UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

AMANDA SILVA DO CARMO

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E ADIÇÃO DE CULTURA PROBIÓTICA NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TIPO *BRIE*

JOÃO PESSOA– PB

2020

AMANDA SILVA DO CARMO

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E ADIÇÃO DE CULTURA PROBIÓTICA NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TIPO *BRIE*

JOÃO PESSOA - PB

2020

AMANDA SILVA DO CARMO

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E ADIÇÃO DE CULTURA PROBIÓTICA NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TIPO *BRIE*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profª. Drª. Sharline Florentino de Melo Santos

Coorientadora: Profª. Drª. Taliana Kênia Alencar Bezerra

JOÃO PESSOA - PB

2020

C287e Carmo, Amanda Silva do.
Efeito do tratamento térmico e adição de cultura probiótica nas características sensoriais do queijo tipo brie / Amanda Silva do Carmo. - João Pessoa, 2020.
69 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Coorientação: Taliana Kênia Alencar Bezerra.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Queijo tipo brie - Produção. 2. Pasteurização do leite. 3. Lactobacillus acidophilus. I. Santos, Sharline Florentino de Melo. II. Bezerra, Taliana Kênia Alencar. III. Título.

UFPB/BC CDU 637.353.7(043)

AMANDA SILVA DO CARMO

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E ADIÇÃO DE CULTURA PROBIÓTICA NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TIPO *BRIE*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 14 de agosto de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Sharline Florentino de Melo Santos - PPGEQ/CT/UFPB
Orientadora

Profª. Drª. Taliana Kênia Alencar Bezerra - PPGCTA/CT/UFPB
Coorientadora

Profª. Drª. Julice Dutra Lopes - PPGEQ/CT/UFPB
Examinadora Interna

Profª. Drª. Janeeyre Ferreira Maciel - DEA/CT/UFPB
Examinadora externa

Dedico este trabalho a Deus, que permitiu que tudo pudesse ser realizado. A minha família, que foi apoio de diversas maneiras nessa etapa tão importante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os dias ter demonstrado seu amor e misericórdia. Sem dúvidas, anunciar tua beleza em meio ao caos de acontecimentos é o que tem dado sentido a vida. É tudo sobre você e para você!

A minha mãe Maria Monteiro, meu padrasto João Monteiro e minha irmã Ana Cecília Monteiro, pelo apoio incondicional desde questões financeiras a emocionais. Toda a assistência e incentivo durante o processo, desde me buscar tarde da noite na universidade a acordar muito cedo para carregar queijos nos finais de semana. O fato de sempre acreditarem no meu potencial foi o que me motivou a ir contra todas as adversidades. A vocês todo o meu amor.

Aos meus amigos Joellington, Matheus, Carolina, Thálita, Maeli e Mayara, pelo companheirismo, apoio, descontração, passeios e socorro nas horas de caos total. A simplicidade no modo de ver a vida e o bom humor personifica o que vocês representam. Vocês são prova do cuidado de Deus por mim.

A minha amiga Amanda da Silva Gomes (*in memoriam*), o acréscimo da nossa amizade terá resultados eternos, por que o que Senhor plantou aqui não é passageiro. Você acompanhou o início dessa jornada e acreditava na minha capacidade de concluir esse e muitos outros objetivos na vida, estarás sempre viva em meu coração.

A profª Sharline Florentino pela gigante oportunidade, orientação, paciência e compreensão. Por todo investimento financeiro no meu trabalho e em mim, obrigada por ter sido canal de bençãos em minha vida. A ti, minha eterna gratidão. Sua tranquilidade, apoio, incentivo e considerações foram essenciais!

A profª Taliana Bezerra pela orientação e conselhos acadêmicos. Seus adendos e confiança sempre me ajudaram a tomar decisões importantes.

As profªs Ana Flávia Coelho, Helenice Holanda e Marta Madruga pelo apoio e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa de microbiologia composto pela profª Janeeyre Ferreira e técnicos Genilson, Claudionor e Gilvandro. A paciência, compromisso com meu trabalho, o apoio na realização das análises, concessão de materiais, ensinamentos e a companhia diária foram indispensáveis durante a parte experimental.

A minha capacidade de arriscar, acreditar, recomeçar e evoluir.

MUITO OBRIGADA!

“L’âge ne compte pas, sauf si vous ête un fromage”.

(A idade não conta, a não ser que você seja um queijo).

Billie Burke

RESUMO

Queijos considerados como especiais tem apresentado potencial crescimento no país em produção e consumo, a exemplo do queijo tipo *brie*. As características desse produto são dadas pelo crescimento externo do mofo branco *Penicillium candidum* que matura o queijo de fora para dentro através de um complexo fenômeno bioquímico. Visando a obtenção de um produto com características tecnológicas e funcionais, o presente estudo objetivou elaborar queijo tipo *brie* com adição de cultura inicial *Lactococcus lactis*, cultura secundária *Penicillium candidum* e cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* usando o leite bovino cru e o leite bovino pasteurizado com maturação de trinta dias a 10 ^{o}C. Foram realizadas caracterizações físico-químicas, microbiológicas, análise dos aspectos visuais e perfil eletroforético. Observou-se que amostras com tratamento térmico apresentaram transformações bioquímicas diferentes do leite *in natura*, refletindo na textura, umidade e perfil protéico dos produtos. Na caracterização físico-química observou-se que os queijos apresentaram valores de umidade muito abaixo em relação ao que preconiza a legislação para este tipo de queijo, apresentando valores de 24,37 g/100 g a 35,47 g/100 g, no decorrer da maturação foi acompanhada a perda de umidade sofrida através de pesagens em diferentes dias, onde foi detectado uma perda mais significativa entre os dias 10 e 18. A mobilidade eletroforética relativa, posição das bandas protéicas, e seus respectivos pesos moleculares em maior abundância nos queijos foram identificadas como: α S_1-caseína (23,61 kDa), α S_2-caseína (25,23 kDa), β-caseína (23,98 kDa), κ-caseína (19,02 kDa) e α- lactoalbumina (14,2 kDa). Amostras de queijos com a adição de cloreto de cálcio apresentaram bandas protéicas mais unidas e intensas. Ao comparar amostras com a adição da solução pode-se afirmar que a adição do cloreto de cálcio exerce boa influência no rendimento e perfil protéico dos queijos. A adição do *L. acidophilus* também exerceu influência positiva no perfil protéico e rendimento dos produtos obtidos. Todos os ensaios de queijo tipo *brie* apresentaram viabilidade do microrganismo probiótico *L. acidophilus* após maturação, os lactobacilos estavam presentes nas amostras de queijos em números elevados, na ordem de 10^7 UFC/g. As demais culturas também apresentaram boa viabilidade e em todos os queijos obtidos o microrganismo *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se como boa opção de estratégia tecnológica para melhorar significativamente a qualidade dos queijos tipo *brie*.

Palavras-chave: queijos com mofo branco; *Lactobacillus acidophilus*; influência da pasteurização.

ABSTRACT

Cheeses considered to be special have shown potential growth in the country in terms of production and consumption, such as brie cheese. The characteristics of this product are given by the external growth of the white mold Penicillium candidum which matures the cheese from the outside through a complex biochemical phenomenon. Aiming to obtain a product with technological and functional characteristics, the present study aimed to prepare brie cheese with the addition of initial culture *Lactococcus lactis*, secondary culture *Penicillium candidum* and probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* using raw bovine milk and pasteurized bovine milk with maturation of thirty days at 10 ^{o}C. Physical-chemical, microbiological characterizations, analysis of visual aspects and electrophoretic profile were performed. It was observed that samples with heat treatment showed biochemical transformations different from fresh milk, reflecting on the texture, moisture and protein profile of the products. In the physical-chemical characterization it was observed that the cheeses presented humidity values much lower than what is recommended by the legislation for this type of cheese, presenting values of 24.37g /100g to 35.47 g/ 100 g, during maturation was accompanied by the loss of moisture suffered by weighing on different days, where a more significant loss was detected between days 10 and 18. The relative electrophoretic mobility, position of the protein bands, and their respective molecular weights in greater abundance in the cheeses were identified as: α S1-casein (23.61 kDa), α S2-casein (25.23 kDa), β-casein (23.98 kDa), κ-casein (19.02 kDa) and α-lactalbumin (14.2 kDa). Cheese samples with the addition of calcium chloride showed more united and intense protein bands. When comparing samples with the addition of the solution, it can be said that the addition of calcium chloride has a good influence on the yield and protein profile of the cheeses. The addition of *L. acidophilus* also had a positive influence on the protein profile and yield of the products obtained. All tests of brie type cheese showed viability of the probiotic microorganism *L. acidophilu*s after maturation, the lactobacilli were present in the cheese samples in high numbers, in the order of 10^7 UFC/g. The other cultures also showed good viability and in all cheeses obtained the microorganism *Lactobacillus acidophilus* proved to be a good option for a technological strategy to significantly improve the quality of brie cheeses.

Keywords: cheeses with white mold; *Lactobacillus acidophilus*; pasteurization of influence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
1.1 OBJETIVO GERAL 12
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 12
2 REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1 QUEIJO *BRIE*. 14
2.2 COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO TIPO *BRIE* 16
2.3 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO BRIE 18
2.4 MATURAÇÃO DO QUEIJO 20
2.5 PROBIÓTICOS - *Lactobacillus acidophilus* 21
2.6 TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO 23
3 METODOLOGIA 26
3.1 MATERIAL 26
3.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE 26
3.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS 27
3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CULTURAS STARTERS E DO PROBIÓTICO 28
3.4.1 Contagem seletiva de *Lactococcus lactis* 28
3.4.2 Contagem presuntiva de *Lactobacillus acidophilus* 28
3.4.3 Contagem de *Penicillium candidum* 29
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE 29
3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA 30
3.7 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO *BRIE* 31
3.8 RENDIMENTO. 33
3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUEIJOS 34
3.10 PERFIL ELETROFORÉTICO 35

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE 36
4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS TIPO *BRIE* 37
4.3 VIABILIDADE DAS CULTURAS STARTERS 39
4.3.1 Contagem seletiva de *Lactococcus lactis* 39
4.3.2 Contagem presuntiva de *Lactobacillus acidophilus* 40
4.3.3 Contagem do *Penicillium candidum* 41
4.3.4 Morfologia 42
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE 43
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUEIJOS TIPO *BRIE* 45
4.6 ASPECTOS VISUAIS DOS QUEIJOS 48
4.7 PERDA DE PESO DURANTE A MATURAÇÃO DOS QUEIJOS 51
4.8 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO 53
4.9 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO 55
5 CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS 58

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo os dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (Abiq), em 2019 o país produziu 1,2 milhões de toneladas de queijo, ficando entre os cinco maiores produtores do mundo. O estado de Minas Gerais é o maior produtor do país, com cerca de 25% da produção nacional. O consumo brasileiro é de cerca de 5,5 kg de queijo por habitante no ano, valor ainda considerado baixo quando comparado a países como Grécia (20 kg) e Argentina (11 kg), no entanto, a produção e consumo de queijos finos e artesanais tem aumentado no país ilustrando a importância social e econômica dos queijos (SOARES e RODRIGUES, 2019).

O queijo tipo *brie* é um produto com boa aceitação e sua produção no Brasil ocorre com o mesmo protocolo utilizado para o queijo tipo *Camembert*, sendo diferenciado apenas por seu tamanho. Este queijo caracteriza-se por sua massa macia e quebradiça e é maturado por bactérias láticas e pelo fungo *Penicillum candidum*, fungo que confere sabor característico ao queijo, além de formar uma casca branca aveludada ao redor do mesmo. A estimativa é que esta classe de queijo represente cerca de 3% da produção mundial de queijos (PEREIRA, 2014; SPINNLER, 2017; PEREIRA et al., 2020).

A qualidade de um produto está associada a qualidade das matérias primas empregadas no seu desenvolvimento. Do mesmo modo, para que a qualidade do queijo em relação aos aspectos físico químicos e microbiológicos seja garantida é necessário assegurar que o leite empregado no processamento esteja dentro aos padrões necessários para tal aplicação. Assim, o tratamento térmico a que é submetido o leite destinado a fabricação de queijos é essencial na qualidade final do produto, já que pode promover mudanças nos seus vários constituintes, principalmente nas diferentes frações protéicas. Para minimizar estas mudanças, tem-se selecionado cepas que façam parte da microbiota presente no leite cru, de modo a obter culturas iniciadoras e adjuntas especificamente preparadas para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos (SILVEIRA e ABREU, 2003; BRUNO e CARVALHO, 2009; MENEGON, 2019).

Segundo Albenzio et al.,(2001), no queijo obtido com leite cru observa-se uma microbiota natural com atividade metabólica que possibilita o desenvolvimento de um perfil sensorial distinto. As diferenças observadas vão desde as características sensoriais e bioquímicas, além de pH superior em queijos obtidos com leite cru. O processo produtivo de queijos maturados tende a favorecer o desenvolvimento da microbiota lática presente naturalmente no leite, que por sua vez atua inibindo o crescimento de espécies nocivas por meio da produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos inibitórios. Deste modo, após

determinada etapa do processo de maturação, os queijos tornam-se seguros ao consumo, sendo estes tipos de queijos cada vez mais procurados e consumidos pela população (PEREIRA, 2014; PEHRSON, 2017).

Diversos autores descrevem os probióticos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira é um desafio tecnológico. Culturas probióticas têm sido incorporadas com sucesso em diferentes tipos de queijos, pois representam um forte nicho entre os alimentos funcionais além de ser uma alternativa para as indústrias de laticínios diversificarem seus produtos em um mercado consumidor cada vez mais competitivo (STANTON, 2001; KOURKOUTAS et al., 2005; HILL et al., 2014; GOVENDER et al., 2014; DANTAS et al., 2016).

Os probióticos encontrados com maior frequência em produtos lácteos são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Apresentam semelhanças fisiológicas e metabólicas, produzindo ácidos lácticos como principal produto da fermentação de carboidratos. Essas culturas são isoladas das porções do trato gastrointestinal do ser humano saudável e apresentam boas propriedades tecnológicas e boa multiplicação no leite, além de promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Deste modo, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (BURITI, 2007; SOCCOL et al., 2010; BUTEL, 2014, DINEV et al., 2017).

O probiótico *Lactobacillus acidophilus* é estável em condições ácidas e resistente aos sais biliares, sendo capaz de aderir à mucosa intestinal e produzir substâncias como bacteriocinas, compostos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que dificultam a ação de microrganismos patogênicos no organismo, fatores que contribuem para que esse microrganismo seja amplamente empregado como probiótico nos produtos lácteos, sendo frequente estudado em queijos e iogurtes (BUTEL, 2014; PEROTTI, 2014; GEBARA, 2015; OLIVEIRA e GONZÁLEZ-MOLERO, 2016; DINEV et al., 2017; BEVILAQUA et al., 2020).

Diante do exposto, esse trabalho tem como objetos:

1.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver queijos tipo *brie* com leite cru e pasteurizado adicionados de cultura probiótica, constituída de *Lactobacillus acidophilus*, bem como avaliar o efeito do tratamento térmico e da adição da cultura probiótica nas características físicas, químicas e microbiológicas após trinta dias de maturação.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o leite bovino cru e pasteurizado utilizado;
- Desenvolver diferentes formulações de queijos tipo *brie* com leite bovino pasteurizado e cru para testar os efeitos do tratamento térmico do leite e da adição de *L. acidophilus*;
- Caracterizar os queijos obtidos após a maturação quanto aos parâmetros físico químicos e microbiológicos;
- Avaliar o desempenho de diferentes meios de cultura para melhor quantificação das culturas do *Lactococcus lactis* e *Penicillium candidum*;
- Analisar a viabilidade das culturas utilizadas após a maturação;
- Comparar os resultados dos queijos obtidos com leite pasteurizado e leite cru com a legislação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJO *BRIE*

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, queijo pode ser definido como um produto fresco ou maturado, obtido através da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados por ação física do coalho, de enzimas específicas ou bactérias, todos de qualidade e com aptidão ao uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias, especiarias ou condimentos, aditivos, substâncias aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996).

O queijo é um alimento altamente nutritivo, uma vez que contém grande parte da proteína do leite, geralmente a maior parte da gordura, minerais, principalmente cálcio e fósforo, e vitaminas essenciais. As diferenças entre os processos de fabricação influenciam significativamente em sua composição e no seu valor energético. Nos últimos anos o consumo do queijo aumentou, devido ao reconhecido valor nutricional e a diversificação deste produto no país, contribuindo com a aquisição do queijo por todas as classes sociais, a estimativa é de que o consumo de queijos no Brasil deverá crescer 1,9% em 2020, em relação a 2019 (RENNER, 1987; ABIQ, 2011; COSTA, 2012; USDA, 2020).

Estudos de Engelmann e Holler (2008), relatam que as características de cada queijo são determinadas pelo tipo de leite utilizado, seja cru ou pasteurizado, desnatado ou integral, o tipo de acidificação escolhida, tamanho e forma do queijo, tipo de salga, maturação, se houver acréscimo de bactérias ou cultivos de mofo e de que tipo são.

A elaboração do queijo *brie* é feita com leite cru de vacas leiteiras da região de *Brie* e possui duas variedades, ambas com denominação de origem. São elas: *brie de Meaux e brie de Melun.* O *brie de Meaux* possui textura macia e firme, não derrete e tem aroma e sabor que remetem a cogumelos. Períodos mais longos de maturação conferem sabor mais forte e picante ao queijo. Enquanto o *brie de Melun* possui sabor mais acentuado e salgado. Quando maturado, sua textura derrete e apresenta aroma penetrante e sabor forte (AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2012).

É considerado um queijo semi gordo (até 27% de gordura), rico em triglicérides e proteínas, elaborado em formato cilíndrico com altura média de 3 cm, encoberto por uma fina camada de mofo branco, com peso máximo de 2 quilos por forma (PEREIRA, 2014).

A produção nacional de queijos com mofo branco (tipo *brie*, *camembert*) e azul, iniciou-se com os imigrantes dinamarqueses entre as décadas de 1910 a 1930, ao sul de Minas Gerais, na Região Alto Rio Grande e Minduri, segundo familiares e produtores de laticínios

da região (RODRIGUES, 2019). De acordo com a Revista Balde Branco (2019), uma das revistas do setor leiteiro mais antigas do país, os queijos finos como o *Brie*, *Camembert*, Gorgonzola, Gouda, Edam, entre outros, ocupam os 6,5% da produção brasileira de queijos.

