecos a que o micro-organismo está exposto e, ou do seu estado físico, uma combinação desses mecanismos seria a provável causa para o efeito antimicrobiano do CO<sub>2</sub>.

Para Daniels et al. (1985), uma das principais explicações para a adição de dióxido de carbono em alimentos é o fato de que, sendo um gás mais pesado, desloca parte ou a totalidade do oxigênio viável necessário ao metabolismo bacteriano, diminuindo o crescimento. Com a eliminação do O<sub>2</sub> pela substituição da atmosfera por dióxido de carbono, é criado um ambiente de anaerobiose, ocorrendo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons pela falta do O<sub>2</sub> como acceptor final de elétrons. A microbiota aeróbia é inibida desfavorecendo a multiplicação de contaminantes como fungos filamentosos e leveduras.

Genigeorgis (1985) sugere que a atividade antimicrobiana do CO<sub>2</sub> se deve à sua absorção pela fase aquosa, formando o ácido carbônico, seguido de sua ionização e consequente abaixamento do pH. Segundo Daniels et al. (1985) e Dixon e Kell (1989), a ação do CO<sub>2</sub> sobre a microbiota tem sido atribuída a vários fatores, e não apenas ao pH baixo.

O efeito final do dióxido de carbono seria o retardamento da fase lag e, ou da taxa de multiplicação na fase log de micro-organismos deterioradores. Entretanto, o mecanismo específico para o efeito inibidor ainda não foi proposto pelos autores (DANIELS et al., 1985; CHURCH e PARSONS, 1995; FARBER, 1991 e PHILLIPS, 1996). Para Farber (1991), as principais teorias de ação do CO<sub>2</sub> sobre os micro-organismos seriam a alteração na função da membrana celular, afetando a absorção de nutrientes; inibição direta do sistema enzimático e na taxa de respiração; penetração do CO<sub>2</sub> pela membrana microbiana, resultando na mudança interna do pH e mudança direta nas propriedades físico-químicas das enzimas responsáveis pelo metabolismo celular.

Outros fatores como concentração final e inicial do gás, temperatura de estocagem e quantidade

de gás dissolvido, assim como estágio da curva de multiplicação inicial, além de fatores como pH,  $A_w$  (atividade de água), concentração de sal e açúcar, também exercem influência sobre a atividade inibidora do  $CO_2$  (PHILLIPS, 1996; SARANTÓPAULOS et al., 1998). A solubilidade do  $CO_2$  é inversamente proporcional à temperatura de estocagem, sendo que a multiplicação microbiana é reduzida a altas concentrações de  $CO_2$  e o efeito global é aumentado com o abaixamento da temperatura durante a estocagem (GILL e TAN, 1980).

O dióxido de carbono é mais eficaz em alimentos em que os micro-organismos deterioradores são normalmente aeróbios, Gram-negativos e psicrotróficos, fato esse que incentiva ainda mais a sua utilização para estender a vida útil de produtos lácteos (DANIELS et al., 1985; CHURCH e PARSONS, 1995 e PHILLIPS 1996). No entanto, deve-se atentar especialmente para o fato de que inibir a multiplicação de micro-organismos naturalmente associados com o produto pode resultar em aumento do número de organismos diferentes, os quais podem ser micro-organismos patogênicos para o homem (CRUZ, 2000).

### 3 UTILIZAÇÃO DE $CO_2$ EM LATICÍNIOS

O dióxido de carbono tem sido empregado para aumentar a vida de prateleira de alimentos refrigerados, inibindo a multiplicação de micro-organismos deterioradores, como bactérias psicrotróficas (GUILLAUME et al., 2004). A refrigeração do leite preconizada pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento produz condições que são seletivas para bactérias psicrotróficas, principalmente *Pseudomonas* spp. Esse grupo de micro-organismo é responsável pela deterioração de leite e produtos lácteos por causa da sua capacidade de produzir enzimas termorresistentes (proteases e lipases) que afetam o rendimento e a qualidade dos produtos. Rowe (1988) mostrou que a adição de  $CO_2$  tem um efeito diferencial na produção de enzimas extracelulares por *Pseudomonas fluorescens*, particularmente lipase, sendo inibida em maior extensão do que a multiplicação bacteriana.

Como resultado da busca de melhorias econômicas na indústria de laticínios, existe uma demanda por métodos que permitam prolongar a estocagem do leite, e dos produtos lácteos, sem riscos subsequentes e que permitam maior flexibilidade na sua utilização.

#### 3.1 Utilização de $CO_2$ em leite

Gevaudan et al. (1996) relataram que a injeção

de  $CO_2$  sob pressão diminui o pH do leite e, após a despressurização, o pH retorna ao seu estado inicial. No estudo não foram observadas mudanças na concentração de P, Ca, ou Mg na fase aquosa do leite após a ultracentrifugação. No entanto, as curvas de capacidade tamponante do leite despressurizado que foi tratado com o  $CO_2$  foram diferentes daquelas do leite original. Foram observados dois picos (pH 4,95 e 5,40) na curva de capacidade tamponante, em vez de um, demonstrando que a solubilização de  $CO_2$  induziu a formação de um novo sistema salino. Sendo assim, o  $CO_2$  tem um efeito reversível no pH e um efeito irreversível no fosfato de cálcio coloidal inorgânico, o qual é transformado em outras formas salinas.

A aplicação de  $CO_2$  sob pressão durante o tratamento térmico do leite pode reduzir o tempo requerido para a esterilização ou pasteurização e, portanto, minimizar a degradação térmica de substâncias sensíveis como vitaminas (ERKMEN, 2001).