Segundo o *Codex Alimentarius* (CXS 277-1973), o queijo *Brie* é um queijo curado de superfície macia, e branca em conformidade com o padrão geral para queijo (CXS 283-1978). Possui forma de um cilindro achatado e seu corpo apresenta coloração que varia de quase branca a amarelo claro, sua textura é macia (quando pressionada com os polegares), porém não é quebradiça. Sua maturação vai da superfície até o centro do queijo. Furos de gás geralmente são ausentes, mas poucas aberturas e rachaduras são aceitáveis. O queijo deve apresentar crosta macia, coberta inteiramente por mofo branco, podendo ter tons avermelhados, marrom ou laranja.

Ainda conforme o *Codex Alimentarius* (CXS 277-1973), o queijo inteiro pode ser cortado ou transformado em setores antes ou após o desenvolvimento do molde. A partir de 10 dias, a 10 – 16 ºC, observa-se o desenvolvimento do sabor e corpo do queijo. Sua altura máxima é de 5 cm e seu peso varia de 500 a 2000 g, a formação e maturação da casca (proteólise) ocorre da superfície para o centro e é causada pela adição do fungo *Penicillium candidum* ou *Penicillium camembert*.

Apesar de não dispor de uma legislação específica para sua fabricação, o queijo tipo *brie* no Brasil, deve seguir as exigências dispostas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, que classifica os queijos quanto ao tipo de coagulação, tratamento térmico, conteúdo de umidade, gordura e maturação (BRASIL, 1996).

A Portaria nº 146/96 veio complementar o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, considerando as Resoluções Mercosul/ GMC números 69/93, 70/93, 71/93, 72/93, 82/93, 16/94, 43/94, 63/94, 76/94, 78/94,79/94 que aprovam os Regulamentos Técnicos de Identidades e Qualidades de Produtos Lácteos, bem como a necessidade de padronização dos Métodos de Elaboração dos Produtos de Origem Animal no que se refere aos requerimentos técnicos de identidade e qualidades de produtos lácteos.

O item 3.2 da Portaria nº 146/96 traz a classificação dos queijos, baseada em suas variedades:

> A seguinte classificação se aplicará a todos os queijos e não impede o estabelecimento de denominação e requisitos mais específicos, característicos de cada variedade de queijo que aparecerá, nos padrões individuais. 2.2.1. De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em

> percentagem, os queijos classificam se em: − Extra Gordo ou Duplo Creme: quando contenham o mínimo de 60% − Gordos: quando contenham entre 45,0 e 59,9% − Semigordo: quando contenham entre 25,0 e 44,9% − Magros: quando contenham entre 10,0 e 24,9% − Desnatados: quando contenham menos de 10,0% 2.2.2. De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classificam se em: − Queijo de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa dura): umidade de até 35,9%. − Queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa semidura): umidade entre 36,0 e 45,9%. − Queijos de alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou "macios"): umidade entre 46,0 e 54,9%. − Queijos de muita alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou "mole"): umidade não inferior a 55,0%. 2.2.2.1. Quando submetidos ou não a tratamento térmico logo após a fermentação, os queijos de muita alta umidade se classificarão em: − Queijos de muita alta umidade tratados termicamente. − Queijos de muita alta umidade.

Já o item de nº 4 da Portaria descreve as determinações acerca da composição e requisitos da fabricação dos queijos:

> 1. Composição. 4.1.1. Ingredientes Obrigatórios. 4.1.1.1. Leite e/ou Leite Reconstituído (integral), semidesnatado, desnatado e/ou soro lácteo. Entende se por leite o proveniente das espécies bovinas, caprina, ovina ou bubalina. Quando não existe uma referência específica, entende se como leite da espécie bovina. 4.1.1.2. Coagulante apropriado (de natureza física e/ou química e/ou bacteriana e/ou enzimática). 4.1.2. Ingredientes Opcionais. Cultivos de bactérias lácteas ou outros microrganismos específicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, caseína, caseinatos, sólidos de origem láctea, condimentos ou outros ingredientes opcionais permitidos somente conforme o previsto, explicitamente, nos padrões individuais definidos para variedade de queijo. 4.2. Requisitos. 4.2.1. Os queijos deverão obedecer aos requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade, estabelecidos no padrão individual correspondente. 4.2.2. Acondicionamento: poderão ser acondicionados ou não, e, dependendo da variedade de queijo de que se trata, apresentarão envases ou envoltórios bromatologicamente aptos recobrindo a sua casca, aderindo ou não à mesma.

2.2 COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO TIPO *BRIE*

Certos microrganismos presentes em alguns alimentos causam alterações benéficas, modificando características originais de determinados produtos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). As culturas láticas repõem as bactérias perdidas durante a pasteurização do leite, convertem a lactose em ácido lático, garantindo um pH adequado para a coagulação através

da renina do coalho. Influenciam no conteúdo de umidade do queijo, bem como suas características sensoriais e de textura durante a maturação (CARDARELLI, 2006).

De modo geral, as bactérias láticas se dividem em mesofílicas e termofílicas, apresentando temperaturas ótimas de 30-33 ºC e 40-45 ºC, respectivamente. As principais espécies do grupo dos mesofílicos são *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc sp*. e dos termofílicos os *Streptococcus thermophilus* (GUIMARÃES, 2011). Elas compõem a microbiota normal que se desenvolve após o processamento de alguns alimentos e possuem atividades metabólicas que contribuem com características sensoriais desejáveis nos produtos, inibindo ou retardando a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Geralmente, agem por exclusão competitiva e síntese de substâncias antagonistas como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (DUARTE et al., 2013).

Lactococcus lactis é um organismo importante das bactérias ácido lácticas que secretam o ácido láctico como um dos principais produtos fermentativos do metabolismo dos carboidratos, contribuindo para prolongar a vida útil e reduzir o conteúdo de lactose. A propriedade conservante de *L. lactis* também é atribuída a seus metabólitos antimicrobianos que incluem etanol, peróxido de hidrogênio, diacetil e ácidos orgânicos, como ácido lático, acético e propiônico. Não apenas esses antimicrobianos evitam a deterioração por inibição de microrganismos patogênicos, mas também aprimoram sabor, aroma, aparência, cor e textura distintos (KHEMARIYA et al., 2017).

Os ácidos orgânicos criam um ambiente ácido que leva à redução do pH intracelular e à dissipação do potencial da membrana, desfavorável ao crescimento de muitos microrganismos patogênicos e deteriorantes. O ácido orgânico interfere no funcionamento normal das reações metabólicas, isso ocorre devido a moléculas dissociadas através da membrana celular (SUSKOVIC et al., 2010). Os ácidos geralmente exibem sua ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como leveduras e fungos, interferindo na potencialidade da membrana celular, inibindo o transporte ativo e as funções metabólicas e reduzindo o pH intracelular (KHEMARIYA et al., 2017).

O gênero *Lactobacillus acidophilus* é constituído da microbiota natural do trato gastrointestinal e genital de animais e do homem. *L. acidophilus* é um bastonete não flagelado, gram positivo, intolerante ao sal, não formador de esporos, que produz ácido lático e pequena quantidade de acetaldeído, como produtos do metabolismo da lactose. Sua multiplicação pode ocorrer em temperatura de até 45 ºC, mas a temperatura ótima está entre 35 e 40 ºC. O pH ótimo para multiplicação está entre 5,5 e 6,0 (CARDARELLI, 2006).

Diversos pesquisadores relatam que cepas de *L. acidophilus* possuem atividade antimicrobiana sobre várias bactérias patogênicas, inclusive *E. coli* e *S. aureus*. Além de apresentar boa viabilidade no intestino, essa cultura probiótica possui propriedades tecnológicas que o potencializa como um dos microrganismos probióticos mais utilizado na tecnologia de queijos e diversos produtos lácteos (SAARELA et al., 2000).

No queijo tipo *brie*, o desenvolvimento do mofo branco na superfície promove aparência característica com atividades bioquímicas que produzem "flavor" e aroma (LECLERCQ-PERLAT, 2004). O gênero *Penicillium candidum*, apresenta colônias brancas e constitui-se como ideal para a obtenção deste tipo de queijo (JUDACEWSKI, 2015). A cultura fúngica desenvolve na superfície do queijo, um micélio branco após o sétimo dia de maturação, o qual metaboliza o lactato, desacidificando a superfície e produzindo amônia (NH_3) (BERESFORD et al., 2001).

O crescimento fúngico necessita de controle e é essencial para a produção de aromas pela biomassa, do mesmo modo que seu desenvolvimento é capaz de evitar contaminação (LE DRÉAN et al., 2010).

Para classificação dos fungos utilizam-se técnicas microscópicas que permitem observar claramente sua estrutura. Verifica-se a composição da amostra, através da preparação de lâminas, que devem ser observadas através de todo campo, de forma que suas estruturas sejam captadas e avaliadas (JUDACEWSKI, 2015).

2.3 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO *BRIE*

O processamento nacional de queijos tipo *brie* apresenta similaridade ao processamento do queijo tipo *camembert*, tendo diferença no diâmetro de cada um. O queijo tipo *brie* nacional, possui em média 20 cm de diâmetro, matura num único corpo e é fracionado após completar o ciclo de maturação (PEREIRA, 2014).

Para a obtenção de um queijo de boa qualidade, todas as etapas do processamento devem ser controladas. O controle se inicia com a recepção da matéria-prima, que deve ser de boa procedência e apresentar propriedades microbiológicas, físico-químicas e sensoriais satisfatórias (RIBEIRO, 2012).

O queijo pode ser obtido com leite cru ou com leite pasteurizado. O tratamento térmico (pasteurização) pode ser obtido de forma rápida em temperatura alta (HTST- *high temperature short time*), onde o leite é aquecido de 72 a 75 ^{o}C/ 12 a 15 segundos ou pasteurização lenta (LTLT – *low temperature long time*), onde o leite é aquecido de 62 a 65 ^{o}C por 30 minutos (BLACK, 2002).

De acordo com Leite, Vaitsaman e Dutra (2006), após a pasteurização o leite perde certa quantidade de bactérias láticas e uma porção de cálcio solúvel. A acidificação adequada para o processamento é promovida pelas bactérias láticas, sendo necessário, deste modo, repor essas bactérias com a adição de fermento lático, assim como, a reposição do cálcio a partir do cloreto de cálcio a 50% para melhoramento da coagulação da massa.

No protocolo de produção proposto por Ribeiro (2012), na fabricação de queijo tipo brie, o leite deve ser submetido a pasteurização rápida (72 a 75 ^{o}C/12 a 15 segundos). A adição do cultivo iniciador é importante, pois cria condições que proporcionam características peculiares ao queijo (BERESFORD et al., 2001). Deste modo, após a pasteurização o leite é resfriado a 34 ^{o}C para adição do fermento lático composto de *Lactococcus lactis.* A inoculação por um determinado tempo em temperatura adequada favorece o crescimento do cultivo iniciador (ORDÓNEZ, 2005). Nesta etapa também é adicionado 1% de esporos de *Penicillium candidum* e a solução de cloreto de cálcio a 50%.

Cerca de 30 minutos depois o pH do leite atinge 6,6, e então adiciona-se o coalho, que coagula o leite através da ação proteolítica de algumas proteínas (HORNE e BANKS, 2004). Segundo ORDÓNEZ (2005) a coalhada pode ser formada pela acidificação, que pode ser ocasionada por ação das bactérias láticas, ação de enzimas provenientes do coalho ou qualquer outra enzima coagulante.

Estudos preconizados por Horne e Banks (2004) relataram que, com a adição do coalho, a micela é desestabilizada pela α-caseína rompendo os aminoácidos fenilalanina, provocando a liberação das α_{s1}, α_{s2}, β e Ƙ- caseína que se ligam aos íons de cálcio. Com isto, formam o paracaseinato de cálcio e originam a coalhada.

Após a formação da coalhada (30 a 45 minutos), é realizado o corte com liras em cubos. Quando se deseja obter queijos moles, o recomendado é que o corte da coalhada seja feito com grânulos maiores, permanecendo em repouso por aproximadamente 10 minutos (ORDÓNEZ, 2005). A mexedura deve ser feita de forma lenta, com finalidade da dessora do cubo, até que os grãos atinjam o tamanho de um dado (RIBEIRO, 2012).

A massa é enformada (em formas de PVC), não realizando a prensagem, uma vez que a moldagem dá-se com o peso da própria massa (VERNAM e SUTHERLAND, 1995). São realizadas viragens em diferentes momentos: 30 e 45 minutos após a enformagem, 60 minutos após a primeira viragem, 30 minutos após a terceira viragem, 60 minutos após a quarta viragem e 30 minutos após a quinta viragem, para auxiliar na dessora e no formato do queijo.

Os queijos são então desenformados e salgados em salmoura com 20% de sal por 50 minutos. O sal presente na salmoura ajuda na remoção da água superficial, contribui para a sinérese, evita o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e contribui para o sabor do queijo (BLACK, 2002). Em seguida, passam por um processo de secagem por uma hora (UR 80 – 85%; T= 10/12 ºC). Logo após a saída da câmara de secagem, os queijos são submetidos à aplicação por aspersão de uma solução salina de esporos do *Penicillium candidum* (0,006%) em todas as suas faces. Após isso é realizada a maturação com umidade relativa e temperatura aproximada entre (UR 90%; T ± 10 ºC) por trinta dias (RIBEIRO, 2012). As condições ideais para o crescimento do fungo *Penicillium candidum* consistem em baixas temperaturas e alta umidade relativa. O bom desenvolvimento do fungo, resulta na formação do micélio branco ao redor do queijo e uma boa maturação.

2.4 MATURAÇÃO DO QUEIJO

A maturação pode ser entendida como uma série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorre em todos os queijos, exceto aqueles que são consumidos frescos. Sua finalidade é conferir aos queijos características organolépticas especiais, o envelhecimento promove acentuação nos atributos sensoriais que dão aos queijos características singulares (SOUSA, ARDO e MCSWEENEY, 2001; PERRY, 2004; MARGALHO, 2020).

As reações envolvidas na maturação consistem em três vias bioquímicas principais: proteólise, lipólise e glicólise. Elas são responsáveis pelas mudanças físico-químicas e sensoriais observadas em queijos maturados, essas mudanças estão relacionadas ao desenvolvimento da cor, textura e aroma. Inicialmente ocorre a glicólise que consiste na conversão da lactose em ácido lático e demais ácidos orgânicos. Em seguida ocorre a proteólise, que consiste na hidrólise das proteínas do leite em peptídeos de médio peso molecular, atingindo níveis de aminoácidos, modificando a textura e contribuindo para o aroma e sabor dos queijos. A lipólise ocorre originalmente pela ação das lipases naturais do leite ou de culturas láticas, que hidrolisa os lipídeos em ácidos graxos e contribui fortemente no aroma (FOX et al., 2000; MARGALHO, 2020).

As enzimas que regem estas reações são a quimosina (renina) ou substitutos de renina, enzimas provenientes do próprio leite, culturas iniciadoras eventuais e de culturas não iniciadoras. As enzimas fornecem peptídeos que atuam como substratos para as enzimas intracelulares da microflora do queijo e são responsáveis pela liberação de aminoácidos. Estudos relatam que os aminoácidos contribuem para o desenvolvimento do *flavour*

característico no queijo e que são precursores de seus componentes voláteis. Fatores como tempo, pH, concentração de sal e temperatura também afetam o processo de maturação (LAW, 1987; MARGALHO, 2020).

O índice de maturação é medido pela degradação de caseína, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica. É esperado que o índice aumente com o avanço da maturação. Estudos diversos têm utilizado a eletroforese capilar e a cromatografia, para acompanhar a degradação da caseína através da separação das proteínas com base no peso molecular, permitem o acompanhamento da hidrólise em componentes menores e, portanto, conferem um melhor entendimento dos processos proteolíticos envolvidos na maturação (OTTE et al., 1997; BALDINI, 1998).

A maturação dos queijos é feita, na maioria dos casos, em câmaras com controle de temperatura e umidade. Geralmente a temperatura varia de 10 °C a 12 °C enquanto a umidade varia de 85% a 90%. O tempo varia de acordo com o tipo, podendo ir de poucas semanas a muitos meses (EMBRAPA, 2008).

Na fabricação de queijos com adição de *Penicillium candidum*, estudos relatam que após cerca de oito dias de maturação, o mofo branco torna-se visível na superfície do queijo; com doze dias, surge como um feltro ou manto branco e é quando os queijos podem ser embalados. Em cerca de três semanas de maturação, o queijo já pode ser consumido, mas se esperadas mais duas semanas, o sabor do queijo se torna mais pronunciado e ele fica mais untuoso (SUZUKI, GARCIA e MORA, 2011).

2.5 PROBIÓTICOS - *Lactobacillus acidophilus*

Diversos autores (REID, 2001; FAO/WHO, 2001; HILL et al., 2014; GOVENDER et al., 2014; MEDEIROS JÚNIOR et al., 2019) relatam que os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro sendo utilizados como complemento alimentar para humanos e animais, permitindo o aumento da resposta imune, redução do colesterol, redução dos efeitos da dermatite atópica, diarreia, intolerância a lactose, constipação e infecção do trato urinário.

Os microrganismos probióticos geralmente estão disponíveis como concentrados de cultura na forma seca ou congelada para serem adicionados a um alimento para usos industriais ou domésticos. Podem ser consumidos como produtos alimentícios ou como suplementos alimentares, produtos em pó, cápsula ou comprimido. A maioria dos produtos probióticos é classificada como alimento funcional, estima-se que os alimentos probióticos

compreendam entre 60% e 70% do mercado total de alimentos funcionais (GRANATO et al., 2010; KOLOZYN-KRAJEWSKAA e DOLATOWSKI, 2012; HENNESSY, 2013; TRIPATHI e GIRI, 2014).

Segundo Tripathi e Giri (2014), o aumento da conscientização dos consumidores sobre o impacto dos alimentos na saúde tem ocasionado um crescimento na demanda por alimentos funcionais probióticos. O que tem fomentado um grande número de evidências teóricas e experimentais para incorporação de probióticos em produtos lácteos como leites fermentados, sorvetes, iogurtes e vários tipos de queijos (GOETZKE, NITZKO e SPILLER, 2014; MARTIROSYAN e SINGH, 2015; REYNOLDS e MARTIROSYAN, 2016).