O prazo de validade do leite pasteurizado refrigerado poderia ser estendido por no mínimo 25 até 200% em concentrações próximas ao limiar de percepção sensorial ( $> 0,0028$  mol/L e  $\leq 0,0091$  mol/L de  $CO_2$ ) com o uso de embalagens que ofereçam barreira à saída do  $CO_2$ , proporcionando maior retenção do gás no meio e otimizando o seu efeito durante a validade. As maiores variáveis que influenciam no tempo de vida útil são as quantidades de  $CO_2$  adicionado e as propriedades de barreira da embalagem (HOTCHKISS et al., 1998).

O tratamento do leite refrigerado com 20 a 30 mmol/L de  $CO_2$  foi avaliado como um método para prolongar a vida útil e inibir a multiplicação de bactérias psicrotróficas. Os tempos de geração para cada uma das cinco espécies de *Pseudomonas* foram significativamente superiores quando cultivados a 7°C em leite estéril tratado com  $CO_2$  comparando-se as mesmas bactérias cultivadas em leite estéril sem adição do gás. Quando os leites crus foram armazenados a 7°C e tratados com o  $CO_2$ , o tempo necessário para aumentar a contagem de 10 vezes foi pelo menos 24 horas maior do que nos mesmos leites não tratados. Também o número de coliformes totais, psicrotróficos e aeróbios e anaeróbios facultativos foram significativamente menores no leite cru tratado com  $CO_2$  que no leite não tratado incubado a 7°C por seis dias (ROBERTS e TORREY, 1988). O número de coliformes, psicrotróficos e aeróbios (facultativos e obrigatórios), foi significativamente mais baixo no leite cru tratado com  $CO_2$  que em leite não tratado incubado a 7°C por seis dias. O tratamento a 101,97 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão de  $CO_2$  por sete horas causou a diminuição de 6,42 e 7,24 ciclos logaritmos na população de *E. coli* em leite integral e leite desnatado, respectivamente, quando

inoculados com culturas puras não patogênicas desses micro-organismos (ERKMEN, 2001).

King e Mabbitt (1982) examinaram o efeito de concentrações de 0,01 mol/L a 0,03 mol/L de CO<sub>2</sub> na multiplicação de bactérias psicrotróficas em leite integral cru e em culturas puras de *P. fluorescens* em leite desnatado e caldo nutriente. A deterioração de leite integral cru foi inibida pela adição de CO<sub>2</sub> e o efeito foi aumentado com o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> e diminuição da temperatura de estocagem. Experimentos com culturas puras de *Pseudomonas fluorescens* mostraram que o efeito inibitório do CO<sub>2</sub> não decorreu do aumento da acidez ou do deslocamento de oxigênio, mas da presença do CO<sub>2</sub>, o qual induziu aumento da duração da fase lag de multiplicação e teve um pequeno efeito na fase log.

Werner e Hotchkiss (2002) pesquisaram o efeito do CO<sub>2</sub> na multiplicação de esporos de *Bacillus cereus* no leite durante a estocagem prolongada e concluíram que a adição de 0,0119 mol/L de CO<sub>2</sub> reduziu o pH do leite de 6,61 para 6,31. Os dados sugerem que a adição de moderados níveis de CO<sub>2</sub> inibem a germinação de esporos de *Bacillus cereus*, durante longos períodos de estocagem, diminuindo o risco de doenças alimentares por esses micro-organismos.

Foi avaliado o efeito de concentrações de CO<sub>2</sub> dissolvido (0,0006 a 0,0614 mol/L) na multiplicação bacteriana em leite cru e em culturas puras inoculadas em leite estéril a 15°C utilizando condutância. Os leites estéreis foram inoculados isoladamente com um e seis micro-organismos diferentes (*P. fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*) até uma concentração final de aproximadamente 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL. O leite cru foi ajustado com uma população bacteriana de aproximadamente 10<sup>3</sup> UFC/mL. Em todos os casos, o CO<sub>2</sub> dissolvido inibiu a multiplicação de bactérias do leite cru, e influenciou as fases lag, exponencial e estacionária, bem como em todas as culturas puras testadas. A adição de CO<sub>2</sub> no leite cru aumentou a fase lag e o tempo de multiplicação em 100%, mesmo a 15°C. O CO<sub>2</sub> dissolvido reduziu a multiplicação microbiana em todos os micro-organismos testados, no entanto, a inibição foi menor em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. O dióxido de carbono influenciou as fases de multiplicação de maneira diferente para todos os organismos. As bactérias Gram-positivas tiveram um aumento significativo na fase lag. Já as bactérias Gram-negativas apresentaram aumento significativo na fase lag e também no tempo para atingir a população máxima (MARTIN et al., 2003).

Foram determinados os efeitos do CO<sub>2</sub> dissolvido no leite sobre o desempenho de quatro

importantes testes de rotina. A adição de CO<sub>2</sub> (1 g/L) não afetou o desempenho de três marcas diferentes de testes para verificar a presença de resíduos de antibióticos no leite. A adição de CO<sub>2</sub> diminuiu o pH e o ponto de congelamento do leite, sendo que essa diminuição foi reversível com a remoção do CO<sub>2</sub> dissolvido. O aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> no leite aumentou as leituras de absorvância das amostras no comprimento de onda de referência da lactose (7,651 µm a 7,788 µm) e modificou o seu índice de refração (~ - 0,18%). As mudanças nos teores de proteínas (≤ - 0,02%) e gordura (≤ + 0,03%) foram relativamente pequenas. Para os testes de fosfatase alcalina, a adição de CO<sub>2</sub> não afetaria a habilidade de um analista em diferenciar um leite pasteurizado de um leite cru ou um leite pasteurizado que foi contaminado com leite cru, utilizando-se os métodos: Fluorophos, Charm PasLite, e Schärer Modificado (MA et al., 2001).

Ma et. al. (2003) avaliaram o efeito da adição de CO<sub>2</sub> na proteólise e lipólise do leite cru refrigerado a 4°C. A adição de 1,5 g/L de CO<sub>2</sub> retardou a multiplicação de bactérias no leite cru durante os 21 dias de armazenamento a 4°C. Para a contagem padrão de leite cru atingir o limite legal de 3 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, a partir de uma contagem inicial de 10<sup>4</sup> UFC/mL, o tempo total foi cerca de 7 dias para o controle e para o leite acidificado com HCl em comparação com 14 dias para o leite tratado com 1,5 g/L de CO<sub>2</sub>. Do ponto de vista da contagem microbiana, a adição de 1,5 g/L de CO<sub>2</sub> dobrou o tempo de armazenamento do leite cru a 4°C. Esse tempo de armazenamento poderia ser estendido ainda mais se a contagem inicial fosse mais baixa aliada a uma maior concentração de CO<sub>2</sub> e temperaturas de estocagem inferiores. A adição de CO<sub>2</sub> no leite cru diminuiu a proteólise por pelo menos dois mecanismos: redução das proteases devido à reduzida multiplicação microbiana e a possível redução na atividade da plasmina em função do pH mais baixo do leite. O efeito do CO<sub>2</sub> na redução da lipólise foi atribuído a uma reduzida multiplicação microbiana. Não foi detectado nenhum efeito da adição de CO<sub>2</sub> ou acidificação do leite na lipólise pela lipase natural do leite.

Foram investigados os efeitos na microbiota endógena do leite cru estocado sob pressões de 0,69 a 6,93 kgf/cm<sup>2</sup> de CO<sub>2</sub> em temperaturas de 5°C, 6,1°C, 10°C e 20°C. Essas combinações de pressão e temperatura não causaram precipitação de proteínas do leite e a contagem de aeróbios mesófilos do leite tratado mostrou-se mais baixa comparada com o controle em todas as temperaturas. O leite cru tratado com CO<sub>2</sub> e armazenado a 6,1°C por 4 dias exibiu multiplicação bacteriana reduzida. As taxas de pressões de 0,69 kgf/cm<sup>2</sup>, 1,75 kgf/cm<sup>2</sup>, 3,51 kgf/cm<sup>2</sup>, 5,26 kgf/cm<sup>2</sup> e 7,02

kgf/cm<sup>2</sup> demonstraram ser eficientes na redução da viabilidade da contagem total. O tratamento a 7,02 kgf/cm<sup>2</sup> também reduziu *Lactobacillus* spp. e bactérias Gram-negativas. O tempo requerido para leite cru, tratado a 7,02 kgf/cm<sup>2</sup> alcançar 4,30 log UFC/mL a 4°C, foi aumentado em 4 dias, comparado com o controle. Coliformes totais no leite tratado manteve-se a 1,95 log UFC/mL por 9 dias de tratamento. Esses dados indicaram que o armazenamento do leite cru tratado com baixas pressões de CO<sub>2</sub> pode reduzir a multiplicação bacteriana sem causar precipitação de proteínas. Baixa pressão de CO<sub>2</sub> combinada com a refrigeração do leite melhoraria a qualidade microbiológica e a segurança do leite cru e poderia ser uma estratégia efetiva para transporte por longas distâncias de leite refrigerado "in natura" ou concentrado (RAJAGOPAL et al., 2005).

### 3.2 Utilização de CO<sub>2</sub> em outros produtos lácteos

Paula (2005) elaborou e avaliou a estabilidade de uma bebida carbonatada à base de soro de leite obtido das fabricações de queijo Minas Padrão e Mussarela. O produto obteve boa aceitação sensorial e apresentou estabilidade físico-química e microbiológica durante o armazenamento à temperatura ambiente por pelo menos três meses.

Chio e Kosikowski (1984) produziram um iogurte aromatizado carbonatado a 5 kgf/cm<sup>2</sup> e armazenado sob refrigeração a 4°C. O CO<sub>2</sub> retardou a pós-acidificação do produto durante a estocagem refrigerada a 4,4°C, sendo estável durante 4 meses de vida útil. O iogurte não carbonatado (controle) não obteve aceitabilidade sensorial após 30 dias.

Gueimonde et al. (2003) estudaram a adequabilidade de leite conservado por refrigeração, durante cinco dias a 4°C, e adição de CO<sub>2</sub> para fabricação de iogurte. O produto foi fabricado após a pasteurização do leite refrigerado e carbonatação (pH 6,15) e comparado com dois controles diferentes que foram fabricados a partir de leite pasteurizado fresco ou a partir de leite mantido refrigerado. A capacidade de multiplicação e acidificação da cultura "starter", bem como a evolução da acidez, não foi afetada pela prévia refrigeração e adição de CO<sub>2</sub> no leite cru ou por resíduos de CO<sub>2</sub> presentes no leite pasteurizado. A refrigeração aumentou a produção de etanol e diacetil. Contudo, não houve diferenças nas propriedades sensoriais durante a estocagem refrigerada entre o iogurte fabricado com leite tratado com CO<sub>2</sub> e aqueles fabricados com leite refrigerado. Os autores concluíram que o leite refrigerado acidificado com CO<sub>2</sub> poderia ser satisfatoriamente usado na fabricação de iogurte.