Para que as bactérias sejam classificadas como probióticas alguns critérios são exigidos, devem possuir propriedades tecnológicas adequadas que permitam seu processamento em larga escala com incorporação a produtos alimentícios sem perder a viabilidade e funcionalidade até o momento do consumo, não produzir substâncias indesejáveis quanto ao *flavor* e textura, sobreviver à passagem através do trato gastrintestinal e chegarem vivos no local de ação. Os gêneros aos quais pertencem as bactérias devem ser de origem humana além de ser seguro para consumo humano, ter histórico de não patogenicidade e não possuírem genes determinantes de resistência a antibióticos (SAARELA et al., 2000; VANDENPLAS, HUYS e DAUBE, 2015; SILVA et al., 2015; KUMAR e KUMAR, 2016).

A legislação brasileira estabelece que o número mínimo viável de cultura probiótica deve ser entre 10^8 e 10^9 UFC por porção diária do produto que corresponde ao consumo de 100 g de um produto que contenha 10^6 a 10^7 UFC/g (BRASIL, 2005). A utilização de queijos com a adição de probióticos apresenta-se como uma alternativa vantajosa para a indústria de laticínios.Apresentam maior teor de lipídeos, elevada disponibilidade de nutrientes, matriz de textura densa, pH mais elevado em relação a leite fermentados e iogurtes, produzem ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, etanol, e consequentemente inibem o crescimento de bactérias patogênicas como *Salmonella spp., Escherichia coli e Staphylococcus aureus*e atuam em sua bioconservação (RIBEIRO, SIMÕES e JURKIEWICZ, 2009; KARIMI, MORTAZAVIAN e CRUZ, 2011; PADILHA, 2013; LIMA et al., 2014; VARGAS et al., 2017).

Fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem e compostos antimicrobianos presentes no leite, podem influenciar a sobrevivência destas bactérias podendo ocasionar redução em sua contagem (KAILASAPATHY e CHIN, 2000; LIMA et al., 2014). Segundo Ranadheera, Baines e Adams (2010), o teor de gordura, a

concentração e o tipo de proteínas e carboidratos, bem como propriedades físico-químicas como pH, atividade de água (Aw) também são fatores que podem afetar o crescimento e a sobrevivência do microrganismo probiótico no alimento.

Flimelova et al., (2013) desenvolveram queijo fresco utilizando *dressing* fermentado com e sem culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e inulina. Os resultados obtidos indicam que todas as amostras (controle, somente com probiótico e com probiótico e prebiótico) alcançaram contagem de bactérias láticas superiores a 10^6 UFC/g durante todo o período de armazenamento. A população de microrganismos probióticos aumentou no sexto e 15º dia de armazenamento. Os autores concluíram que a redução da carga microbiana pode estar relacionada com a produção intensiva de ácido láctico produzido pelas culturas probióticas e é o principal inibidor do crescimento microbiano.

O mesmo foi verificado por Ribeiro, Simões e Jurkiewicz (2009), que elucidam a sobrevivência do *L. acidophilus* adicionado nas concentrações 10^6 ; 10^7; 10^8 UFC/g no queijo de minas frescal após 28 dias de armazenamento e verificaram que o decréscimo da população da bactéria probiótica, ao longo do tempo, não foi significativo.Chaves(2014) em seu estudo com queijo Prato probiótico relata que a contagem de *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se viável, uma vez que não alterou a composição físico química dos produtos, nem seu comportamento durante a maturação de 60 dias.

2.6 TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO

A legislação, em nome da segurança alimentar, vem inibindo a elaboração e comercialização de queijos produzidos a partir de leite cru e com maturação inferior a 60 dias, exigindo a pasteurização do leite para a fabricação de queijos como solução para inocuidade do produto industrial. No entanto, queijos produzidos com leite cru possuem aroma particular e propriedades organolépticas típicas, que se associam a atributos do próprio leite, relacionados à raça e ao tipo de nutrição das vacas, a microbiota autóctone responsável pela fermentação e maturação. Essa legislação gera, às vezes, situações de difícil solução. A microbiota presente no leite cru pode atuar como uma fonte direta na fabricação dos queijos, ou como uma fonte indireta enriquecendo a microbiota do ambiente de fabricação de queijos (GIANNINO, 2009; MONTEL et al., 2014; CARVALHO, 2015).

O uso de fermento lático, específico ao tipo de queijo que se deseja obter, age como inibidor de alguns microrganismos indesejáveis e confere ao queijo características típicas, por conter diversos grupos microbianos que direcionam a fermentação e maturação do queijo, conferindo ao produto final uma microbiota diversificada (MARTINS et al., 2014).

A maturação é uma das formas utilizadas para melhorar a qualidade microbiológica desses queijos, já que, por serem produzidos a partir de leite cru apresentam uma possível contaminação inicial. A maturação favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos, considerados fundamentais para a estabilidade e segurança microbiológica desses queijos. Corresponde ainda à fase de complexas transformações bioquímicas, que se processam tanto na periferia como no interior da massa dos queijos, sob a ação de enzimas, na sua maioria de origem microbiana (DORES e FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2014).

Diversos autores acreditam que o tempo de maturação de vinte dias associado ao fermento específico utilizado, são capazes de eliminar as bactérias patogênicas que possam estar presentes no queijo. Essa situação já foi enfrentada por produtores de outros países, entre os quais a França que possui um grande número de queijos produzidos com leite cru. Na França, a solução veio através da implantação de boas práticas de manejo do gado, e higiene rigorosa em todas as etapas de produção do queijo, garantindo a qualidade microbiológica do produto e preservando a saúde do consumidor. O mesmo vem sendo realizado em Minas Gerais com apoio do governo estadual e de organizações não governamentais, inclusive com a participação de produtores franceses (CERRI, 2002).

O Decreto N° 9.013/2017, publicado em 29 de março de 2017, excluiu a obrigação de pasteurização ou outro tratamento térmico do leite que se destine à elaboração de queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperaturasuperior a 5 ºC durante um período não inferior a 60 dias, o período mínimo de maturação dos queijos pode ser alterado, após a realização de estudos científicos conclusivos sobre a inocuidade do produto. A nível estadual, cada estado vem estruturando sua legislação de acordo com a realidade de sua produção (BRASIL, 2017). Em 18 de Julho de 2019, foi sancionada a Lei nº 13.860 que permite a não pasteurização do leite para fabricação de queijo artesanal, contudo, a aplicabilidade fica restrita a queijarias situadas em estabelecimento rural, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural. Não é considerado queijo artesanal aquele feito em indústria de laticínios, mesmo que em seu registro no órgão competente possua autorização para inserir no rótulo os termos “artesanal” ou “tradicional” (BRASIL, 2019).

Algumas pesquisas vêm tentando estabelecer um tempo de maturação inferior ao período de 60 dias previstos na legislação federal, sem comprometer a qualidade sanitária e sensorial do alimento (SALES, 2015; STIVAL, 2016; BEZERRA, 2018). Resultados bem sucedidos dessas pesquisas podem favorecer o desenvolvimento de uma nova tendência de mercado para queijos, pois contribuirão para a geração de um produto com maior segurança alimentar, valor de mercado agregado e maior lucro na comercialização. Entretanto, a adoção

de Boas Práticas de Fabricação é fundamental para a obtenção de um queijo seguro (SALES, 2015).

Azeredo (2004) e Tonelli (2013) descrevem que, a pasteurização consiste em submeter o leite a um nível de aquecimento onde todos os microrganismos patogênicos presentes neste alimento sejam destruídos. É importante que este processo não cause alterações físico-químicas e sensoriais e, também, não altere o valor nutritivo do produto. O leite pasteurizado deve ser garantido do ponto de vista higiênico-sanitário, deve apresentar características semelhantes, ao máximo, ao produto natural e, além de apresentar maior vida de prateleira, pois há a destruição de, aproximadamente, 99% dos microrganismos deteriorantes presentes no leite. O processo de pasteurização pode ocorrer de diferentes formas levando em consideração o tempo e a temperatura.

Com a pasteurização do leite, parte do cálcio relacionado à proteína é abreviado prejudicando diretamente a formação de uma coalhada apropriada. Este problema geralmente é corrigido com adição de cálcio na forma de cloreto de cálcio na dosagem em solução aquosa, de 40 a 50 mL para cada 100 litros de leite previamente pasteurizado, sem excesso, sob pena de resultar em sabor amargo. Igualmente, não pode ser aplicado em quantidade insuficiente, pois formaria uma coalhada fraca. O cloreto de cálcio promove uma boa coagulação assegurando uma coalhada mais firme e compacta, prevenindo perdas de sólidos no soro, reduzindo o tempo de coagulação e melhorando a extrusão do soro e o rendimento do produto (NASSU, MACEDO e LIMA, 2006, MATOS et al., 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL

O leite bovino utilizado na pesquisa foi fornecido por uma pequena propriedade localizada na cidade de Bananeiras – PB. Esse, foi ordenhado e coletado no período da tarde, sendo posteriormente resfriado a 4 ºC e transportado em garrafões plásticos, previamente esterilizados, e conduzido até o laboratório onde foi realizada a pesquisa.

Os queijos tipo *brie* foram obtidos com leite cru e leite pasteurizado para posterior comparação dos resultados das suas caracterizações. As amostras foram recepcionadas e tratadas no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, onde se retiravam alíquotas para pasteurização rápida. A pasteurização foi realizada conforme a IN 51 (BRASIL, 2002): aquecimento a 75 ºC por 15 segundos, seguida de choque térmico em banho de água e gelo. As mesmas foram armazenadas em recipientes de vidro, com tampa rosqueável previamente esterilizadas e seguiram para caracterizações microbiológicas e físico-químicas. Posteriormente no processamento dos queijos, o leite passou pelo mesmo procedimento, a amostra foi dividida em duas: uma parte foi processada em sua forma *in natura* e outra sofreu o tratamento térmico.

As culturas de bactérias láticas utilizadas foram adquiridas mediante compra, sendo adicionadas ao leite de acordo com as instruções dos fabricantes por inoculação direta. A cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LYO 10 foi fornecida pela Howaru Premium Probiotics, enquanto a cultura comercial de *Lactococcus lactis* MA 11 LYO e esporos do fungo *Penicillium candidum* PC 12 LYO, foram fornecidas pela Choozit Danisco. Ambas foram mantidas sob congelamento a -18 °C até o momento de uso.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE

3.2.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 25 mL de leite cru e de leite pasteurizado, previamente homogeneizadas, foram transferidas para frascos com 225 mL de água peptonada 0,1%. Posteriormente, alíquotas de 1 mL desses frascos (diluição 10^{-1}) foram transferidas para tubos contendo 9 mL da mesma solução diluente, formando a diluição 10^{-2}. Esse procedimento foi repetido até a obtenção das demais diluições decimais seriadas usadas. A cada transferência, as amostras foram devidamente homogeneizadas (*BAMOnline*, 2020).

3.2.2 Análises microbiológicas

Diluições das amostras de leite cru e de leite pasteurizado foram submetidas à contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, por plaqueamento em superfície em ágar padrão para contagem, com incubação a 35 ± 1 ºC/48 h ± 2h e a contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos, por plaqueamento em superfície, utilizando ágar padrão para contagem, com incubação a 7 ± 1 ºC/10 dias, ambas com resultados expressos como UFC/mL. Ainda, foram determinados coliformes totais e coliformes termotolerantes, pelo método do Número Mais Provável (NMP), cujos resultados foram expressos como NMP/mL, obtidos a partir da consulta a tabela de probabilidade de Hoskin. Todas essas análises foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no *Bacteriologycal Analytical Manual- BAM* (*BAM Online*, 2020).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS

Os queijos obtidos foram submetidos as seguintes análises microbiológicas: contagem de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella e Staphylococcus aureus.*

Em todas as análises microbiológicas, exceto na pesquisa de *Salmonella,* porções de 25 g de queijo foram transferidas para um copo de liquidificador, previamente esterilizado, juntamente com 225 ml de água peptonada 0,1%, para serem homogeneizadas em baixa rotação, por 1-2 min. A partir dessa suspensão (diluição 10^{-1}) foram preparadas as demais diluições decimais das amostras, utilizando a mesma solução diluente. Para a pesquisa de *Salmonella,* foi necessária a utilização de outra unidade analítica de 25 g, obtida a partir do mesmo queijo, tendo em vista que essa amostra não foi diluída, mas sim enriquecida (*BAM Online,* 2020).

A contagem de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas do mesmo modo descrito no item 3.2.2. Para a pesquisa de *Salmonella spp*, alíquotas de 25 g das amostras foram submetidas as etapas de pré-enriquecimento em caldo lactosado, enriquecimento nos caldos tetrationato e Rappaport e isolamento diferencial em ágar *Salmonella-Shigella*, ágar bismuto sulfito e ágar xilose lisina desoxicolato. Em cada uma dessas etapas, as amostras foram incubadas a 35 ºC por 18-24 h. Para fins de confirmação preliminar, as colônias suspeitas de *Salmonella* foram submetidas aos testes em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA), conforme descrito no *Bacteriologycal Analytical Manual- BAM* (*BAM Online*, 2020).

Para pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva foi utilizado o meio seletivo ágar Baird Parker (ABP-Merck) enriquecido com gema de ovo, incubação a 35 ºC por 48 h. Após incubação, procedeu-se a contagem presuntiva do número de colônias que apresentavam características típicas: colônias circulares, pequenas, negras, brilhantes, lisas, convexas, com anel opaco, rodeado por um halo claro transparente, destacando-se sobre a opacidade do meio. As colônias suspeitas foram semeadas no caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 35 ºC ± 2 ºC por 18-24 h para prova de coagulase e a partir do subcultivo crescido no ágar TSA, a prova de catalase. Também a partir deste meio são feitos esfregaços corados pelo método de gram, observando-se a presença de cocos gram positivos, conforme descrito no *Bacteriologycal Analytical Manual- BAM* (*BAM Online*, 2020).

3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CULTURAS INICIADORAS E DO PROBIÓTICO

A viabilidade das culturas iniciadoras adicionadas aos queijos foi avaliada com base nas contagens seletivas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Penicillium candidum*. Para a realização dessas análises, amostras de queijo foram diluídas em água peptonada 0,1% do mesmo modo descrito no item 3.3.

3.4.1 Contagem seletiva de *Lactococcus lactis*

Para a contagem seletiva de *L. lactis*, foram utilizados dois diferentes meios de cultura, amplamente recomendados na contagem de estreptococos láticos: ágar M17 e ágar ST (Tharmaraj e Shah, 2003). Ainda, foi avaliado o desempenho de um terceiro meio de cultura mais acessível e de menor custo, o ágar ST modificado pela adição de ácido ascórbico e sulfato de magnésio, ambos ingredientes adicionados nas mesmas concentrações encontradas no ágar M17. Para obtenção de 300 mL de meio ST, utilizou-se ágar (4,5 g), triptona (3 g), extrato de levedura (1,5 g), sacarose (3 g), fosfato de potássio dibásico (0,6 g). Na obtenção de 300 mL de meio ST modificado, utilizou-se ágar (4,5 g), triptona (3 g), extrato de levedura (1,5 g), sacarose (3 g), fosfato de potássio dibásico (0,6 g), ácido ascórbico (0,15 g), sulfato de magnésio (0,0936 g) com incubação a 37 ºC. Todas as placas foram inoculadas com 0,1 mL das diluições das amostras selecionadas (10^{-2} a 10^{-4}), utilizando a técnica de semeadura em superfície, e incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37º C, durante 48 horas. Após incubação, placas com 25-250 colônias foram contadas, utilizando um contador de colônias, e

os resultados foram expressos em UFC/g. Para fins de confirmação, foram selecionadas 5 colônias, por placa, para serem submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase.

3.4.2 Contagem presuntiva de *Lactobacillus acidophilus*

A contagem presuntiva de *L. acidophilus* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Aljewicz et al. (2014), modificada somente por substituição da incubação anaeróbica pela incubação em microaerofilia (APHA, 2001). A contagem foi realizada em ágar MRS, utilizando a técnica de semeadura em profundidade. Ainda, foi adicionada uma sobrecamada do mesmo meio de cultura, para criar condições microaerofílicas. Após solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 37 ^{o}C por 72 horas. Após incubação, placas com 25-250 colônias foram contadas, utilizando um contador de colônias, e os resultados foram expressos em UFC/g. Para fins de confirmação, foram selecionadas 5 colônias, por placa, para serem submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase.

3.4.3 Contagem de *Penicillium candidum*

A contagem de *Penicillium candidum* foi realizada em três diferentes meios de cultura: ágar Batata Dextrose acidificado, ágar YM e ágar Sabourod Dextrose. Diluições das amostras foram inoculadas nas placas utilizando a técnica de semeadura em superfície. Após solidificação dos meios de cultura, as placas foram incubadas em B.O.D. a 25 ^{o}C, por 5 dias. A contagem foi realizada em contador de colônias mecânico e os resultados expressos em esporos/g.

Para fins de confirmação, uma colônia típica de *Penicillium candidium* foi selecionada e submetida a técnica de microcultivo em lâmina. Foi utilizada uma lâmina com um bloco de ágar Batata Dextrose acidificado, onde foi realizado o repique do fungo, em seguida uma lamínula foi colocada sobre a repicagem e o conjunto foi incubado em placa de Petri estéril por 3 dias a 25 ^{o}C. Após esse tempo o fungo apresentou crescimento na superfície da lamínula, ela foi corada com lactofenol de Amann e levada ao microscópio para visualização da estrutura do fungo (LARONE, 2002).

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE

A caracterização físico química foi realizada no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba no Centro de Tecnologia. As análises de acidez titulável, densidade a 15 ^{o}C e pH foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de

Leite e Derivados, proteínas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, gordura, extrato seco total e extrato seco desengordurado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos.