Noriega et al. (2003) estudaram a inibição de *Bacillus cereus* em leite "bífido" fermentado carbonatado. A população de *Bifidobacterium infantis* não foi afetada pela presença de CO<sub>2</sub> e a população de *B. cereus* foi reduzida dois ciclos logarítmicos em 12 horas de incubação em leite carbonatado, a 37°C. Durante a estocagem a 4°C, o CO<sub>2</sub> também preveniu a degradação proteolítica das amostras contaminadas, inibiu a formação de ácidos orgânicos pelo *B. cereus*, reduziu a proporção de ácidos acético e láctico no leite fermentado. Os autores concluíram que o uso de leite acidificado com CO<sub>2</sub> não afetou as propriedades sensoriais do produto. Portanto, a carbonatação de leite, tratado termicamente, antes da adição da bifidobactéria pode contribuir para reduzir o risco de contaminação de leite bífido por *B. cereus*.

O uso de leite acidificado com CO<sub>2</sub> não tem efeito prejudicial nas propriedades sensoriais de leite fermentado com bactérias lácticas e probióticas (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*). A carbonatação de leite pasteurizado antes da adição de cultura "starter" poderia ser usada satisfatoriamente para reduzir o tempo de fabricação desses produtos. Os níveis mais elevados de acidez das amostras carbonatadas (como resultado da produção de ácido carbônico pela dissolução do CO<sub>2</sub>) e acidificadas aumentaram a multiplicação e a atividade metabólica da cultura "starter" durante a fermentação e foi a razão para a redução no tempo de incubação do leite fermentado (VINDEROLA et al., 2000).

Vianna (2010) avaliou o efeito da adição de CO<sub>2</sub> sobre a qualidade dos leites cru e UHT. O leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub> foi armazenado a 4°C e a 7°C e as amostras foram avaliadas quanto à contagem padrão em placas, psicotróficos e *Pseudomonas* spp., concentração de CO<sub>2</sub>, proteólise e lipólise, até a contagem padrão em placas atingir 7,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. O tempo de conservação foi de 14 dias para o leite armazenado a 4°C adicionado de CO<sub>2</sub> e de 5 dias para o armazenado a 7°C não adicionado de CO<sub>2</sub>. Independente da temperatura de armazenamento, a adição de CO<sub>2</sub> estendeu o tempo de fase lag e de geração dos micro-organismos psicotróficos e reduziu sua taxa de crescimento. O leite adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou menor proteólise e lipólise quando comparado ao não adicionado dado o menor desenvolvimento de psicotróficos. Após seis dias de armazenamento a 4°C, o leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> manteve sua qualidade físico-química e microbiológica, enquanto o leite não adicionado sofreu perda significativa de qualidade. A taxa de aumento de proteólise foi 1,4 vezes maior no leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub>, comparado à amostra produzida com adição de CO<sub>2</sub>. O leite UHT produzido a

partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou maior ação de proteases microbianas. A lipólise foi maior no leite UHT produzido a partir de leite cru sem adição de CO<sub>2</sub>.

#### 4 EFEITO DO CO<sub>2</sub> NO PH E NO EQUILÍBRIO MINERAL DO LEITE PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

Alteração do pH do leite, especialmente por acidificação, constitui etapa fundamental para uma série de processos tecnológicos de fabricação, sendo que durante a diminuição de pH, mudanças podem ocorrer na composição e, portanto, na estrutura micelar (GASTALDI et al., 1996).

A acidificação por fermentação ou por adição de um ácido dissolve progressivamente o fosfato de cálcio coloidal e diminui a intensidade de ligações do cálcio com as caseínas. O grau de solubilização de fosfato de cálcio aumenta muito em pH abaixo de 5,6 e quase se completa em pH próximo de 5,2 (DALGLEISH e LAW, 1989; VAN HOOYDONK et al., 1986). Em pH 5,8, observou-se também que as micelas de caseína começaram a se agregar (GASTALDI et al., 1996). Autores relatam que o fosfato de cálcio coloidal é o primeiro componente a ser solubilizado, quando o pH abaixa. Lucey e Fox (1992) relataram inibição da coagulação por coalho quando 30% do fosfato de cálcio coloidal foi solubilizado como consequência das mudanças estruturais resultantes nas micelas.

O abaixamento do pH do leite também leva ao aumento na atividade do íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>), que desempenha papel muito importante na redução da repulsão entre caseínas carregadas negativamente e, consequentemente, aumenta a taxa de agregação durante a coagulação do leite. A acidificação seguida de neutralização melhorou as propriedades de coagulação pelo coalho, que foi atribuída a uma elevada atividade de Ca<sup>2+</sup> (LUCEY et al., 1996). O teor de fosfato de cálcio coloidal não é totalmente restaurado na micela, quando o leite acidificado é neutralizado e outros sais de fosfato de cálcio também são formados, proporcionando diferentes propriedades tamponantes (LUCEY et al., 1996).

Recentemente, atenção especial tem sido dada a esses leites conservados com CO<sub>2</sub> visando à sua utilização na fabricação de queijos. Entre as vantagens potenciais para a indústria de queijos, destacam-se as menores quantidades de uso de coalho necessárias para a realização da coagulação do leite em função da diminuição do tempo de coagulação. Na literatura não existe consenso sobre o efeito dessa tecnologia no rendimento de fabricação de queijos, apesar de não haver efeitos significativos, quando se utiliza leite

armazenado sob atmosfera de CO<sub>2</sub> para a fabricação de queijos (CALVO et al., 1993; DE LA FUENTE et al., 1998).

A adição de CO<sub>2</sub> no leite resultou em diminuição do pH, remoção do fosfato de cálcio coloidal e do cálcio ligado diretamente às caseínas (GEVAUDAN et al., 1996), aumentou os níveis de Ca<sup>2+</sup> (DE LA FUENTE et al., 1998), e resultou em ruptura da estrutura micelar (CHANG e ZHANG, 1992). Como relatado anteriormente, os aumentos nos níveis de Ca<sup>2+</sup> seriam benéficos para as propriedades de coagulação pelo coalho, embora a solubilização excessiva de fosfato de cálcio coloidal possa ter efeito no processo de fabricação do queijo. No leite despressurizado sob vácuo, os teores de P solúvel, Ca e Mg retornaram aos valores originais após a despressurização (GEVAUDAN et al., 1996). A restauração imediata do balanço salino original não ocorre quando o leite tratado com CO<sub>2</sub> é submetido à agitação suave à pressão atmosférica. Após 3h, nem os níveis desses elementos solúveis, nem a atividade de Ca<sup>2+</sup> foram restaurados, o que implicaria positivamente na aptidão do leite para a coagulação. (DE LA FUENTE et al., 1998).

Embora Green e Grandison (1993) tivessem sugerido que a agitação suave no tanque, que normalmente é feita nas primeiras fases do processo de fabricação de queijo, seria suficiente para eliminar a influência do CO<sub>2</sub>, esses efeitos foram ainda visíveis horas após a despressurização. De la Fuente et al. (1998) relataram que, quando a remoção de CO<sub>2</sub> foi realizada por agitação suave na pressão atmosférica, 3 horas após a abertura dos tanques, os valores do tempo de coagulação pelo coalho e da taxa de formação da coalhada não foram iguais aos obtidos para o leite cru. No entanto, a remoção forçada de CO<sub>2</sub> por um evaporador rotativo a vácuo promoveu a recuperação das propriedades coagulantes. Da mesma forma, a degaseificação forçada foi necessária para recuperar o rendimento do queijo, garantindo assim a reversibilidade do processo. Esses resultados podem ser atribuídos ao retorno lento da distribuição salina original.

Trabalhos têm relatado que as mudanças produzidas pela adição de CO<sub>2</sub> são devido às modificações de pH. No entanto, uma comparação da distribuição das micelas de caseínas em leites acidificados com HCl, adicionado de CO<sub>2</sub> e leites não tratados, indicaram que o nível de caseínas solúveis no leite acidificado foi o dobro do produto não tratado, mas apenas a metade do que o medido nos leites carbonatados (CHANG e ZHANG, 1992). Essa observação pode ser correlacionada à maior liberação de cálcio (e Ca<sup>2+</sup>) para a fase contínua do leite pela adição de CO<sub>2</sub>, em comparação com a acidificação por adição de HCl (DE

LA FUENTE et al., 1998). Esses resultados sugerem que as mudanças na distribuição micelar nos leites gaseificadas não decorreram somente das variações de pH, mas de outros mecanismos que devem estar envolvidos.

Quando o CO<sub>2</sub> é adicionado para acidificar o leite a pH abaixo de 6,0, mudanças mais drásticas e irreversíveis ocorrem. Após a depressurização, o pH retorna ao seu valor inicial, embora os níveis de sais solúveis de fosfato de cálcio coloidal inorgânico se assemelhem aos do leite cru, as curvas de capacidade tamponante foram diferentes das do leite original, mostrando que o CO<sub>2</sub> induziu a formação de um novo sistema salino. Gevaudan et al. (1996) sugeriram que a solubilização de sais destabilizou a estrutura micelar e, ao mesmo tempo, após o término da depressurização, as caseínas e outras formas de fosfato de cálcio induzidas pelo tratamento tornaram-se reassociadas. No entanto, essa nova associação não era a mesma da original. Além disso, Chang e Zhang (1992) observaram menor redistribuição das caseínas com permanente manutenção de caseínas que foram solubilizadas, em resposta ao tratamento com CO<sub>2</sub>, aos mesmos níveis observados nos leites carbonatados, quando o excesso foi removido de um leite gaseificado a pH 5,8.

## 5 UTILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> EM QUEIJOS E SEUS EFEITOS TECNOLÓGICOS

Diversos efeitos podem ser visivelmente observados na tecnologia e no produto final, quando se utiliza a pré-acidificação do leite para fabricação de queijos. Dentre eles, vários autores têm relatado efeitos tecnológicos como diminuição do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada, maior liberação de soro, redução da dose de coalho, melhor controle do processo e alterações no rendimento (LOSS e HOTCHKISS, 2003).

A adição de CO<sub>2</sub> por meios artificiais abaixa o pH do leite e resulta em diminuição do tempo de coagulação. Esse efeito pode ser usado para se obter o mesmo tempo de coagulação com menor quantidade de coalho. A injeção de CO<sub>2</sub> normalmente é feita na linha de alimentação do tanque de fabricação sendo que a taxa de injeção e o tempo de contato com o leite antes de misturar o coalho tem de ser calculados quando o sistema for instalado. Queijarias que utilizam o dióxido de carbono relatam que a quantidade de coalho pode ser reduzida pela metade sem efeitos adversos (PAULA et al., 2006).