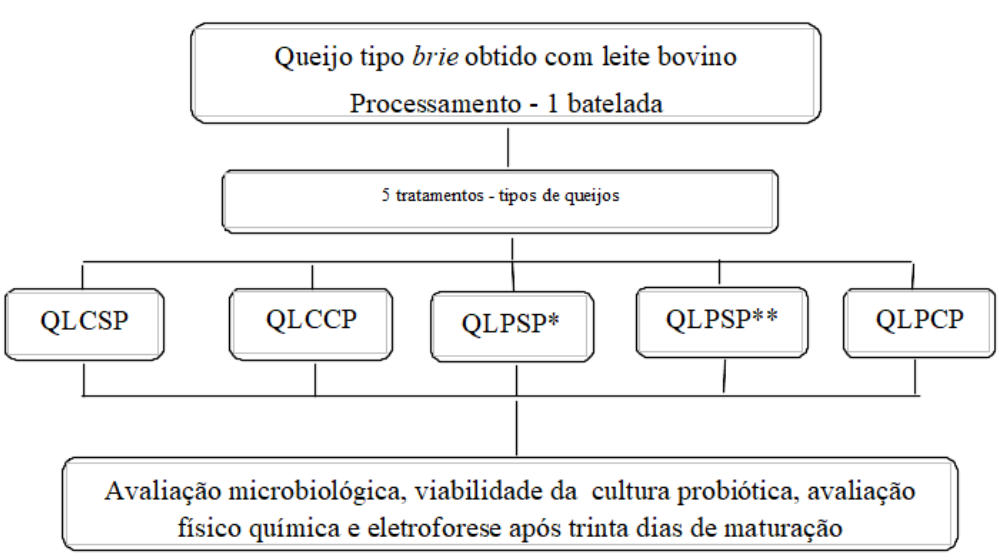
As caracterizações foram determinadas do seguinte modo:

a) Acidez titulável: determinada pelo método de titulação com hidróxido de sódio 0,1 N (solução Dornic), empregando-se o indicador fenolftaleína a 1% (IAL, 2005);
b) Densidade a 15 ºC: a densidade do leite foi determinada utilizando termolactodensímetro (IAL, 2005);
c) Gordura: o teor de gordura (g/100 g) das amostras de leite foi determinado pelo método butirométrico de Gueber (IAL, 2005);
d) Proteína: o nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl e o resultado total convertido em porcentagem de proteína (% m/m) foi obtido multiplicando pelo fator 6,38 (IAL, 2005);
e) Extrato seco total e desengordurado: o extrato seco total (% m/m) foi determinado com o auxílio do disco calculador de Ackermann, levando em consideração o teor de gordura e densidade a 15 ºC. O extrato seco desengordurado foi obtido por cálculo de diferença (IAL, 2005);
f) pH: o potencial hidrogeniônico foi determinado eletrometricamente com a utilização de um potenciômetro (IAL, 2005).

3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os queijos tipo *brie* foram processados em uma batelada, sendo processados cinco formulações. Conforme Figura 1.

Figura 1: Procedimento experimental para elaboração de queijos tipo *brie.*



QLCSP: Queijo com leite bovino cru, contendo a cultura mesófila iniciadora composta de *Lactococcus lactis* e cultura secundária composta de *Penicillium candidum* e sem adição de probiótico.

QLCCP: Queijo com leite bovino cru, contendo a cultura mesófila iniciadora composta de *L. lactis*, cultura secundária composta de *P. candidum* e cultura lática de *Lactobacillus acidophilus*.

QLPSP*: Queijo com leite bovino pasteurizado, contendo a cultura iniciadora composta de *L. lactis*, cultura secundária composta de *P. candidum* e sem adição de probiótico.

QLPSP:** Queijo com leite bovino pasteurizado, contendo cultura iniciadora composta de *L. lactis*, cultura secundária composta de *P. candidum*, sem adição de cloreto de cálcio e probiótico.

QLPCP: Queijo com leite bovino pasteurizado, contendo cultura iniciadora composta de *L. lactis*, cultura secundária composta de *P. candidum* e cultura lática de *L. acidophilus*.

Quatro tratamentos foram adicionados de solução de cloreto de cálcio (50%), para averiguar a ação do cloreto de cálcio em relação a rendimento e melhoramento de características físico-químicas, obteve-se um tratamento sem a adição da solução para posterior comparação. Para caracterização os queijos foram maturados a 10 ºC ± 2 ºC durante trinta dias. As análises propostas no estudo foram realizadas em triplicatas.

Foram realizadas estatísticas descritivas simples com média, desvio padrão e coeficiente de variância com os dados obtidos em todas as caracterizações obtidas.

3.7 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO *BRIE*

Para produção dos queijos, foi utilizado o protocolo de produção proposto por Ribeiro (2012), com adaptações. A amostra foi dividida em duas, sendo uma alíquota mantida *in natura* e outra submetida a tratamento térmico de pasteurização rápida, 75 ºC por 15 segundos, após aquecimento o leite foi resfriado a 34 ºC. Em seguida, o processamento foi o mesmo das amostras obtidas com leite *in natura*.

Inicialmente, para cada 10 litros de leite processado, foi adicionado o fermento lático composto de *Lactococcus lactis* (0,18 g), *Penicillium candidum* (0,5 g) e a cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* (1 g) em dois tratamentos. Foi adicionado também 3 mL de uma solução de cloreto de cálcio (50%) e 45 minutos depois se incorporou o coalho, permitindo a coagulação por aproximadamente 45 minutos. Após a formação da coalhada a mesma foi cortada com liras em cubos, com tamanho entre 1,5 a 2,0 cm de aresta, permanecendo em repouso por aproximadamente 20 minutos.

A mexedura foi realizada de forma lenta, por 5 minutos, para dessora do cubo. A massa foi então enformada em formas de PVC, com fundo perfurado de 500 g, não sendo realizada a prensagem uma vez que a moldagem se deu com o peso da própria massa. A prensagem influencia na textura e sinérese dos queijos (VERNAM, 1994) e como o queijo tipo *brie* possui textura macia, os queijos não foram submetidos à prensagem.

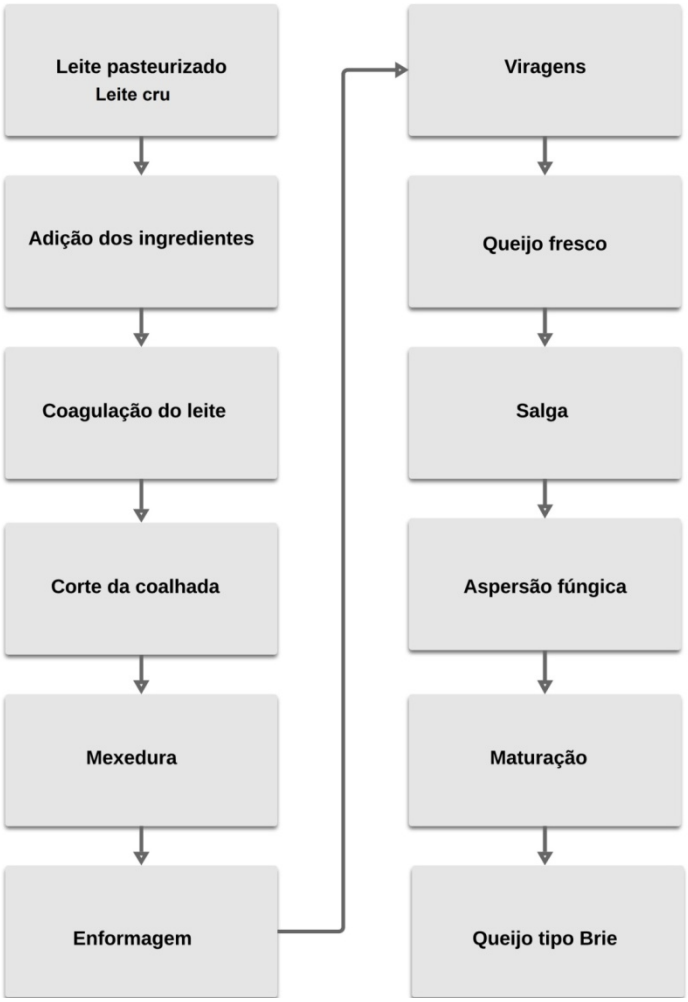
As viragens foram realizadas em diferentes momentos: 30 e 45 minutos após a enformagem, 60 minutos após a primeira viragem, 30 minutos após a terceira viragem, 60 minutos após a quarta viragem e 30 minutos após a quinta viragem, para auxiliar na dessora e no formato do queijo.

A fase da fermentação ocorreu em aproximadamente quinze horas a 25 ºC. Os queijos foram então desenformados e salgados em salmoura com 20% de sal por 50 minutos. A salmoura foi preparada um dia antes e mantida sob refrigeração, pois a temperatura ideal para salga dos queijos é de 8 a 12 ºC.

Em seguida, passaram por um processo de secagem, onde os queijos foram dispostos em bandejas plásticas e mantidos em B.O.D por uma hora com temperatura a ± 10 ºC. Logo após a secagem, os queijos foram submetidos a aplicação por aspersão de uma solução de esporos do *Penicillium candidum* (0,006 g de esporos + 100 mL de água destilada) em todas as suas faces. Após isso foi realizada a maturação por 30 dias a 10 ºC. O ideal seria um controle de umidade relativa na câmara de maturação em torno de 90%.

Na Figura 2, é possível observar o fluxograma do processamento do queijo tipo *brie* adaptado de Ribeiro (2012).

Figura 2: Processamento queijo tipo *brie.*



Fonte: Adaptado RIBEIRO (2012).

3.8 RENDIMENTO

O rendimento de cada queijo foi estimado de duas maneiras:

a) Em litros de leite necessários para a elaboração de um quilo (L/kg). Neste caso, dividiu-se o volume de leite empregado pela soma da massa dos queijos obtidos. Conforme metodologia proposta por Rossi (1998).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (1973), para a produção de queijo tipo *brie* são necessários cerca de 8,2 litros de leite para a obtenção de 1 kg de queijo. Foram utilizados 4,1 L de leite bovino por formulação, objetivando a obtenção de 500 gramas de queijo por formulação.

b) Em gramas de sólidos totais de queijo por litro de leite (g ST/L) (SABOYA, 1998). Para isto empregou-se a equação:

$$R\left(g\frac{ST}{L}\right) = P \times ST \quad \div V$$

Onde,

R = rendimento

P = peso de queijo obtido

ST = percentagem de extrato seco dos queijos

V = volume de leite utilizado

3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUEIJOS

A caracterização físico-química dos queijos obtidos foi realizada no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba. As análises de acidez titulável e pH foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, umidade e atividade de água foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Alimentos.

As caracterizações foram realizadas do seguinte modo:

a) Gordura: o teor de gordura (g/100 g) das amostras de queijo foi determinado pelo método butirométrico de Van Gulik (BRASIL, 2006).

b) Proteínas: o conteúdo de nitrogênio total dos queijos foi determinado empregando-se o método de micro Kjedahl, compreendendo as fases de digestão, destilação e titulação. Resultados expressos em (g/100 g) (BRASIL, 2006).

c) Atividade de água: determinada através de método instrumental em medidor da marca Decagon, modelo Aqualab lite, à temperatura constante (25,0 ± 0,30 °C).

d) pH: o potencial hidrogeniônico foi determinado com a utilização de um potenciômetro (BRASIL, 2006).

e) Cinzas: determinada em mufla a 550 ºC. Resultados expressos em (g/100 g) (BRASIL, 2006).

f) Acidez titulável: determinada pelo método de titulação com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, empregando-se o indicador fenolftaleína a 1%. Resultados expressos em % de ácido lático (BRASIL, 2006).

g) Umidade: determinada em estufa a 105 ºC. Resultados expressos em (g/100 g) (IAL, 2005).

h) Gordura no extrato seco: determinada pelo método indireto por meio da razão entre o teor de umidade e gordura (BRASIL, 2006). Conforme equação:

$$\%\, GES = (\%\, gordura) \div (umidade - 100) \times 100$$

i) Extrato seco desengordurado: determinada pelo método indireto por meio da diferença entre GES e teor de gordura (BRASIL, 2006).

Os resultados foram tratados utilizando estatística descritiva simples.

3.10 PERFIL ELETROFORÉTICO

A eletroforese dos queijos obtidos foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba. O método utilizado foi o de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS modificado (LAEMMLI, 1970).

A solução estoque de SDS (dudecil sulfato de sódio foi preparado com 5 g de SDS e 50 mL de água desmineralizada). Para seguir com nitrato de prata, utilizou-se o gel corado com *comassie*; a solução foi desidratada em solução de álcool etílico a 50% em três etapas de 20 minutos cada. O gel foi colocado em solução de tiossulfato de sódio (20 mg/100 mL de água desmineralizada) por 1 minuto sob agitação vai e vem no recipiente. Realizou-se três lavagens rápidas com água destilada, adição da solução de nitrato de prata (200 mg de nitrato de prata, 74 µl de formaldeído/ 100 mL de água desmineralizada por 20 minutos. Realizou-se três lavagens rápidas com água destilada e adicionou-se solução reveladora (6 g de carbonato de sódio, 50 µl de formaldeído, 2 mL tiossulfato de sódio/100 mL de água desmineralizada). A revelação foi parada com solução de ácido acético a 13% em água após 15 minutos.

Quanto menor a concentração de acrilamida mais aberto é o poro do gel e consequentemente, melhor é a separação para proteínas de maior peso molecular. Dentre os géis testes, o gel de separação foi preparado na concentração 7,5%. Para a corrida eletroforética, a fonte elétrica foi regulada para a tensão de corrida no gel de concentração (80 V), a corrente para 25 mA, iniciando a corrida. Quando a linha azul formada pelo marcador da corrida (azul de bromofenol) ultrapassou a linha do gel de concentração (cerca de 2 horas depois), o gel foi mantido em solução fixadora por uma hora e transferido para um recipiente contendo solução corante. Permaneceu imerso, cerca de 12 a 14 horas (*overnight*), sendo então transferidos para outro recipiente contendo solução descorante, onde foi mantida por cerca de 2 horas até atingir a coloração adequada. Foram obtidas imagens dos géis, com os dados de mobilidade eletroforética relativa e massa molecular de cada fração protéica detectada através da formação das bandas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE

Os resultados das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, coliformes totais e termotolerantes do leite bovino cru e leite bovino pasteurizado, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados das contagens em placas (UFC/g) de microrganismos mesófilos e psicrotróficos e da contagens de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g), em amostras de leite cru e pasteurizado, coletadas na cidade de Bananeiras, Paraíba.

Amostra	**Mesófilos aeróbios (UFC/mL)**	**Psicrotróficos (UFC/mL)**	**ColiformesTo-tais a 35ºC (NMP/ mL)**	**Coliformes Termotolerantes a 45 ºC *(NMP/ mL)***
Leite Cru	$2{,}3 \times 10^4$	$< 1 \times 10^1$	2,0	< 0,3
Leite Pasteurizado	$2{,}8 \times 10^2$	$< 1 \times 10^1$	2,0	< 0,3

UFC: Unidade Formadora de colônias. NMP: Número Mais Provável.

Os resultados das análises microbiológicas realizadas no leite cru e no leite pasteurizado utilizado nessa pesquisa (Tabela 1) foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos na Instrução Normativa - IN nº 62 de 29/12/2011, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, exceto a contagem de microrganismos psicrotróficos, por não haver padrão para esse grupo. Segundo essa legislação (BRASIL, 2011), o leite cru deverá conter, no máximo, 10^5 UFC/mL de microrganismos mesófilos aeróbios mesófilos (contagem padrão em placas) para poder ser processado pela indústria, na forma fluida ou em derivados lácteos. Para leite pasteurizado, esse limite é $8{,}0 \times 10^4$ UFC/mL. Para leite pasteurizado, é exigido também que coliformes totais e termotolerantes não ultrapassem os limites de 4 NMP/mL e 2 NMP/mL, respectivamente, condição alcançada pelas amostras avaliadas. Com base nesses padrões microbiológicos, as amostras de leite cru e pasteurizado estavam adequadas para uso no processamento dos queijos.

Esses resultados demonstraram que a pasteurização, quando realizada corretamente, é eficiente na diminuição do número de microrganismos no leite. No entanto, sua eficácia depende da concentração inicial na matéria prima.

Com relação as bactérias psicrotróficas, não foi verificada a formação de colônias nas placas, demonstrando que esses microrganismos, se presentes, estavam em números muito baixos nas amostras de leite cru e leite pasteurizado analisadas (Tabela 1). A presença de

bactérias psicrotróficas no leite cru pode indicar condições deficientes de higiene em sua obtenção e tempo prolongado de manutenção do leite sob refrigeração antes do processamento, dentre outros. Pinto, Martins e Vanetti (2006) relataram que, apesar de não existir regulamentação específica para bactérias psicrotróficas no leite cru, é imprudente a fabricação de produtos a partir de matéria prima com contagem superior a 5,0 x 10^6 UFC/mL, pois podem ocorrer alterações bioquímicas indesejáveis que limitam a vida de prateleira dos produtos elaborados.

Já Adams e Moss (2000) consideram que números de bactérias psicrotróficas a partir de 1,0 x 10^4 UFC/mL podem resultar na produção de enzimas termoestáveis que ocasionam odor e sabor desagradáveis, além de coagulação do produto, diminuindo sua vida útil. Segundo Moraes et al., (2005), valores elevados de bactérias psicrotróficas constitui um risco para o consumidor não somente devido a deterioração da matéria prima, mas pela provável presença de gêneros de bactérias como *Pseudomonas* e *Listeria,* que apresentam espécies associadas a doenças transmitidas por alimentos.

Para coliformes totais e termotolerantes em leite cru não existem limites microbiológicos estabelecidos na IN nº 62 de 29/12/2011, do MAPA (BRASIL, 2011). Entretanto, nessa mesma legislação são exigidos limites máximos de coliformes totais e termotolerantes em leite pasteurizado (4 NMP/mL e 2 NMP/mL, respectivamente). Com base nesses padrões, o leite cru utilizado nessa pesquisa apresentou qualidade microbiológica satisfatória, estando portanto apto a utilização no processamento dos queijos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS TIPO *BRIE*

Os resultados das contagens de coliformes totais e termotolerantes e da pesquisa de *Salmonella spp*. nos queijos tipo *brie* elaborados nessa pesquisa estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Qualidade microbiológica dos queijos tipo *brie.*

Amostra	**Coliformes totais a 35 ºC (NMP/g)**	**Coliformes termotolerantes a 45 ºC (NMP/g)**	***Salmonella spp.*/25 g**
QLCCP	> 1100	> 1100	Ausente
QLCSP	> 1100	> 1100	Ausente
QLPSP*	< 3,0	< 3,0	Ausente
QLPSP**	150	23	Ausente
QLPCP	< 3,0	< 3,0	Ausente

QLCCP: Queijo com leite cru e probiótico. QLCSP: Queijo com leite cru sem probiótico. QLPSP*: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico com cloreto de cálcio. QLPSP**: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico sem cloreto de cálcio. Queijo com leite pasteurizado com probiótico. NMP: Número Mais Provável.