O aumento do cálcio iônico, em leites de diferentes espécies (cabra, ovelha e vaca), devido à adição de CO<sub>2</sub> poderia explicar por que o leite submetido a tal tratamento é mais apropriado para

a coagulação. A remoção do CO<sub>2</sub> pela agitação do leite à pressão atmosférica resulta em maior concentração de cálcio iônico que no leite não carbonatado, melhorando, assim, a sua aptidão tecnológica para a fabricação de queijos (DE LA FUENTE et al., 1998).

Menor tempo total de fabricação foi observado por St-Gelais et al. (1997) para queijo Cheddar fabricado com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH 6,56. Nelson et al. (2004) também encontraram redução no tempo total de fabricação (15 min) e no tempo entre a adição de coagulante e a drenagem do soro (10 min) para queijo Cheddar pré-acidificado com CO<sub>2</sub> até pH de 5,93. Calvo et al. (1993) registraram redução no tempo de coagulação enzimática de 80% em queijos espanhóis fabricados com leite pasteurizado, o pH do leite foi abaixado de 6,65 para 6,0 com adição CO<sub>2</sub>. Montilla et al. (1995), ao fabricarem queijo ibérico, encontraram redução de 75% na dose de coalho necessária para a coagulação no leite com adição de CO<sub>2</sub>, seguindo-se redução da proteólise do queijo. Os queijos não apresentaram diferenças nas características sensoriais, e os autores concluíram que queijos fabricados com os leites adicionados de CO<sub>2</sub> não apresentam problemas no rendimento, além de desenvolverem menor proteólise.

Ruas-Madiedo et al. (1998), na fabricação do queijo espanhol Afuega'l Pitu, adicionaram CO<sub>2</sub> ao leite cru e armazenaram o leite por 4 dias em temperatura de refrigeração (4°C), antes da pasteurização. O tratamento com CO<sub>2</sub> reduziu a proteólise durante os primeiros estágios de fabricação do queijo e preveniu a diminuição do seu rendimento. A redução das proteases por conta da diminuição da multiplicação de bactérias psicotróficas durante o armazenamento do leite e a possível redução na atividade da plasmina em função do pH mais baixo do leite podem ser as possíveis causas da prevenção da perda de rendimento.

Ruas-Madiedo et al. (2002) obtiveram redução de 60% no tempo de coagulação na fabricação de queijo Manchego, um queijo espanhol de massa dura. O tratamento com CO<sub>2</sub> modificou os aspectos tecnológicos da produção: o tempo de coagulação foi reduzido, a dureza da coalhada aumentou, porém, não houve diferença no rendimento, quando comparado ao queijo controle.

Dias e Gigante (2009), avaliando a influência da adição de CO<sub>2</sub> no leite pasteurizado para fabricação de queijo Minas Frescal, em escala piloto, observaram menor tempo de coagulação. Neste trabalho, a redução de 0,6 unidades de pH (de aproximadamente 6,8 para 6,2 no leite acidificado por meio da adição de ácido láctico ou CO<sub>2</sub>) implicou na redução de 80 % do tempo de coagulação, o qual foi determinado empiricamente, quando a

coalhada atingiu o ponto de corte. Para a carbonatação do leite, o gás foi borbulhado por meio de mangueira perfurada, à pressão atmosférica, até obtenção do pH desejado.

Ao avaliar o efeito da acidificação do leite com CO<sub>2</sub> sobre a dosagem de coagulante empregado na fabricação de queijos, Silveria et al. (2009) observaram que, em decorrência da maior atividade da enzima, a redução do pH para 6,6, 6,4 e 6,2 implicou na redução da dosagem de coagulante em aproximadamente 33, 65 e 74%, respectivamente.

Outro estudo avaliou a influência da acidificação do leite com CO<sub>2</sub> na proteólise e maturação de queijo Cheddar. O dióxido de carbono (aproximadamente 1,6 g/L) foi adicionado ao leite refrigerado até obtenção de pH de 5,9 a 31°C. As condições de fabricação foram mantidas iguais, incluindo a dosagem de coagulante. O teor de cálcio do queijo tratado com CO<sub>2</sub> foi menor, mas nenhuma diferença no teor de umidade foi observada. O teor de CO<sub>2</sub> nos queijos tratados (0,337 g/L) foi maior em relação ao controle (0,124 g/L) e foi mantido ao longo de seis meses de maturação. Os índices de proteólise ao longo da maturação também foram mais altos nos queijos tratados. Esses altos índices em queijos feitos com leite pré-acidificado com CO<sub>2</sub> podem ser explicados pelo aumento da disponibilidade do substrato na fase aquosa, ou pelo aumento da atividade da quimosina ou ainda por sua maior retenção na massa, dada a redução do pH (NELSON, et al., 2004).

Chen e Hotchkiss (1991) avaliaram o efeito do uso de CO<sub>2</sub> dissolvido na multiplicação de bactérias psicrotólicas em queijo cottage. O queijo foi inoculado com 10<sup>3</sup> UFC/g de uma mistura de três gêneros de bactérias psicrotólicas Gram-negativas, envasado em potes de vidro impermeável e estocado a 4°C e a 7°C por 80 dias. O CO<sub>2</sub> foi adicionado por dissolução no *dressing*, antes da mistura com a coalhada. Não foi detectada a multiplicação de bactérias psicrotólicas Gram-negativas no queijo tratado com CO<sub>2</sub> durante os 70 dias de armazenamento a 4°C ou 30 dias a 7°C. A boa aparência e o frescor foram mantidos por 80 dias a 4°C e por 60 dias a 7°C. Durante os primeiros 10 dias de armazenamento a 7°C ou 17 dias a 4°C, o queijo não tratado apresentou contagem quatro vezes maior que o queijo tratado. Esses dados indicam que o uso de CO<sub>2</sub> dissolvido pode efetivamente inibir a multiplicação de bactérias Gram-negativas em queijo cottage com embalagem impermeável.

Paula (2010) avaliou a incorporação de CO<sub>2</sub> dissolvido no leite para a fabricação dos queijos Minas Frescal e Minas Padrão. Foram alcançados resultados muito interessantes que demonstraram, dentre outros fatores, que a incorporação de CO<sub>2</sub> não afetou o perfil fermentativo da cultura lática

no queijo Minas Padrão, bem como não alterou a composição, a preferência e a aceitabilidade sensorial dos queijos. Os queijos Minas produzidos com leite pré-acidificado com injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram reduções nos tempos fabricação para ambos os queijos. Também foi detectada menor porcentagem de perda de proteína no soro de ambos os queijos tratados com injeção de CO<sub>2</sub>, o que indica que modificações na tecnologia poderiam aumentar o rendimento da fabricação.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura relata as propriedades e os efeitos tecnológicos da utilização do CO<sub>2</sub> no leite e em produtos lácteos. Os estudos sobre o assunto, principalmente em relação ao uso de CO<sub>2</sub> em tecnologia de queijos, são ainda limitados. Um ponto importante é a necessidade de maiores estudos para avaliar os efeitos da utilização de CO<sub>2</sub> em queijos maturados e com risco de presença de bactérias anaeróbias causadoras do estufamento tardio.

Observa-se que a literatura ainda pode avançar, principalmente com relação à elucidação dos efeitos benéficos da utilização de CO<sub>2</sub>. Acredita-se, portanto, que a utilização do CO<sub>2</sub> possa contribuir para que as indústrias de laticínios melhorem a qualidade dos produtos e aumentem a sua produtividade e competitividade no mercado. Acreditamos também que a legislação sobre o assunto possa ter subsídios científicos para avançar e criar regulamentação específica para a utilização de CO<sub>2</sub> em laticínios, particularmente se houver interesse da indústria.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, pelo suporte financeiro concedido ao projeto.

## SUMMARY

The Brazilian Federal Inspection Service prohibits the CO<sub>2</sub> addition to milk to cheese-making and other dairy products. The justification against the addition of CO<sub>2</sub> is that the antimicrobiological effects reported in the current literature may generate negligence with regard to good manufacturing practices for milk and dairy products manufacturing. However, the main beneficial effects for various dairy products such as cheeses, are in terms of technological and economic aspects. These benefits generated by the use of CO<sub>2</sub> are sufficient to justify its applicability and encourage future research. As reported by dairies that worked with milk acidified by CO<sub>2</sub> injection to the cheese-making, only the savings with the reduction of coagulant



use would be sufficient to ensure the return of investment in the injection system in just two and a half months. Therefore, it is believed, however, that the legislation on the CO<sub>2</sub> use can progress, particularly if there is interest by the dairy industry. The technological effects in milk caused by the use of CO<sub>2</sub> suggest the need for modification of the manufacturing process of some products to improve the benefits. Successful modifications are required to provide stimulation for the dairy industry to make the decision regarding to the use of this technology. This paper presents a review of the properties and effects of using CO<sub>2</sub> in milk and dairy products attempting to understand and increase the contribution of scientific knowledge about this technology by researchers and dairy companies in the Brazilian.

**Index terms:** Carbonation; Processing of Dairy Products; Technology.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALVO, M. M.; MONTILLA, M. M.; OLANO, A. Rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 12, p. 1073-1076. 1993.
- CHANG, M. K., ZHANG, H. Carbonated Milk: Proteins. **Journal of Food Science**. v. 57, p. 880-882. 1992.
- CHEN, J. H., HOTCHKISS J. H. Effect of dissolved carbon dioxide organisms in cottage cheese on the growth of psychrotrophic. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 2941-2945. 1991.
- CHIO, H. S., KOSIKOWSKI, F. V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p. 6613-6619, 1984.
- CHURCH, I. J., PARSONS, A. L. Modified atmosphere packaging technology: A review. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 67, p. 143-152. 1995.
- CRUZ, R. S. **Efeito da utilização de CO<sub>2</sub> no processamento de macarrão tipo massa fresca**. Viçosa. MG. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- DALGLEISH, D. G. e LAW, A. J. R. pH-Induced Dissociation of Bovine Casein Micelles. II Mineral Solubilization and its Relation to Casein Release. **Journal of Dairy Research**. 56, p. 727-735. 1989.
- DANIELS, J. A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S. S. H. A review of carbon dioxide effects on microbial growth and food quality. **Journal of food Protection**, v. 48, n. 6, p. 532-537. 1985.
- DE LA FUENTE, M.A., OLANO, A., REQUENA, T. e JUÁREZ, M. Salt Balance and Rennet Clotting Properties of Cow's, Ewe's and Goat' Milks Preserved with Carbon Dioxide. **Journal of Food Protection**. 61, p. 66-72. 1998.
- DIAS, B. M., GIGANTE, M. L. Efeito da pré-acidificação do leite através da adição de CO<sub>2</sub> sobre o rendimento e as características físico-químicas do queijo Minas Frescal. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 26., 2009, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2009. 1 CD-ROM.
- DIXON, N. M., KELL, D. B. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 109-136, 1989.
- ERKMEN, O. Effect of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 65, p. 131-135. 2001.
- FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 1, p. 58-70, 1991.
- GASTALDI, E., LAGAÚDE, A. e TARODO DE LA FUENTE, B. Micellar Transition State in Casein Between pH 5.5 and 5.0. **Journal of Food Science**. v. 61, p. 59-64. 1996.
- GENIGEORGIS, C. Microbial and safety implications of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 237-251, 1985.
- GEVAUDAN, S., LAGAÚDE, A., FUENTE, T., CUQ, L. Effect of treatment by gaseous carbon dioxide in the colloidal phase of skim milk. **Journal of Dairy Science**. 79: 1713-1721. 1996.
- GILL, C. O., TAN, K. H. Effect of carbon dioxide on growth of spoilage bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. v. 39, n. 2, p. 317-319, 1980.
- GREEN, M. L. e GRANDISON, A. S. Secondary (Non-enzymatic) Phase of Rennet Coagulation and Post-coagulation Phenomena. **Cheese:**