Considerando que os padrões microbiológicos estabelecidos para queijos, em geral, dependem do teor de umidade desses produtos e que os queijos obtidos nessa pesquisa apresentaram umidade < 36%, o número máximo de Coliformes totais e termotolerantes permitidos nesses queijos, de acordo com a Portaria nº 146/1996 do MAPA foram os seguintes: 10^3 NMP/g e 5 x 10^2 UFC/g, respectivamente. Com base nesses padrões, somente os queijos obtidos com leite cru estavam com contagens de Coliformes totais e termotolerantes acima do estabelecido na legislação. Um sistema de boas práticas de fabricação ineficiente no processamento, a água utilizada e o tempo do processamento dos queijos, podem ter atuado como possíveis causas de contaminação, sendo evidente a importância do tratamento térmico do leite para a garantia da qualidade dos produtos finais. Com relação a *Salmonella,* não foi detectada nenhuma amostra contaminada com esse patógeno.

Quintana e Carneiro (2007) ao analisarem 60 amostras de queijo minas frescal, constataram a contaminação por Coliformes termotolerantes em 33% das amostras de queijo e relacionou as más condições de higiene durante a ordenha e distribuição do produto aos consumidores, contribuindo para esses altos índices também a falta de tratamento térmico no leite. No entanto, estudo de Campos (2016) corrobora conformidade para Coliformes termotolerantes em 3 tratamentos de queijo tipo *camembert* obtido com leite pasteurizado (< 3 NMP/g). Alguns autores também não registraram presença de *Salmonella* em amostras de queijos e associam ao fato da competição das bactérias lácticas com microrganismos patogênicos, que tornam o queijo um meio adverso a sobrevivência desses microrganismos (MELLO, ALVES e COSTA, 2009; PEREIRA, 2014).

A pesquisa de *Staphylococcus* Coagulase positiva no presente estudo foi comprometida devido a pandemia do COVID 19, sendo realizada em apenas uma amostra de queijo obtida com leite cru e com adição de cepa probiótica (QLCCP), as demais formulações estavam com análise em andamento. Foi detectada a ausência deste microrganismo no queijo analisado em (UFC/g). A legislação brasileira vigente estabelece como tolerância para amostra indicativa por análise de 5 x 10^2 UFC/g, evidenciando que o resultado obtido para amostra de queijo com leite sem tratamento térmico foi satisfatório e está dentro do que preconiza os padrões estabelecidos.

Estudos de Campos (2016) relatam que amostras de queijo *camembert* apresentara contagens de *Staphylococcus* Coagulase positiva, no limite máximo permitido pela legislação. De acordo com a pesquisa de Silva Júnior (2017), 10 amostras de queijo coalho obtido com

leite cru apresentaram contagem média de (1,11 x 10^5 UFC/g), variando entre (2,4 x 10^4 a 2,5x10^5), o que representa todas como fora dos padrões exigidos pela legislação.

4.3 VIABILIDADE DAS CULTURAS INICIADORAS

4.3.1 Contagem seletiva de *Lactococcus lactis*

Os resultados das contagens de *Lactococcus lactis* nas amostras de queijo tipo *brie*, utilizando ágar M17, ágar ST e ágar ST modificado estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Contagens de *Lactococcus lactis* em amostras de queijo tipo *brie*, utilizando ágar M17, ágar ST e ágar ST modificado.

Amostra	**M 17 (UFC/g)**	**ST mod (UFC/g)**	**ST (UFC/g)**
QLCCP	3,6 x 10^7	5,5 x 10^7	8,8 x 10^7
QLPCP	7,1 x 10^7	4,0 x 10^7	3,3 x 10^7

QLCCP: Queijo com leite cru com probiótico. QLPCP: Queijo com leite pasteurizado com probiótico.

As duas amostras de queijo tipo *brie* e os três meios de cultura testados apresentaram contagens elevadas de bactérias láticas em forma de cocos, indicativas de *Lactococcus lactis*, na ordem de 10^7 UFC/g. Esses resultados demonstraram a boa sobrevivência dessas bactérias láticas mesmo após 60 dias de maturação do queijo, além da boa seletividade dos três meios de cultura utilizados. Em outros estudos também foram verificadas contagens elevadas de bactérias láticas em queijos maturados, utilizando o meio de cultura M17, mesmo após longos períodos de 2 a 4 meses (ABDALLA et al., 2008; ZEHNTNER, 2008).

Com relação ao uso do ágar ST em queijos maturados, não foram encontrados relatos na literatura pesquisada. O ágar M17 ainda é o meio de cultura mais usado na contagem de estreptococos láticos em produtos lácteos.

Ruggirello et al., (2014) utilizaram ágar M17 para quantificar *Lactococcus lactis* em diferentes tipos de queijos maturados e encontraram resultados bastante variáveis, dependendo do tipo e da marca do queijo. Das 33 amostras analisadas, 12 apresentaram contagens variando de 10^6-10^8 UFC/g, 13 tiveram contagens na ordem de 10^3-10^5 UFC/g e 8 destas não apresentaram colônias no ágar M17. Segundo esses pesquisadores, durante o processo de maturação dos queijos, a cultura iniciadora *Lactococcus lactis* pode ser superada por bactérias láticas não-iniciadoras, especialmente por lactobacilos, numericamente mais abundantes nesses produtos.

Com base nas contagens de *Lactococcus lactis* obtidas nos meios ST e ST modificado, foi constatada a eficiência destes na quantificação deste microrganismo, tendo em vista que propiciaram excelente crescimento e altas contagens microbianas. O uso de ST e ST modificado pode, portanto, ser uma alternativa de substituição ao meio M17, por apresentar menor custo.

4.3.2 Contagem presuntiva de *Lactobacillus acidophilus*

Os resultados das contagens de *Lactobacillus acidophilus* em ágar MRS a partir de amostras de queijo tipo *brie* obtidas a partir de leite cru e pasteurizado, ambas adicionados dessa cultura probiótica foram os seguintes: 4,9 x10^7 UFC/g (QLCCP) e 9,2 x 10^7 UFC/g (QLPCP). Esses resultados demonstraram que os lactobacilos estavam presentes nas amostras de queijos em números elevados, na ordem de 10^7 UFC/g.

Tabela 4: Classificação de adequação do queijo de acordo com o número de unidades formadoras de colônias UFC/g para *Lactobacillus acidophilus*.

Amostra	**UFC/g**	**ISO 20128: 2006**
Queijo de leite cru com probiótico	4,9 x 10^7	10^4
Queijo leite pasteurizado com probiótico	9,2 x 10^7	10^4

É recomendado que um alimento probiótico apresente uma concentração mínima de bactéria probiótica dentro do prazo de validade do produto para que possua efeitos benéficos (BRASIL, 1999). Estudos preconizam uma dose mínima de 10^6 a 10^7 UFC/g da cultura probiótica no alimento para caracterizá-lo como probiótico (BLANCHETTE et al., 1996).

Segundo a ISO 20128:2006 os produtos com alegação funcional devem ter bactérias *Lactobacillus acidophilus* com populações de, no mínimo, 10^4 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de queijo e no mínimo 10^6 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) para outras bactérias. As duas formulações adicionadas de *Lactobacillus acidophilus* estão com contagem acima da preconizada pela legislação em vigor, evidenciando que mesmo após 30 dias de maturação as características do probiótico mantiveram-se estáveis, apresentando deste modo bom desempenho tecnológico.

Avaliando o comportamento do *L. acidophilus* no ágar MRS, observaram-se contagens entre (4,9 x 10^7 UFC/g) para o queijo obtido com leite cru e o obtido com leite pasteurizado (9,2 x 10^7 UFC/g). Uma menor contagem deste microrganismo no queijo obtido

com leite cru era esperada, pois existem atividades inibitórias e competitivas entre microrganismos presentes na microbiota natural do leite e o *Lactobacillus acidophilus*.

Buriti e Saad (2007) avaliaram a sobrevivência de *L. acidophilus* em queijo minas frescal produzido com acidificação direta com ácido lático e também com adição de cultura mesófila *Lactococcus lactis*. No tipo de queijo avaliado, a cultura probiótica permaneceu viável durante 21 dias de armazenamento, no entanto, no queijo contendo a cultura mesófila, as contagens de *L. acidophilus* foram ligeiramente superiores, sugerindo um sinergismo entre os microrganismos. No queijo contendo apenas *L. acidophilus*, a concentração atingiu valores abaixo de 10^6 UFC.g^{-1}.

4.3.3 Contagem de *Penicillium candidum*

As amostras de queijo tipo *brie* processadas a partir de leite cru e pasteurizado foram inoculadas nos meios ágar batata, YM e ágar sabourod dextrose de modo a averiguar qual o meio propiciaria as melhores condições de crescimento ao *Penicillium candidum*. As contagens podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5: Contagem do *Penicillium candidum* em diferentes meios de cultura.

Amostras	**Ágar Batata Dextrose (esporos/g)**	**YM (esporos/g)**	**Ágar Sabourod Dextrose (esporos/g)**
Queijo de leite cru com probiótico	7,1 x 10^5	6,9 x 10^4	8,2 x 10^4
Queijo de leite pasteurizado com probiótico	9,4 x 10^4	6,5 x 10^5	9,6 x 10^5

A portaria nº 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento contém Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos. Esta norma apresenta os padrões microbiológicos para os queijos divididos em categorias, com limites máximos para as contagens de fungos ou ausência deles.

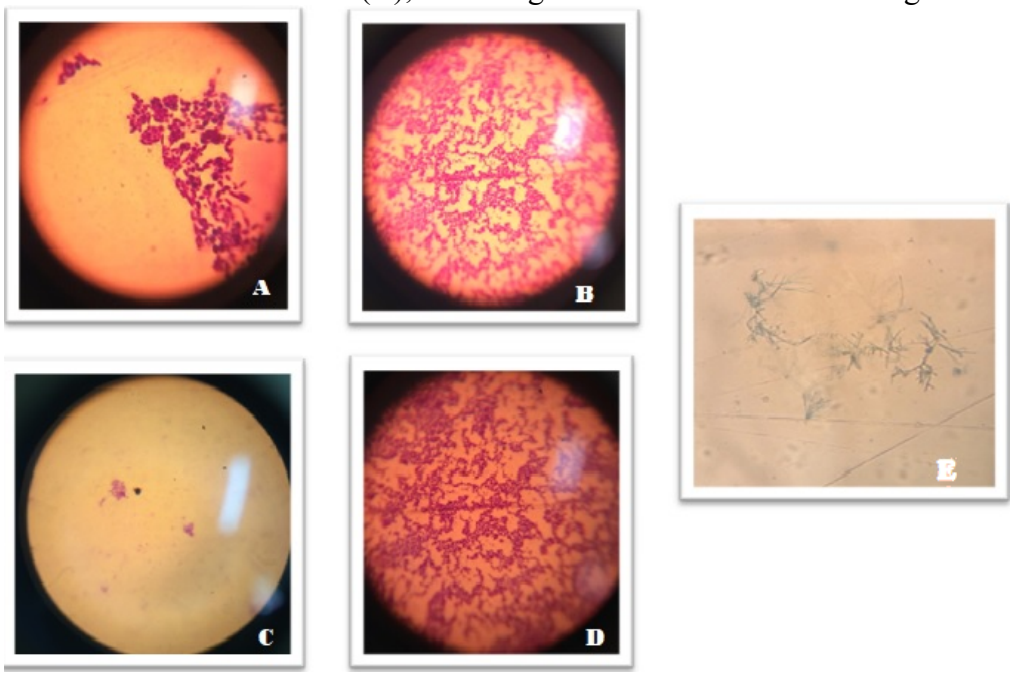
O queijo tipo *brie* enquadra-se na categoria de alta umidade, logo, não há limites para fungos e desta forma, os queijos obtidos estão em conformidade com o que preconiza a legislação. Ao analisar os dados, torna-se evidente sua viabilidade após o processo de maturação.

Pode-se observar ainda na Tabela 5 que para o queijo obtido com leite cru, o meio de cultura que propiciou uma maior visualização de microrganismos foi o ágar batata (7,1 x 10^5

esporos/g), enquanto para o leite pasteurizado o meio que propiciou uma maior visualização foi o ágar Sabourod Dextrose (9,6 x 10^5esporos/g). Embora tenha apresentado boas contagens do *Penicillium candidum*, o ágar sabourod dextrose também propiciou o crescimento de outras leveduras em quantidades elevadas, o que dificulta a contagem. O ágar batata dextrose enquadra-se, portanto, como o mais adequado por apresentar as melhores condições para contagem.

A Figura 3 mostra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica para as bactérias *Lactobacillus*, *Lactococcus* e o fungo *Penicillium*.

Figura 3: Morfologia do *Lactobacillus* em meio MRS (A); Morfologia do *Lactococcus* em meio ST modificado (B); Morfologia do *Lactococcus* em meio ST (C); Morfologia do *Lactococcus* em meio M17 (D); Morfologia do *Penicillium* em meio ágar Batata (E).



As características para *Lactobacillus* em meio MRS resultaram em reação negativa para gram e morfologia de bacilos não característicos. Os bacilos apresentaram-se com extremidades arredondadas e cadeias longas (A). As características para *Lactococcus* apresentaram reação negativa para gram e morfologia em forma de cocos. Na morfologia (B) em meio ST modificado observa-se cocos não arredondados e curtos, já na morfologia (C) em meio ST observa-se cocos arredondados. Na morfologia (D) em meio M17 observa-se cocos bem arredondados e característicos.

As características para *Penicillium* em meio ágar batata resultaram em morfologia representada por hifas septadas com conidióforos ramificados e ramos secundários (métulas). Na morfologia (E) é possível observar que todas as estruturas apresentam características comuns ao gênero *Penicillium*, que são comparados a um pincel.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE

O valor nutricional dos alimentos é definido com base na sua composição centesimal. Para Fagan (2006), a composição média da matéria prima implica, na qualidade do produto final. Vários fatores influenciam na composição e qualidade do leite, as mudanças ligadas ao manejo e a dieta oferecida ao animal, o que reflete na qualidade do queijo. Os resultados das análises físico-químicas do leite cru e leite pasteurizado estão apresentados na Tabela 6.

Os padrões físico-químicos das análises realizadas nas amostras de leite cru e leite pasteurizado foram comparadas com os previstos pela Instrução Normativa nº 62 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011).

Tabela 6: Parâmetros físico-químicos das amostras de leite cru e leite pasteurizado.

Parâmetros	Leite Cru	Leite Pasteurizado
Gordura (g/100g)	3,45 ± 0,212 CV 6,14%	4,35 ± 0,070 CV 1,60%
Proteínas % (m/m)	3,42 ± 0,035 CV 1,02%	3,88 ± 0,629 CV 16,1%
Densidade (g/mL)	1, 0275 ± 0,0007 CV 0,06%	1, 0297 ± 0,002 CV 0,2%
pH**	6,55 ± 0,0007 CV 1,07%	6,65 ± 0,070 CV 1,06%
Acidez titulável (g de ácido lático/100 mL de leite)	0, 132 ± 0,0007 CV 0,57%	0, 145 ± 0 CV 0%
Extrato seco total % (m/m)	12,36 ± 0,098 CV 0,79%	11,84 ± 0,790 CV 6,67%
Extrato seco desengordurado % (m/m)	8,91 ± 0,098 CV 1,09%	7,49 ± 0,791 CV 10,57%

Os resultados são médias em triplicatas com as estimativas do desvio padrão. CV = Coeficiente de variação. ** Potencial hidrogeniônico

Com relação aos teores de gordura, tanto às amostras de leite cru (3,45g/100g) quanto de leite pasteurizado (4,35 g/100g), estão em acordo com a IN 62, que é de no mínimo (3,0 g/100g). A gordura do leite é de extrema importância para a produção de derivados e possui alto valor comercial, portanto, a determinação exata do percentual de gordura no leite é essencial para a indústria de laticínios (CASTANHEIRA, 2011).

Já em relação às proteínas, todas as amostras apresentaram conteúdo protéico acima do mínimo (2,9%) exigido pela legislação. No entanto, houve variação em relação ao

conteúdo de proteínas no leite cru (3,42%) e no leite pasteurizado (3,88%), isto pode ter ocorrido devido a evaporação de água e consequente concentração dos outros constituintes. Segundo Durr, Fontaneli e Burchard (2000), o teor de proteína aumenta o rendimento na fabricação de queijos.

A densidade corresponde ao peso específico do leite, que é determinado por dois grupos de substâncias: a concentração de elementos em solução e suspensão e porcentagem de gordura. Se o leite sofre adição de água de forma fraudulenta, apresentará um valor mais baixo para sua densidade (PACHECO, 2011). De acordo com Foppa (2009), alterações na densidade podem também pode ser consequência de variações na composição química do leite ou adição de amido. Os teores de densidade obtidos para leite cru e leite pasteurizado estão de acordo (1,0275 g/mL e 1,0297g/mL respectivamente) com o que preconiza a legislação (entre 1,028 e 1,034 g/mL).

As amostras de leite cru analisadas apresentaram valor um pouco abaixo (0,132 g de ácido lático/100 mL de leite) dos padrões estabelecidos para acidez (0,14 – 0,18 g de ácido lático/100 mL de leite). Já as amostras de leite pasteurizado apresentaram valor de acordo com a legislação (0,145 g de ácido lático/100 mL de leite). A acidez titulável reflete a produção de ácido lático, sendo indicador de higiene e conservação do leite, teores elevados remetem a falta de higiene ou transporte inadequado, principalmente em relação a temperatura, o que ocasiona a proliferação de bactérias e a consequente produção de ácido lático (RHEINHEIMER, 2006).

Segundo estudos de Freire (2006), a medida que a acidez aumenta, ocorre abaixamento do pH. Na IN 62 os parâmetros que indicam qualidade sanitária e estabilidade térmica variam de (6,4 a 6,9), portanto, os valores obtidos de (6,55 e 6,65) estão em conformidade com o que preconiza a legislação.

O extrato seco total é a reunião dos componentes sólidos do leite e é importante para o rendimento de derivados do leite, quanto maior a quantidade de sólidos totais, melhor o rendimento deste leite para a produção de queijos. O extrato seco desengordurado reflete o mesmo comportamento (SANTOS et al., 2011). A legislação remete a valores de no mínimo (8,4 g/100g) para este parâmetro, estando as amostras de leite cru e leite pasteurizado dentro dos padrões tanto para extrato seco total quanto para extrato seco desengordurado.

As amostras analisadas apresentaram-se em conformidade as normas da Instrução Normativa nº 62. Esses resultados comprovam a qualidade do leite em estudo, evidenciando características sanitárias adequadas para o seu potencial uso na obtenção de queijos tipo *brie*.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS QUEIJOS TIPO *BRIE*

A composição físico-química dos queijos tipo *brie*, determinada após trinta dias de maturação é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Qualidade físico-química dos queijos obtidos com leite cru e pasteurizado.

Parâmetros	QLCCP	QLCSP	QLPSP*	QLPSP**	QLPCP
Gordura (g/100g)	52,0	53,0	43,0	52,0	49,0
Umidade (g/100g)	28,71 ±0,1652 CV 0,57%	24,37± 0,0635 CV 0,26%	24,86 ±0,0777 CV 0,31%	35,47±0,1511 CV 0,42%	25,10± 0,1064 CV 0,42%
Atividade de água	0,844 ±0,0005 CV 0,05%	0,841 ±0,0014 CV 0,16%	0,848 ±0,0021 CV 0,24%	0,844 ±0,0005 CV 0,05%	0,853 ±0,0006 CV 0,07%
Acidez titulável (% de ácido lático)	0,263	0,281	0,275	0,234	0,281
Proteínas (g/100g)	27,66 ± 0,0370 CV 0,13%	29,15 ± 0,215 CV 0,73%	29,25 ± 0,300 CV 1,00%	25,84 ±0,1343 CV 0,51%	28,41 ±0,0579 CV 0,20%
pH* **	5,30	5,08	5,22	5,02	5,0
Gordura no Extrato Seco (g/100 g)	71,88± 0,1652 CV 0,22%	70,07 ±0,0635 CV 0,09%	57,22 ±0,0777 CV 0,13%	80,58 ±0,1511 CV 0,18%	65,33 ±0,1064 CV 0,16%
Extrato seco desengordura-do (g/100 g)	19,88±0,165 2 CV 0,83%	17,07 ±0,0635 CV 0,37%	14,22 ±0,077 CV 0,54%	28,58 ±0,1511 CV 0,52%	16,33 ±0,1064 CV 0,65%
Cinzas (g/100g)	4,79 ± 0,0275 CV 0,57%	3,86 ± 0,0755 CV 1,95%	4,19± 0,0225 CV 0,53%	4,68 ± 0,0226 CV 0,48%	3,36± 0,0848 CV 2,52%

QLCCP: Queijo com leite cru e probiótico. QLCSP: Queijo com leite cru sem probiótico. QLPSP*: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico com cloreto de cálcio. QLPSP**: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico sem cloreto de cálcio. Queijo com leite pasteurizado com probiótico. Os resultados são médias em triplicatas com as estimativas do desvio padrão. CV = Coeficiente de variação. *** Potencial hidrogeniônico.

A legislação brasileira não apresenta padrão de identidade e qualidade específico para o queijo tipo *brie*, o qual deve respeitar os parâmetros básicos do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Portaria nº 146/1996.

A amplitude para umidade de queijos de massa macia de acordo com a IN 146/96 é de 46% a 54,9%. Todos os tratamentos no presente estudo ficaram abaixo dos padrões, variando de 24,37 g/100g a 35,47 g/100g, isto se deve a desidratação dos queijos ao longo da maturação, conforme relatado em tópicos anteriores. Galli (2018) em estudos com queijos tipo *camembert* com adição de *Lb. rhamnosus*, obteve resultados de umidade que variaram de 47,74 g/100g a 50,57 g/100g. Pereira (2014), ao avaliar queijos tipo *brie* industriais em diferentes períodos do ano também constatou umidade abaixo do ideal, com teores que variaram de (39,64 g/100g a 45,05 g/100g).

A variação de umidade possui relação com o processamento e maturação, principalmente quando a maturação é realizada em câmaras com controle de temperatura e umidade. Neste período o queijo deve permanecer com umidade ambiente acima de 90%, para favorecer o desenvolvimento do micélio e manter as características de textura no produto. Se ocorrer algum problema, ou falta de controle o queijo pode perder umidade e apresentar teores mais baixos (FURTADO, 2008; PEREIRA et al., 2020).

Em relação à gordura, a Portaria nº 146/96 do MAPA considera o conteúdo de matéria gorda no extrato seco. O queijo tipo *brie* enquadra-se como gordo, devendo apresentar entre 45,0 a 59,99% de gordura. Em todos os tratamentos os queijos estão dentro do que estabelece a legislação, enquanto o teor de gordura no extrato seco apresentou teores muito altos, o que possui relação com a umidade. Pois, o mesmo foi calculado a partir da umidade e gordura do produto.

No presente estudo, os valores variaram bastante e uma observação interessante é que a única amostra ao qual não foi adicionada solução de cloreto de cálcio, nem *L. acidophilus* apresentou o maior índice de gordura no extrato seco e maior índice de extrato seco desengordurado. Pode-se observar que o tratamento térmico também apresentou influência nestes parâmetros, os queijos obtidos sem tratamento térmico tiveram maior conteúdo de gordura que os obtidos com leite pasteurizado, exceto para amostra sem cloreto de cálcio.

A gordura no extrato seco é um dos principais constituintes responsáveis pela obtenção de um bom rendimento final do queijo. Campos (2016) obteve em seus tratamentos

com queijos *camembert* valores de gordura variando de (17,12% m/m a 17,19% m/m) e Gordura no Extrato Seco variando de (36,57% a 39,25%).

Para os teores de cinzas, a recomendação da *USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release14* (2001) e de teores de (2,7 g/100g), porém nenhum dos tratamentos obtidos nesta pesquisa está dentro desta referência variando de (3,36 g/100g a 4,79 g/100g). A alimentação do rebanho quando possui uma dieta rica em concentrados com baixo teor de fibras pode elevar os teores minerais do leite e, consequentemente do queijo (FAGAN, 2006; PEREIRA, 2014).

Ao analisar queijos tipo *brie* industriais obtidos em diferentes estações do ano, Pereira et al. (2020) constatou diferenças nos teores de cinzas (3,07 g/100g, 3,74g/100g, 4,90 g/100g). Campos (2016), em pesquisa com queijos *camembert* sem mexedura e com adição de compostos protéicos, obteve resultados de cinza que variaram entre (2,97 g/100g e 2,87 g/100g).

Os teores de acidez variaram de 0,234 a 0,281% de ácido lático. A acidez tende a aumentar de acordo com o crescimento dos microrganismos, no transcorrer do período do armazenamento, beneficiando o produto por inibir a microbiota patogênica. No entanto, a acidez excessiva pode prejudicar os aspectos sensoriais em queijos, descaracterizando o produto (SANGALETTI, 2007). Freitas Filho et al., (2009), obtiveram resultados de acidez em sua pesquisa com queijo coalho artesanal com variação de 0,113 a 0,495% de ácido lático.

A determinação do potencial hidrogeniônico é importante para caracterização de queijos devido a sua influência na textura, atividade microbiana e na maturação. O menor valor de pH obtido (5,0) foi o da amostra com tratamento térmico e adição da cepa probiótica, possivelmente ocorreu uma maior produção de ácido lático. O que pode ser verificado no teor de acidez dessa amostra (0,281% de ácido lático). Furtado (2005), relata que queijos maturados com *Lactobacillus* tem influência na atividade proteolítica, pH, e no desenvolvimento da acidez.

Lourenço Neto (1998), observou em queijos minas frescal adicionado de *Lactobacillus* após 21 dias de maturação, valores de pH entre (5,56 e 5,82). No presente estudo os valores de potencial hidrogeniônico variaram de (5,0 a 5,33).

A atividade de água dos queijos apresentou valores distintos, apresentando variação entre 0,841 a 0,853, sendo o tratamento de menor valor o que também apresentou menor teor de umidade. Henão, Queiroz e Hajisa (2009) descrevem este parâmetro como a medida de água disponível em um alimento, não vinculada a componentes, tornando-se possível de reagir quimicamente e permitir o desenvolvimento microbiano. A atividade de água ideal para

o desenvolvimento de bactérias lácteas varia de 0,93 a 0,96 dependendo da espécie (BERESFORD et al., 2001).

A legislação brasileira não descreve valores legais para proteínas em queijos. Os valores obtidos variaram de (25,84 a 29,25 g/100g), sendo os queijos com adição de solução de cloreto de cálcio os que apresentaram maiores teores de proteínas. Amostras de queijo que sofreram tratamento térmico apresentaram resultados para proteínas dentro da média não apresentando influência significativa quando comparados com os queijos obtidos com leite cru, exceto a formulação sem adição de cloreto de cálcio, que apresentou o menor teor protéico. Pereira (2014), observou em seus tratamentos com queijo tipo *brie* valores entre (18,59 a 21,57 g/100g). Contudo, Lima et al. (1998), encontraram valores de proteínas de (24,23 a 25,22 g/100g) em queijos de massa macia, apresentando variação nos teores de proteínas. Pesquisadores citam que o coalho e o cloreto de cálcio influenciam na quantidade de proteína presente em queijos, pois exercem interferências na proteólise durante a maturação (FOX, 1991; YUNES e BENEDET, 2000).

4.6 ASPECTOS VISUAIS DOS QUEIJOS

Uma das características que contribui para a percepção de atributos sensoriais como a textura dos queijos, antes de degustar, inclui o aspecto visual dos mesmos. O aspecto visual é detectado pela presença superficial de olhaduras, grânulos e rugosidades (FOX, 2004).

Após o período de maturação com temperatura controlada, os queijos tipo *brie* obtidos apresentaram visualmente bom crescimento do micélio branco em sua superfície, característica do fungo *Penicillium candidum.*

No atributo textura, o queijo QLCSP obtido com leite cru sem adição de cepa probiótica apresentou grandes grânulos em seu interior e dureza elevada. Os atributos aroma e sabor foram satisfatórios, o mesmo apresentou aroma agradável e salmoura adequada. Conforme mostram as Figuras 4 e 5.

Figura 4: Aspecto visual da parte interna do queijo obtido com leite cru sem probiótico (QLCSP).

Figura 5: Aspecto visual da parte externa do queijo obtido com leite cru sem probiótico (QLCSP).

O queijo QLPSP* obtido com leite pasteurizado sem probiótico também apresentou bom crescimento do micélio branco em sua superfície. No atributo textura, o queijo apresentou pequenos grânulos em seu interior e em menor quantidade. Já em relação à dureza, as formulações obtidas com leite pasteurizado apresentaram maior dureza que as demais, chegando a esfarelar o queijo ao partir. Conforme mostra a Figura 6.

Figura 6: Aspecto visual da parte interna e externa do queijo obtido com leite pasteurizado sem probiótico (QLPSP*).

O tratamento térmico pode ter afetado significativamente a umidade, teor de proteína total e proteína no extrato seco, através da desnaturação de parte das proteínas do soro (β-lactoglobulina), tornando os queijos mais duros do que os queijos obtidos com leite cru. No momento da coagulação, as proteínas do soro quando complexadas a caseína se precipitam, aumentando o teor protéico total bem como a capacidade de retenção de água adsorvida por essas proteínas (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006).

De acordo com Johnson (1998), a umidade do queijo é atribuída pela imobilização da água por parte das proteínas do leite, após a interação entre a caseína e as proteínas do soro. As micelas das caseínas, envolvidas pelas proteínas solúveis ficam impossibilitadas de interagir umas com as outras, reduzindo a expulsão do soro, o que leva à formação de um coágulo mais macio que retém mais umidade e ocasiona uma maior dureza no queijo.

Os queijos com a adição da cepa probiótica não apresentaram diferença perceptível em relação à textura, aroma e sabor quando comparadas as formulações que foram obtidas sem a cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus.* A adição da cepa probiótica também não interferiu no desenvolvimento do fungo e do fermento. Conforme mostram as Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7: Aspecto visual da parte interna do queijo obtido com leite pasteurizado com probiótico (QLPCP).

Figura 8: Aspecto visual da parte interna do queijo obtido com leite cru com probiótico (QLCCP).

Figura 9: Aspecto visual da parte externa do queijo obtido com leite pasteurizado com probiótico (QLPCP).

O queijo QLPCP obtido com *Lactobacillus acidophilus* e leite pasteurizado apresentou grânulos pequenos e em menor quantidade, conforme visualização da Figura 7. O queijo QLCCP obtido com *Lactobacillus acidophilus* e leite cru apresentou maiores grânulos e em quantidade maior, conforme visualização na Figura 8. Com relação aos atributos aroma e sabor, os produtos obtidos com leite com tratamento térmico, QLPCP, QLPSP* e QLPSP**, também foram satisfatórias com sabor e aroma típicos de queijos maturados. Sendo a formulação obtida com leite com tratamento térmico e com adição de probiótico (QLPCP) a que apresentou melhor formação do micélio branco do fungo no exterior do queijo, conforme visualização da Figura 9.

A transformação da textura e consistência cremosa após a maturação é motivada pela proteólise, ela preconiza reações bioquímicas nos aminoácidos que caracterizam o sabor, aroma e *flavor* do queijo. A proteólise pode ainda interferir nas ligações com peptídeos hidrofóbicos de alta massa molecular produzindo no queijo sabor amargo (FOX, 1998; FURTADO, 2011).

A análise sensorial nos queijos tipo *brie,* que estava prevista no projeto original e já tinha aprovação do comitê de ética em Pesquisa com seres humanos, sob Protocolo CAAE: 2007676719.0.0000.5188, não foi realizada devido a pandemia do COVID 19. No entanto, a percepção desses aspectos visuais após a maturação são essenciais para perceber às diferenças entre as formulações obtidas. Para melhorar a textura, o que pode ser feito é embalar os queijos após o décimo dia de maturação. Tendo em vista que os queijos obtidos não apresentaram textura macia característica a este tipo de queijo.

4.7 PERDA DE PESO DURANTE A MATURAÇÃO DOS QUEIJOS

A perda de umidade está relacionada com vários parâmetros do processo de obtenção de um alimento. Na maturação de queijos, além da temperatura e da umidade relativa na câmara de maturação, o processo para a obtenção da massa láctea é outro parâmetro que pode influenciar na umidade final do produto (KROLOW e RIBEIRO, 2006).

Os queijos obtidos sofreram perda de água significativa durante a maturação. Os mesmos foram pesados no início da maturação e durante a maturação em dias alternados, com o objetivo de acompanhar a perda de umidade sofrida. Nos primeiros dez dias de maturação houve uma maior perda de água em todos os queijos, de forma mais pronunciada nas formulações com leite pasteurizado.

Após dez dias de maturação a perda de água nos queijos ocorreu de forma mais lenta, voltando a apresentar perda significativa após 17 dias de maturação. A formulação sem a adição de solução de cloreto de cálcio (QLPSP**), apresentou comportamento diferente em relação às outras formulações obtidas com adição de cloreto de cálcio, nos primeiros 10 dias da maturação houve uma perda brusca de água, no entanto, no decorrer dos dias as pesagens mostraram peso quase que constantes. Posteriormente, com a caracterização físico química, foi possível compreender que possivelmente as micelas de caseínas mantiveram-se no centro do queijo, promovendo uma dureza elevada e concentrando toda sua umidade e gordura na região central do mesmo, sendo esta formulação a que apresentou maiores concentrações de gordura no extrato seco e umidade. Na Tabela 8, é possível observar a perda percentual de peso nos cinco tratamentos.

Tabela 8: Perda percentual de peso dos queijos do início ao final da maturação.

Tratamento	**Perda de peso (%)**
QLPSP*	16,14 %
QLPSP**	33,65 %
QLPCP	16,26 %
QLCCP	17,04 %
QLCSP	23,16 %

QLPSP*: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico com cloreto de cálcio.QLPSP**: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico sem cloreto de cálcio. QLPCP: Queijo com leite pasteurizado com probiótico.QLCCP: Queijo com leite cru e probiótico. QLCSP: Queijo com leite cru sem probiótico.

O tratamento térmico também influenciou a perda de umidade, os queijos sem pasteurização apresentaram peso maior, já os pasteurizados apresentaram menor peso. Quando comparadas às demais formulações, os tratamentos com a adição de *L.acidophilus* apresentaram maiores valores de peso e menor perca de umidade.

O teor de umidade do queijo, além de afetar sua consistência, tem grande influência sobre as modificações físico-químicas que ocorrem ao longo da maturação (JOHNSON, 1998). Essa perda de água observada nos queijos tipo *brie* pode ser explicada pela falta de controle de umidade relativa no interior da câmara de maturação, que ocasionou uma possível alteração da proteólise dos queijos, interferindo na textura e umidade, através da quebra da rede de proteínas, aumentando o pH e conferindo maior ligação da água com grupo carboxil e amino (BARROS, 2001).

O queijo tipo *brie* é um queijo macio, de alta umidade e que apresenta maturação extremamente complexa. Nos queijos produzidos a proteólise pode ser afetada pela falta de controle de umidade na maturação, pelas enzimas naturais do leite (formulações obtidas com leite cru), pelas enzimas produzidas pela cultura lática iniciadora, pelo coagulante e também pelas enzimas produzidas pela presença do fungo *Penicillium candidum* que tem atividade proteolítica intensa e confere ao queijo suas características de aroma e sabor (GRIPON, 1993).

Embora não tenha nenhum estudo disponível na literatura que tenha acompanhado a maturação de queijo tipo *brie,* a falta de controle de umidade relativa na câmara de maturação evidencia a necessidade desse ajuste na maturação dos queijos, e preconiza a solução desta problemática, pois algumas das características sensoriais e bioquímicas dos produtos obtidos foram comprometidas.

4.8 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO

Observou-se durante o processo de dessoragem que a mexedura exerceu influência significativa no rendimento dos queijos. Os queijos obtidos com leite pasteurizado foram os primeiros a serem processados e foram submetidos à leve mexedura de cinco minutos, como preconiza a legislação. À medida que a coalhada era mexida os grãos formados na coagulação se desprendiam do soro e se desmanchavam. Como os queijos não sofreram prensagem em seu processo, houve grande perda da firmeza da coalhada influenciando no rendimento destas formulações. As demais formulações obtidas com leite cru não foram submetidas a mexedura, pode-se observar que os grãos não se desmancharam tanto quanto as formulações iniciais submetidas a mexedura.

O rendimento dos queijos em litros de leite necessários para a elaboração de um quilo (L/kg) pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9: Rendimento dos queijos tipo *brie* obtidos (L/kg) após 30 dias de maturação.

Tratamento	**Rendimento (% m/m)**

QLPSP*	32,92 %
QLPSP**	33,17 %
QLPCP	50,24 %
QLCCP	71, 21 %
QLCSP	66, 34 %

QLPSP*: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico com cloreto de cálcio.QLPSP**: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico sem cloreto de cálcio. QLPCP: Queijo com leite pasteurizado com probiótico. QLCCP: Queijo com leite cru e probiótico. QLCSP: Queijo com leite cru sem probiótico.