**Chemistry, Physics and Microbiology.** Vol. 1: General Aspect (Fox, P.F., ed.), p. 101-140, Chapman & Hall, London, UK. 1993.

GUEIMONDE, M., L, DELGADO, T., BADA-GANCEDO, J. C., REYES-GAVILÁN. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO<sub>2</sub>-treated milk. **Food Research International.** v. p. 36, 43-48. 2003.

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

HOTCHKISS, J. H., CHEN, J. H., LAWLESS, T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensorial changes in pasteurized milk. **Journal of Dairy Science.** v. 82, p. 690-695. 1998.

KING, J. S., MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research.** v. 49, p. 439-447. 1982.

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

LUCEY, J. A., FOX, P. F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: a review. **Journal of Dairy Science.** v. 76. p. 1714-1724. 1992.

LUCEY, J. A. et al. Effect of Acidification and Neutralization of Milk on Some Physico-chemical Properties of Casein Micelles. **International Dairy Journal.** v. 6, p. 257-272. 1996.

MA, Y., BARBANO et al. Impact of CO<sub>2</sub> Addition to Milk on Selected Analytical Testing Methods. **Journal of Dairy Science.** v. 84, p. 1959-1968. 2001.

MA, Y., BARBANO, D. M., SANTOS, M. Effect of CO<sub>2</sub> Addition to Raw milk on proteolysis and Lipolysis at 4 °C. **Journal of Dairy Science.** v. 86, p. 1616-1631. 2003.

MARTIN, J. D., WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Effects of Carbon Dioxide on Bacterial Growth Parameters in Milk as Measured by Conductivity. **Journal of Dairy Science.** v. 86, p. 1932-1940. 2003.

MONTILLA, A., CALVO, M. M., OLANO, A. Manufacture of cheese made from CO<sub>2</sub>-treated milk. **Z. Lebensm Unters Forsch.** v. 200, p. 289-292. 1995.

NELSON, B. K., LYNCH, J. M., BARBANO, D. M. Impact of Milk Preacidification with CO<sub>2</sub> on the Aging and Proteolysis of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science.** v. 87, p. 3590-3600. 2004.

NORIEGA, L. et al. Inhibition of *bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiology.** 20, 519-526. 2003.

PAULA, J. C. J et al. Aplicação de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) na Indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** Juiz de Fora, v. 61, n. 352, p. 3-9, 2006.

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

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite.** 2005. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PHILLIPS, C. A. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food and Technology.** v. 31, p. 463-479. 1996.

RAJAGOPAL, M., WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO<sub>2</sub> storage of raw milk: microbiological effects. **Journal of Dairy Science.** v. 88, p. 3130-3138. 2005.

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

ROWE, M.T. Effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *pseudomonas fluorescens* B52. **International Journal of Food Microbiology.** v. 6, p. 51-56. 1988.

RUAS-MADIEDO, P. et al. Afuega'l Pitu cheese quality: carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. **International Dairy Journal.** n. 8, p. 951-958. 1998.

- RUAS-MADIEDO, P. et al. Manufacture of Spanish hard cheeses from CO<sub>2</sub>-treated milk. **Food Research International**, v. 35, p. 681-690. 2002.
- SARANTÓPAULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens com atmosfera modificada**. 2. ed. Campinas: CETEA, ITAL. 114p. 1998.
- SILVERIA, A. C., DIAS, M. E. F., GIGANTE, M. L. Efeito da pré-acidificação do leite com CO<sub>2</sub> sobre a dosagem de coagulante empregado na fabricação de queijos. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 26, 2009, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2009. 1 CD-ROM.
- ST-GELAIS, D., CHAMPAGNE, C. P., BÉLANGER, G. Production of Cheddar cheese using milk acidified with carbon dioxide. **Milchwissenschaft**. v. 52, n. 11, p. 614-618. 1997.
- VAN HOOYDONK, A. C. M., HAGEDOORN, H. G. and BOERRIGTER, I. J. pH Induced Physicochemical changes of Casein. Micelles in Milk and their Effect on Renneting. 1. Effect of Acidification on physico-chemical properties. **Netherlands milk and dairy journal**. v. 40, p. 281-296. 1986.
- VIANNA, P. C. B. Adição de dióxido de carbono ao leite cru: efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- VINDEROLA, C. G., GUEIMONDE, M., DELGADO, T., REINHEIMER, J. A., REYES-GAVILÁN, C. G. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v. 10, p. 213-220. 2000.
- WERNER, B. G., HOTCHKISS, J. H. Effect of carbon dioxide on the growth of *Bacillus cereus* spores in milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 15-18. 2002.