O rendimento dos queijos obtidos em gramas de sólidos totais de queijo por litro de leite (g ST/L) está disposto na Tabela 10.

Tabela 10: Rendimento dos queijos tipo *brie* obtidos (g ST/L) após 30 dias de maturação.

Tratamento	**Rendimento (g ST/L)**
QLPSP*	18,86
QLPSP**	26,76
QLPCP	32,98
QLCCP	51,84
QLCSP	46,37

QLPSP*: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico com cloreto de cálcio. QLPSP**: Queijo com leite pasteurizado sem probiótico sem cloreto de cálcio. QLPCP: Queijo com leite pasteurizado com probiótico. QLCCP: Queijo com leite cru e probiótico. QLCSP: Queijo com leite cru sem probiótico.

A partir dos resultados descritos nas Tabelas 8 e 9, foi possível constatar que queijos obtidos com leite cru (46,37 g ST/L) apresentaram rendimento maior em relação ao pasteurizado (26,76 g ST/L) devido a diversos fatores inerentes ao tratamento térmico e ao processamento do produto. A adição da cultura probiótica interferiu no rendimento dos queijos positivamente, tanto o obtido com leite cru (51,84 g ST/L) quanto o obtido com leite pasteurizado (32,98 g ST/L), sendo estes os que apresentaram maiores rendimento em relação às demais formulações.

O rendimento em base úmida não indica o valor real do rendimento em substâncias do leite retidas no coágulo, ou seja, um alto teor de umidade pode determinar um alto rendimento úmido, o que não significa que o coágulo contenha alta concentração de matéria seca (VASCONCELOS, 2004).

Estudos de diversos autores relatam que em decorrência da proteólise não específica em níveis elevados, pode-se observar uma diminuição do rendimento dos queijos além de alterações reológicas e sensoriais. Essa diminuição no rendimento seria reflexo da perda de gordura para o soro e perda de substâncias nitrogenadas (EMMONS, 1990; USTUNOL e HICKS, 1990; LOPEZ, 1997). De acordo com Lima, Magalhães e Abreu (1996), uma maior atividade proteolítica do coagulante pode proporcionar um menor rendimento na massa do coágulo.

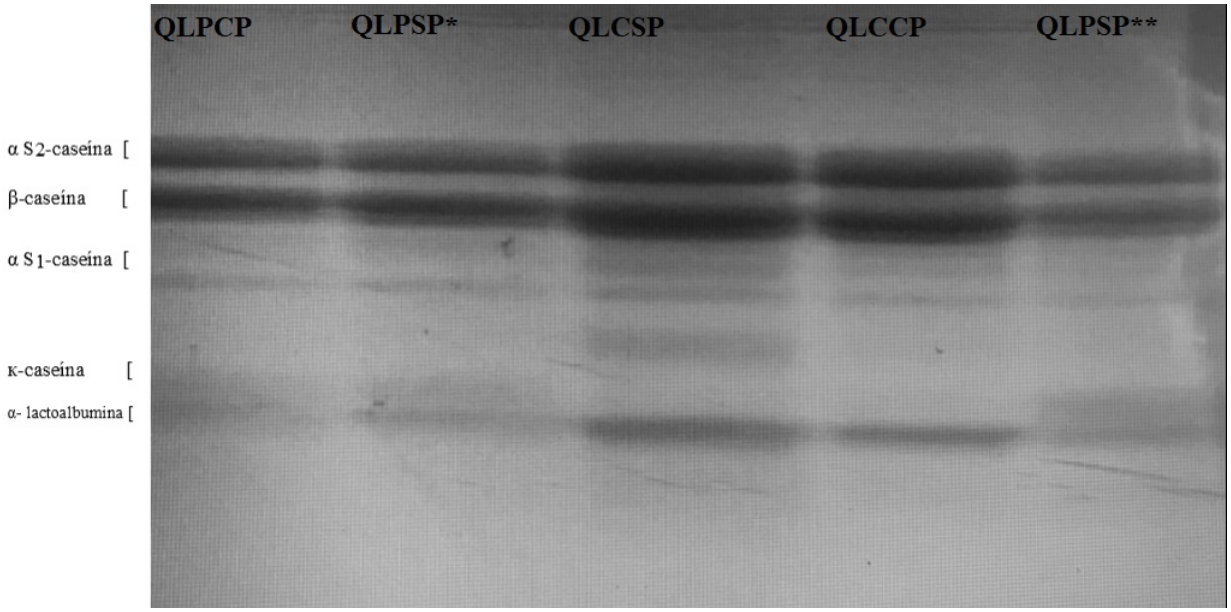
Diferenças de rendimento observadas em queijos fabricados com leite pasteurizado por diferentes sistemas são de grande interesse prático e econômico para a indústria de laticínios. Os principais fatores que influenciam no rendimento dos queijos são: a composição do leite, principalmente a quantidade de gordura e caseína, a porcentagem de transição dos constituintes do leite para queijo e a quantidade de umidade retida no queijo, além da incorporação de sais insolúveis e concentração de sal (NaCl) adicionado à massa (SILVEIRA e ABREU, 2003). Além desses fatores, de acordo com Folegatti (1994), os tratamentos térmicos e mecânicos aplicados ao leite e ao coágulo durante o processamento influenciam de modo sensível no rendimento. O que justifica o fato dos queijos obtidos com leite com tratamento térmico apresentar menor rendimento no presente estudo.

4.9 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO

As frações protéicas dos cinco queijos *brie* obtidos, analisados por eletroforese, estão ilustradas na Figura 10. As frações de caseínas encontradas e seus respectivos pesos moleculares em maior abundância nos queijos foram identificadas como: α S_1-caseína (23,61 kDa), α S_2-caseína (25,23 kDa), β-caseína (23,98 kDa), κ-caseína (19,02 kDa) e α-lactoalbumina (14,2 kDa).

Figura 10: Perfil eletroforético das amostras de queijos obtidas.
QLPCP: Queijo leite pasteurizado com probiótico. QLPSP*: Queijo leite pasteurizado sem probiótico. QLCSP: Queijo leite cru sem probiótico. QLCCP: Queijo leite cru com probiótico. QLPSP**: Queijo leite pasteurizado sem probiótico e sem cloreto de cálcio.

Pode-se observar diferenças distintas das amostras de queijos obtidos com leite



pasteurizado e com leite cru. As amostras de queijo com leite cru apresentaram bandas com coloração mais intensa e mais concentrada. Tal fato pode ser resultado da interação das proteínas induzidas termicamente ou dos próprios microrganismos presentes nas culturas láticas. As proteínas do queijo ficaram muito bem dispostas e separadas nos géis, confirmando a eficácia da técnica para esta função.

Fragmentos de α S_1, α S_2, β-caseína e κ-caseína são referidas na literatura como as principais proteínas do queijo, originadas da hidrólise da caseína pela ação da quimosina, enzima coagulante, utilizada durante a fabricação do queijo (JIN et al., 2016).

As bandas referentes aos fragmentos de α S_1, α S_2, β-caseína e α-lactoalbumina foram mais intensificadas com os queijos obtidos sem tratamento térmico (QLCSP e QLCCP), bandas referentes ao fragmento κ-caseína foram mais intensificadas com queijos obtidos com tratamento térmico (QLPCP, QLPSP* e QLPSP**). Ao comparar as amostras que tiveram a adição do probiótico com e sem tratamento térmico, observa-se que a adição do probiótico aumentou a intensidade das frações protéicas evidenciando que o probiótico *L. acidophilus* influenciou positivamente no perfil protéico dos queijos obtidos.

Pode-se observar ainda que as amostras com a adição de cloreto de cálcio apresentaram bandas protéicas mais unidas e intensas. A amostra (QLPSP**) apresentou menor intensidade em todas as frações protéicas, podendo deste modo afirmar que a adição do cloreto de cálcio exerce boa influência no perfil protéico dos queijos.

Silva et al., (2016) ao analisarem eletroforeticamente queijo coalho produzidos em diferentes cidades da região agreste do estado de Pernambuco relatam a presença de bandas

que correspondiam a β-lactoglobulina, α-lactoalbumina, α S_1, α S_2, β-caseína. O mesmo pode ser observado por Lima et al., (2017) que, ao investigar se os peptídeos extraídos de queijo coalho artesanal, identificaram as mesmas frações protéicas identificadas neste estudo e concluíram que as mesmas apresentavam atividades antimicrobianas.

Como características destas frações protéicas, a α-lactoalbumina é bastante rica em triptofano (6%), um aminoácido precursor de niacina, sendo também rica em lisina, leucina, treonina e cistina, além de possuir capacidade de se ligar a minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção. Apresenta ainda atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonial* (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016). De acordo com Pereira et al., (2016) as frações α S_1, α S_2, β-caseína e a κ-caseína possuem propriedades funcionais características, apresentam sensibilidade a precipitação de cálcio, melhor coagulabilidade do leite, melhoram o rendimento e apresentam atividade antimicrobiana.

5 CONCLUSÕES

- O leite utilizado apresentou características físico-química e microbiológica de acordo com o estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, apresentando teor de gordura e de proteína maior que o estabelecido, sendo estas características importantes para qualidade e rendimento do queijo.
- O baixo teor de umidade apresentado pelos queijos tipo *brie* após trinta dias de maturação afetou a qualidade bioquímica e a textura dos queijos obtidos, sendo recomendado embalar os queijos no 10º dia de maturação.
- A adição da cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* aumentou o rendimento dos queijos e a intensidade das frações protéicas no perfil eletroforético, exercendo influência positiva nos queijos obtidos.
- Todos os ensaios de queijo tipo *brie* desenvolvidos apresentaram viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* acima do mínimo recomendado, os lactobacilos estavam presentes nas amostras de queijos obtidos com leite cru e leite pasteurizado em números elevados, na ordem de 10^7 UFC/g.
- A utilização dos meios de cultura alternativos (ST e ST modificado) para quantificação da cultura de *Lactococcus lactis* mostraram ser tão eficientes quanto o meio tradicional (M17), sendo os meios alternativos os de menor custo.
- A adição da solução do cloreto de cálcio melhorou o perfil protéico (teor de proteínas e intensificação das bandas protéicas no perfil eletroforético) e o rendimento dos queijos, propiciando bons resultados quando adicionados a fabricação dos mesmos.
- Os queijos obtidos com leite sem tratamento térmico apresentaram melhor rendimento, textura, aroma e características físico químicas satisfatórias, no entanto, a caracterização microbiológica indica que mesmo com a adição do probiótico *L. acidophilus* produzindo ácido nos queijos e inibindo a presença de microrganismos patogênicos houve a identificação de coliformes termotolerantes nos mesmos. Pela segurança do consumidor o recomendado seria a obtenção de queijos com o leite com tratamento térmico. A implantação de um sistema de Boas Práticas de Fabricação seria eficiente para resolver a problemática, tornando possível a obtenção de um produto seguro.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, E. A. M.; SOHER, E. A.; SALEH, Y.; MARY, S.; AMAL, S. H. Probiotic bacteria as a tool to produce high quality and safe ras cheese. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 36, n. 1, p.97-109, 2008.

ADAMS, R. R.; MOSS, Y.M.O. **Food microbiology.** Cambridge: Royal society of chemistry, 2000.

ADITIVOS E INGREDIENTES. As proteínas lácteas e a saúde. Proteínas lácteas. **Revista Aditivos e ingredientes.** editora Insumos Ltda, p. 20-26, São Paulo, 2016.

AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Queijo *Brie*.** 2012 Disponível em: <http://www.agriculturaepecuaria.com.br/joomla/index.php?option=com_contenteview=articleid=444>. Acesso em 24 de Janeiro de 2019.

ALBENZIO, M.; CORBO, M. R.; REHMAN, S. U.; FOX, P. F.; ANGELIS, M. D; CORSETTI, A; SEVI, A.; GOBETTI, M. Microbiological and biochemical caracteristics of canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey.**International Journal of food Microbiology**,v. 67, n.1,p. 35 -48, 2001.

AOAC. Association of official analytical chemists.**Official methods of analysis.**18 th Edition, Gaithersburg, USA, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS – ABIQ. **Técnicas e boas práticas na produção de queijo.** São Paulo: ABIQ, 2011.

AZEREDO, H. M. C. Fundamentos de estabilidade de alimentos. **Embrapa Agroindústria Tropical,** 195 p., Fortaleza, 2004.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. São Paulo, 208p., 1998.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL - BAM. **Methods for specific pathogens**, 2020.

BARROS, J. J. C. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 285-294, 2001.

BENEVIDES, S. D.; TELLES,F. S. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; RODRIGUES, M. C. P. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **B.Ceppa,** Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-208, 2000.

BERESFORD, P. T.; FITZSIMONS, A. N.; BRENNAN, L. N.; COGAN, M. T. Recent advances in cheese microbiology. **Internacional Dairy Journal.**v.11, p. 259 – 274, 2001.

BEVILAQUA, G. C.; MENEZES, M. U. F. O.; XIMENES, G. N. C.; NASCIMENTO, I. R. S.; PEREIRA, E. F. S. Queijo fresco artesanal de leite caprino com Lactobacillus acidophilus: avaliação do crescimento de bactérias láticas. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.4, p. 21214-21231, Curitiba, 2020.

BEZERRA, K. F. **Focus group na avaliação da percepção do consumidor sobre queijo minas artesanal.** Dissertação apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais. 64p., 2018.

BLACK, G. J. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by *bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.8-15, 1996.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Arch. Latinoamericanos de Nutricion.** V. 57, n. 4, p. 373- 380, 2007.

BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Cheese as probiotic carrier: technological aspects and benefits. In: HUI, Y.H.; EVRANUZ, E.Ö., eds. **Handbook of animal-based fermented food and beverage technology.** 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2, v.1, cap. 44, p.749-784., 2011.

BUTEL, M. J. Probiotica, gut microbiota and health. **Med. Maladies Infect**., 44 (1), 1-8, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional 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 União***, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui, junto à Câmara Técnica de Alimentos, comissão de assessoramento de alimentos funcionais e novos alimentos. ***Diário Oficial da União***, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2., 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**, 278p., 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. ***Diário Oficial da União***, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. ***Diário Oficial da União***, Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do abastecimento e da reforma agrária. Instrução Normativa nº 62. Regulamento técnico de produção de identidade e qualidade de leite crurefrigerado, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. ***Diário oficial da união,***29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Decreto Nº 9.013, de 29 deMarço de 2017. Fiscalização e inspeção industrial e sanitária de

produtos de origem animal. ***Diário Oficial da União,*** ed. 62. seç 1, p. 3, Brasília- DF ., 30 de Março de 2017.

BRASIL. Lei Nº 13.8860, de 18 de Julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. ***Diário oficial da União***, Secretaria geral 198º da Independência e 131º da República, Brasília-DF, 2019.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota lática de queijos artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical,** ISSN 1677-1915 documento 124, Fortaleza - CE, 2009.

CAMPOS, S. A. S. **Caracterização sensorial e microscópica de queijo tipo *camembert* elaborado sem mexedura e com adição de concentrados lácteos protéicos.** Dissertação-UFLA, Lavras, 2016.

CARDARELLI, H. R. **Desenvolvimento de queijo *petit – suisse* simbiótico.** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímica – Farmacêutica. 133p. São Paulo, 2006.

CARVALHO, M. M. **A agroindústria familiar rural e a produção de queijos artesanais no município de Seara, estado de Santa Catarina - Um estudo de caso**. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Manual básico de controle de qualidade de leite e derivados.** São Paulo: cap, 2011.

CERRI, C. Queijos: artesãos do futuro. **Globo Rural,** São Paulo, v. 17, n. 200, p. 37-46, 2002.

CHAVES, K. S. Avaliação da maturação e perfil sensorial de queijos Prato probióticos tipo lanche adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb - 12. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 115p, 2014.

CODEX ALIMENTARIUS.Standard for *Brie*.**Codex Stan 277**, 1973.

COSTA, W N. **Análise físico-química de queijo minas padrão comercializados em feiras livres na cidade de Goiânia.** Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Estadual de Goiás, UnCET, Goiânia, 2012.

DANTAS, A. B., JESUS, V. F., SILVA, R., ALMADA, C. N., ESMERINO, E. A., CAPPATO, L. P. Manufacture of probiotic Minas frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science,** 99(1), 18–30., 2016.

DINEV, T.; BEEV, G.; DENEV, S.; DERMENDZHIEVA, D.; TZANOVA, M.; VALKOVA, E. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against patogenica and foods poilage microrganisms: a review. **Agricultural science and technology,** v. 9, n.1, p. 3-9, Bulgária, 2017.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios.**Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável** (RBAS), v. 2, p. 2-34, 2013.

DUARTE, M. C. K. H.; CORTEZ, N. M. S.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de bactérias láticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16; p 25-36, 2013.

DURR, J.Y.; FONTANELI, R. S.; BURCHARD, J. F. **Fatores que afetam a composição do leite.** In: KOCH – HANN, R. A; TOMM, G. O.; FONTANELI, R.S. **Sistema de produção de leite baseado em pastagens sob plantio direto.** Passo Fundo: Embrapa trigo, Juiz de Fora: Embrapa gado de leite; Bagé: Embrapa pecuário sul, Montividéu: Procisur. p.135-156, 2000.

ENGELMANN, B.; HOLLER, P. **Manual del gourmet del queso**. Traducción del alemán: Katinka Roses Beccker; Sergio Martin; Carla Parra: H. F. Ullmann, 600p., 2008.

EMBRAPA. Processamento do queijo de coalho fabricado com leite de cabra maturado e defumado. **Comunicado Técnico, prática e processo agropecuário.** ISSN 1676-7675, Sobral - CE, 2008.

EMMONS, D. B. Milking clotting enzymes. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making.**Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2016- 2021, 1990.

FAGAN, E. P. **Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química, microbiológica e toxicológica do leite produzido em duas granjas produtoras de leite tipo "a" no estado do Paraná.** Tese de doutorado em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2006.

FLIMELOVA, E.; KNAZOVICKA, V.; CANIGOVA, M.; BENCZOVA, E. Changes in quality of fresh cheese using dressing with and without probiotic culture during storage. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n.1, p. 51-57, 2013.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo "coalho" artesanal fabricado em Jucati-PE.**Extensio – Revista Eletrônica de extensão.** v.6, n.8, p.35-49, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutrional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 34 p., 2001.

FOLEGATTI, M. L. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* (var. awamori) na fabricação do queijo tipo Prato**. 1994. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOPPA, T. Análises físico-químicas do leite em pó comparado ao leite *UHT* integral.**R. Divulg. Cient.**, Mafra, v. 16, n. 1, 2009.

FOX, P. F.; LAW, J. Enzimology of cheese ripening. **Food Biotecnology**, v.5, n.3,p. 239-262, 1991.

FOX, P.F.; P.L.H. McSWEENEY.Dairy Chemistry and Biochemistry. **Blackie Academic and Professional Publishers,** London, 478 p. 1998.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen, 587p., 2000.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.Volume 1. General Aspects. Published by **Elsevier Academic Press.** 3 ed. 617p, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2008.

FREIRE, M. F. **Análises das características físicoquímicas de leite cru refrigerado entregue em uma cooperativa no estado do Rio de Janeiro no ano de 2002**. Monografia (pós-graduação) – Curso de pós-graduação "Lato sensu" em Higiene e Inspeção em Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

FURTADO, M. M. **Quesos Típicos de Latinoamérica**. (1ª ed., 192p.) São Paulo: Fonte Comunicações e Editora. 2005.

FURTADO, M. M. **Caracterização histórica. Tecnologia de fabricação, características físico químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo reino.** Dissertação – Universidade Federal de Lavras, 2008.

FURTADO, M. M. **Queijos duros.** 1ª Ed. São Paulo – Brasil: Setembro Editora, 2011.

GALLI, B. D. **Perfil de peptídeos de queijo tipo *camembert*: efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta *Lactobacillus rhamnosus GG*.** Dissertação mestrado– Universidade Estadual de Campinas, FEA – Campinas, SP, 136p., 2018.

GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. **Food Science and Technology,** v. 64, n.1, p. 508-513, Nov., 2015.

GIANNINO, M. L. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. **Int. J. Food. Microbiol**., v. 130, p. 188-195, 2009.

GOETZKE, B.; NITZKO, S.; SPILLER, A. Consumption of organic and functiona food. A matter of well-being and health?**. Appetite,** 77, 94-103, 2014.

GOVENDER, Y.; AVENANT, C.; VERHOOG, N. J.; RAY, R. M.; GRANTHAM, N.J.; AFRICANDER, D.; HAPGOOD, J.P. The injectable only contraceptive Medroxyprogesterone acetate, unlike Norethisterone acetate and Progesterone, Regulates Inflammatory genes in endocervical cells via the glucocorticoid receptor. ***PLOS One***, 9 (5) e96497, 2014.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A.; NAZZARO, F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety**, 9, 292- 302., 2010.

GRIPON, A. **Mould-ripened cheeses**. In. **Cheese: chemistry, physicsand microbiology**. vol. 2.p 111-136. (Ed. PF FOX). London, Unitedkingdom: Champman e Hall, 1993.

GUIMARÃES, P. C. M. **Isolamento e caracterização bioquímica de culturas lácticas obtidas do queijo marajoara.** Dissertação – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 64 p, 2011.

HENÃO, J. D.; QUEIROZ, M. R.; HAJISA, N. M .A. Umidade de equilíbrio de café cereja descascado baseadas em métodos estático e dinâmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** v.13, n.4, p.470-476, 2009.

HENNESSY, M. **What´s driving growth in functional food and beverages? A convergence of nutrition, convenience and taste.** (2013) Disponível em: < http://www.nutraingredients-usa.com/Markets/What-s-driving-growth-infunctional-food-and-beverages-A-convergence-of-nutrition-convenience-and-taste>. Acesso em 29 de Junho de 2020.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews gastroenterology e hepatology**, 11, 506 - 514, 2014.

HORNE, D. S., BANKS, J. M. Rennet induced coagulation of milk. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P. L. M.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: chemistry, physics and microbiology – general aspects.** 3 ed. London: Chapman e mall, 2004.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico - químicos para análise de alimentos.** 4. ed. Brasília., 2005.

ISO 20128: 2006. **Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – colony- count technique at 37 ºC**. IDF 192: 2006.

JIN, Y.; YU, Y.; QI, Y.; WANG, F.; YAN, J.; ZOU, H. Peptide profiling and the bioactivity character or yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Proteomics, Valencia**, v. 141, p. 24-46, 2016.

JOHNSON, M. E. Cheese Chemistry – Part II. In: WONG N. P.; JENNESS R.; KEENEY M. **Fundamentals of dairy chemistry**. New York: Third Edition. Van Nostrand Reinhold. p. 634-654., 1998.

JUDACEWSKI, J. **Qualidade de queijo tipo *Camembert*: culturas primáriase inóculo de micélio micro fragmentado.** Dissertação do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 83f. Ponta Grossa, 2015.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*.. **Immunology and Cell Biology**, v. 778, n.1, p. 80-88, 2000.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science & Technology,** v. 91, n. 3, p. 283-308, 2011.

KHEMARIYA, P.; SINGH, S.; NATH, G.; GULATI, A. K. Probiotic *Lactococcus lactis:* A Review. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, 5(6): 556-562, 2017.

KOLOZYN - KRAJEWSKAA, D.; DOLATOWSKI, Z. J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochemistry (Barking, London, England),** 47, 1761 - 1772, 2012.

KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS V.; KALLIS M.; BEZIRTZOGLOU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochem.**, v. 40, n.1, p. 411- 416, 2005.

KUMAR, A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus*. **Journal of food science and technology,** 53 (1), 667 - 675, 2016.

KROLOW, A. C. R.; RIBEIRO, M. E. R. **Obtenção de leite com qualidade e elaboração de derivados.** Documentos 154 Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 66, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680 -685,1970.

LARONE, H. D. **Medically important fungi. A guide to identification.** 4 th edition, p. 304, 2002.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese repening. In: FOX, P. F., edcheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: **Elsevier applied science**, v.1, p. 365 -400, 1987.

LECLERCQ-PERLAT, M. N.; BUONO, F.; LAMBERT, D.; LATRILLE, E.; SPINNLER, H.; CORRIEU, G. Controlled productions of *camembert* type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. **Journal Dairy Res**. v. 71 (3), p. 346 – 354, 2004.

LE DRÉAN, G.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; ARZUR, D.; HABRYLO, O.; BARBIER, G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, n. 138, p. 100–107, 2010.

LEITE, Z. T. C.; VAITSAMAN, D. S .; DUTRA, P. B.Leite e alguns de seus derivados da antiguidade à atualidade. **Química Nova**. v. 29, n.4. p. 876-880, 2006.

LIMA, K. G.; MAGALHÃES, A. R.; ABREU, A. C. Atividade coagulante de leite e proteolítica de coagulante microbiológico e coalho genético – Influência do pH, temperatura e $CaCl_2$. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 1, p. 11-14. 1996.

LIMA, M. H. P.; TELLES, F. I. S.; MACEDO, B. A.; BENEVIDES, S. D. Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *Streptococcus thermophyllus* e *Lactobacillus bulgariais*: aspectos bioquímico e sensorial. **Boletim centro de pesquisa e processamento de alimentos,** v.16, n.1, p. 37-44, 1998.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência e Saúde,** Porto Alegre, v.7, n.1, p. 27-34, 2014.

LIMA, M. S. F.; SILVA, R. A.; FILHO, J. L. L.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Queijo de Coalho artesanal: fonte alternativa de peptídeos antimicrobianos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, n. 0, p. 1-7, 2017.

LÓPEZ, M. B.; JORDÁN, M.J.; HELLIN, P.; CASTILLO, M.; LAENCINA, J. **Kinetics of k-casein hidrolysis by different rennets and coagulant enzymes in Murciano-Granadina goat milk.**Milchwissenschaft, v. 52, n.7, p. 370 – 373. 1997.

LOURENÇO NETO, J. P. M. Uso de culturas láticas na fabricação de Minas Frescal com alternativa de melhoria de qualidade. In: **Seminário Internacional Queijos Frescos**, 1., Atibaia, SP. p.59-75.,1998.

MARGALHO, L. P. **Bioprospecção do potencial tecnológico, probiótico e avaliação da segurança de bactérias láticas endógenas de queijos artesanais brasileiros.** Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2020.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. **A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?** Functional foods in health and disease, 5 (6), 209-223, 2015.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2014.

MATOS, I. A. F.; GONÇALVES, C. A. A.; SILVA, A. M.; LACERDA, L.; JERÔNIMO, M. **Efeito do uso de Cloreto de Cálcio nos aspectos sensoriais do queijo minas frescal.** Relatório técnico apresentado por discentes e docentes do curso superior de Tecnologia de Alimentos, Uberaba - MG, 2015.

MEDEIROS JÚNIOR, F. C.; PEREIRA, I. C.; BORBA, K. K. S.; MIRANDA JÚNIOR, R. N. C.; MOREIRA, R. T.; SANTOS, E. P. Viabilidade das culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* adicionadas ao queijo de coalho.**Res., soc. dev,**8 (5): e2885986 ISSN 2525 - 3409, 2019.

MELLO, 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.**Arquivos do Instituto de Biológico,** São Paulo, v.76, n.4, p.547-551, 2009.

MENEGON, T. **Avaliação dos parâmetros de qualidade de queijo mussarela obtido a partir de leite armazenado e leite fresco**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; PAUS-DELBES, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIRES, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p.136-154, 2014.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae;** 33(3): 259-264, 2005.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. M. P. Queijo de coalho. Coleção Agroindústria Familiar - Agregando valor a pequena produção. **Embrapa Informação Tecnológica,** 40 p., Brasília - DF, 2006.

PACHECO, M. S. **Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: caracterização da qualidade e do sistema de produção.** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência *in vitro.*** Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímica - Farmacêutica, 122p.. São Paulo, 2013.

PEHRSON, M. E. S. F. **Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de queijo artesanal das terras altas da Mantiqueira.** Tese de doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2017.

PEREIRA, A. C. P. **Características físicas, químicas e microbiológicas de queijos tipo *brie* e tipo *camembert* produzidos no Brasil.** Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2014.

PEREIRA, M. J.; LIMA, C. S.; BUENO, C. P.; NEVES, B. S.; COELHO, K. O. O rendimento de queijo muçarela em função do teor de caseína acima de 80%. **IV Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG.** Universidade Estadual de Goiás, Goiás, 2016.

PEREIRA, A.C. P.; JUDACEWSKI, P.; COELHO, G.; SALEM, R. D. S.; MARINHO, M. T.; ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA. A. Assessment os physochemical, textural and microbiological properties of brazilian white mold surface-ripened cheeses: a technological approach. **Ciência Rural**, v.50:1, e20190595, Santa Maria, 2020.

PEROTTI, M.; WOLF, I.; ADDIS, M.; COMUNIAN, R.; PABA, A.; MEINARDI, C. Incorporation of probiotic bacteria (Lactobacillus and Bifidobacterium spp.). In Argentiea novine cheese. **Dairy Science and Technology,** v.94, n.94, p.225-267, 2014.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.Revista **Quím. Nova,** Vol. 27, Nº. 2, 293-300, 2004.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C .D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**; 26 (3): 645-51, 2006.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos – GO. **Rev. Bras. Saúde Prod. Animal**, v. 8, n.3,p. 205-211, 2007.

OLIVEIRA, G. GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos ennutrición clínica. **Endocrinología y Nutricíon**, v. 63, n. 2, p. 482-494, 2016.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos.** v.2. São Paulo: Artmed, 2005.

OTTE, J.; ARDO, Y.; WEIMER, B.; SORENSEN, J.; BULL. In. Dairy Federation 1999, 337, 10; Izawa, N.; Izumi, T.; Asakawa, S.; Hayashi, K. J.; Jpn. **Soc. Food Sci. Technol.** 1997, 44,

871; **resumos publicados em Food Sci. and Technol.**Abstracts – FSTA. Current 1990-2003/01. Disponível em: <http:// www.periodicos.capes.gov.br>.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International,** v. 43, p. 1-7, 2010.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. American **Journal of Clinical Nutrition**, v. 73. p. 437s- 443s, 2001.

RENNER, E. Nutritional aspects of cheese. In: FOX, P. F., Ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects.**London: Elsevier science**, v.1, p. 345 – 363.,1987.

REVISTA BALDE BRANCO. **"Recuo na produção de queijos".** Reportagem publicada em 2019 no portal eletrônico da revista rural do setor leiteiro. Desenvolvido por Revista Digital *on line* de autoria não identificada, São Paulo, 2019.

REYNOLDS, T.; MARTIROSYAN, D. M.Nutrition by desing: a review of biotechnology in functional food of plant origin**. Functional food in health and disease,** 6 (2), 110-120, 2016.

RHEINHEIMER, V.; V.; DÜRR, J. W.; HEPP, M .A. W.; MORO, D. V.; JACOBS, M. R. C.; ANTONI, V. L.; SAGGIORATTO, M. A.; DAL'MASO, G. DE A.; RODRIGUES, L. B.; SOARES, J.; DORO, C.; BENEDETTI, S.; FONTANELI, R. S. Qualidade do leite fluído de diferentes marcas comercializadas em Passo Fundo. In: **Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, 2., Anais. Goiânia, 2006.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., v. 29, p.19-23, 2009.

RIBEIRO, J. C. B. **Avaliação da qualidade de queijos maturados por *Penicillium candidum***. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. In: DUWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª Ed. Washington, D. C.: **American Public Health Association**, cap. 47. P. 483-493, 2001.

RODRIGUES, F. **"Da Dinamarca para Minas Gerais: como o toque europeu mudou a forma de fazer queijos".** Reportagem publicada no G1 Sul de Minas/Portal Minas dos queijos em 03 de Junho de 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/06/03/da-dinamarca-para-minas-gerais-como-o-toque-europeu-mudou-a-forma-de-fazer-queijos.ghtml>. Acesso em: 02 de Julho de 2020.

ROSSI, D. A. Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na composição e rendimento do queijo Minas frescal. **Rev. ICLC**, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 8-14, set./dez. 1998.

RUGGIRELLO, M.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Detection and viability of *Lactococcus lactics* throughout cheese ripening. ***PLOS one***, 9(12): e114280, 2014.

SAARELA, M.; MOGENSEN,G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA- SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197 – 215, 2000.

SABOYA, L. V. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas frescal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 368-376, out./dez. 1998.

SALES, G. A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** Dissertação de mestrado apresentado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas frescal disponível no mercado.** 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

SANTOS, N. A. F.; RIBEIRO, A. C.; LIMA, M. F.V.; GALVÃO, N. R.; VIEIRA, M. M.; SILVA, M. I. S.; TENÓRIO, T. G. S. Avaliação da composição e qualidade físico química do leite pasteurizado e comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arg. Inst. Bio,** São Paulo, v.78. n.1, p-109-113, 2011.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; SILVA, C. B. SORIANI, H. H.; BASTOS, J. O.; MOTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viablidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **CiênciaRural,** 45 (7), 1342 - 1347, 2015.

SILVA, R. A.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M do. C.; PORTAL, A. L.; CAVALCANTI, M. T, FILHO, J. L. Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal 'Coalho' cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, EUA, v. 96, n. 13, p. 4337-4344, 2016.

SILVA JÚNIOR, F. J. T. M. **Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios do agreste paraibano.** Trabalho de Conclusão de Curso – UFPB, Areia, 2017.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e Composição Físico-Química do Queijo Prato Elaborado com Leite Pasteurizado pelo Sistema HTST e Injeção Direta de Vapor. **Revista Ciências Agrotécnicas.** Lavras. V.27, n.6, p.1340-1347, nov./dez., 2003.

SPINNLER, H. -E. Surface mold–ripened cheeses. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P.F.; PAUL, D.; COTTER, P. D.; EVERETT, D.W. (Eds). **Cheese: chemistry, physics and microbiology,** 4th ed., pp.911-928. London: Academic Press, 2017.

SOARES, L.; RODRIGUES, F. **"Com 25% da população nacional, MG aposta no queijo como saída para crise e geração de renda".** Reportagem publicada no G1 Sul de Minas em 20 de Maio de 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/05/20/com-25percent-da-producao-nacional-mg-aposta-no-queijo-como-saida-para-crise-e-geracao-de-renda.ghtml>. Acesso em 27 de Junho de 2020.

SOCCOL, C. R.;, VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R., MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. The Potential of Probiotics. **Food Technology and Biotechnology**, 48 (4), 413-434, 2010.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal,** v. 11, n. 4-7, p. 327-345, 2001.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A. L.; HABJANIC, K.; MATOSIC,

S. Antimicrobial Activity- The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Fd Technol Biotechnol.**, 48(3):296-307, 2010.

SUZUKI, A.; GARCIA, B.; MORA, T. **Indústria de queijo *camembert*.** Relatório Técnico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

STANTON, C. Market potential for probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition,** Houston, USA, v. 73, n. 3, p. 476-483, 2001.

STIVAL, I. P. **Estudo do tempo mínimo de maturação do queijo Minas artesanal do Cerrado.** Trabalho de Conclusão de Curso em Graduação de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2016.

TONELLI, G. **Avaliação tecnológica dos processos de pasteurização do leite para produção de queijo minas frescal.** Dissertação de mestrado apresentado no Instituto Federal do Triângulo Mineiro, 58p., Uberaba - MG, 2013.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of function foods**, (9)- 225-241, 2014.

U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Agricultural Research Service. USDA. **Nutrient Database for standard Reference**, Release 14. 2001.

U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Agricultural Research Service. USDA. **Livestock, Dairy, and Poultry Monthy outlook: february 2020,** LDP- M- 308, fevereiro, 2020.

USTUNOL, Z.; HICKS, C. L. Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with Endothia parasitica protease.**Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 1, p. 17-25. 1990.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Journal Pediatr**., 91, 6-21, 2015.

VARGAS, P. O.; CORREA, K. P.; CONDÉ, J. L.; MARTINS, A. D. O.; SILVA, F. J. M. Desenvolvimento de queijo petit suisse probiótico adicionado de farinha de chia. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8, n.3, p. 71-87, 2017.

VASCONCELOS, M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. **Revista Brasileira Agrociência,** v. 10, n.4, p. 499-502, 2004.

VERNAM, A. H.; SUTHERLAND, J .P. **Milk and milk products**. London: Chapman e Hall, 1994.

VERNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos.** Zaragoza, Espanha, Editorial Acribia, S. A., 1995.

WALSTRA, P. WOUTERS, J. T. M., GEURTS, T. J. **Dairy science and technology.**2ª ed., Boca Raton, Florida: EUA, 781p., 2006.

YUNES, V. M.; BENEDET, H. D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina.**Ciência Tecnologia alimentar**, v.20, n.3. 2000.

ZEHNTNER, U. Behaviour of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in hard semi-hard cheese. **Agrarforschung**, v. 129, n. 2, p. 24-24, 2008.