

UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PARA AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DOS QUEIJOS MINAS PADRÃO E PRATO ADICIONADOS DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Use of infrared spectroscopy to evaluate the maturation of Minas Padrão and Prato cheeses added with probiotic bacteria

*Elaine Bernardo Pacheco¹, Camila Horta Gaudereto Rodrigues¹,
Juscinele Francisca Vieira Calsavara¹, Virgílio de Carvalho dos Anjos²,
Maria José Valenzuela Bell², Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior³,
Aurélia Dornelas de Oliveira Martins¹, Maurilio Lopes Martins^{1*}*

RESUMO

Dentre os queijos mais consumidos no Brasil, estão Minas Padrão e Prato. Objetivou-se discriminar esses queijos adicionados de bactérias probióticas dos queijos controle por Espectroscopia do Infravermelho ao longo da maturação. As culturas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* L10, *Lactocaseibacillus casei* L26 e *Bifidobacterium lactis* B94) foram adicionadas, individualmente, em quantidades de 10^8 células/mL de leite pasteurizado e os queijos foram elaborados. Também, foram produzidos queijos controle, contendo somente a cultura *starter*. A obtenção dos dados por Espectroscopia do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada (FT-MIR-ATR) e por Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) ocorreu nos tempos 0, 20, 40, 60, 80 e 100 dias nos queijos Minas Padrão e aos 0, 25, 50, 75 e 100 dias nos queijos Prato, sendo ambos armazenados entre 7 °C e 10 °C. Posteriormente, foi realizado o processamento dos dados e Análise de Componentes Principais. A técnica FT-MIR separou as amostras controle, principalmente, no tempo 0, das que continham os probióticos, mas não discriminou cada um deles e não diferenciou os tempos de maturação. Um dos fatores responsáveis pela limitação do poder discriminatório do FT-MIR

1 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/nº, Lindo Vale, 36180-000, Rio Pomba, MG, Brasil. E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

2 Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Física, Juiz de Fora, MG, Brasil.

3 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 16/08/2023

Aprovado / Approved: 07/02/2024

foi a heterogeneidade das amostras, revelada pelas diferenças em termos de intensidades relativas dos picos para cada espectro das triplicatas. Já a técnica FT-NIR só discriminou os tipos de queijo, mas não separou as amostras controle das que continham probióticos. Portanto, as técnicas de MIR e NIR apresentaram sensibilidade para identificar as diferenças entre os queijos, apresentando potencial para emprego no controle de qualidade de queijos adicionados de probióticos.

Palavras-chave: derivado lácteo; probiótico; FTIR; quimiometria.

ABSTRACT

Among the most consumed cheeses in Brazil are Minas Padrão and Prato. The objective of this work was to discriminate these cheeses added with probiotic bacteria from the control cheeses by Infrared Spectroscopy during maturation. The probiotic cultures (*Lactobacillus acidophilus* L10, *Lactocaseibacillus casei* L26 and *Bifidobacterium lactis* B94) were individually added in amounts of 10^8 cells/mL of pasteurized milk and cheeses were prepared. Also, cheeses without the addition of probiotics, control, containing only the starter culture were produced. The acquisition of data by Fourier transforms mid-infrared spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FT-MIR-ATR) and Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIR) occurred at times 0, 20, 40, 60, 80 and 100 days in Minas Padrão and at 0, 25, 50, 75 and 100 days in Prato, both cheeses being stored between 7 °C and 10 °C. Subsequently, data processing and Principal Component Analysis were carried out. The FT-MIR technique separated control samples, mainly, at time 0, from those containing probiotics, but did not differentiate maturation times. One of the factors responsible for limiting the discriminatory power of the FT-MIR was the heterogeneity of the samples, revealed by the differences in terms of relative peak intensities for each spectrum of the triplicates. The FT-NIR technique only discriminated against the types of cheese, but did not separate the control samples from those containing probiotics. Therefore, the MIR and NIR techniques showed sensitivity to identify the differences between the cheeses, showing potential for use in the quality control of cheeses added with probiotics.

Keywords: dairy products; probiotic; FTIR; chemometrics.

INTRODUÇÃO

Os queijos vêm sendo produzidos há séculos, sendo originalmente preparados por meio da coagulação do leite, seguida da dessoragem e salga (FRACASSO; PFÜLLER, 2014). Ao longo dos anos, o processo de fabricação passou por diversas evoluções visando a extensão da vida útil desse produto. Dentre os queijos mais consumidos no Brasil estão Minas Padrão e Prato (SIQUEIRA *et al.*, 2022). O Queijo Minas Padrão é tipicamente brasileiro, em sua produção a coalhada é cortada em grãos médios e sua maturação ocorre por um período mínimo de 20 dias. Possui vida útil entre dois e três meses, com riscos de apresentar sabor amargo. Esse queijo possui olhaduras mecânicas, sem gás, apresenta sabor ligeiramente ácido, aroma suave e cor branca amarelada (FURTADO, 2017).

O queijo Prato também é típico do Brasil e

destaca-se pela utilização no preparo de lanches rápidos e como ingrediente para sanduíches e outras preparações culinárias (COSTA *et al.*, 2018). É um queijo gordo, de média umidade e pode apresentar as seguintes denominações: Lanche ou Sanduíche; Cobocó e Esférico ou Bola. É um queijo de massa semi-cozida e lavada, de consistência semi-dura e de sabor suave. Pode ser encontrado no formato cilíndrico, retangular ou esférico e antes do consumo deve ser maturado por um período de no mínimo 25 dias (BRASIL, 1997).

Estudos indicam que o queijo é uma excelente matriz para veiculação de bactérias probióticas devido ao pH próximo a neutralidade, além do alto teor de proteína e de gordura que as protegem, reduzindo sua exposição direta a condições adversas no trato gastrointestinal (TGI). Durante a maturação, os queijos tornam-se mais anaeróbicos, favorecendo a persistência de

microrganismos probióticos (FLACH *et al.*, 2018).

As culturas probióticas proporcionam efeitos de promoção de saúde, como: controle de colesterol e equilíbrio da microbiota intestinal, estímulo do sistema imunológico, diminuição de sintomas alérgicos, melhoria na utilização de lactose e absorção de cálcio, síntese de proteínas e vitaminas, prevenção do crescimento de patógenos, melhorando o equilíbrio microbiano no cólon, reduzindo o risco de doenças infecciosas e o risco de diversos tipos de câncer, especialmente o câncer de cólon (DOMINGO, 2017; PUMPA *et al.*, 2019; ROSA *et al.*, 2022; REHMAN *et al.*, 2022). Destaca-se que o efeito do probiótico é dependente da estirpe utilizada.

Por outro lado, o metabolismo dos probióticos gera produtos que podem influenciar nas características sensoriais dos queijos durante o tempo de maturação e condições de armazenamento. A proteólise realizada por probióticos pode também produzir diferentes aminoácidos livres e peptídeos com propriedades bioativas dependendo da estirpe (CUFFIA *et al.*, 2017). Além disso, os peptídeos podem apresentar atividades antioxidantes e antimicrobianas que atuam no biocontrole (MUSHTAQ *et al.*, 2016). Em termos de lipólise, podem gerar diferentes ácidos graxos livres de cadeia longa, média e curta, que são importantes componentes do sabor do queijo (KARIMI *et al.*, 2012).

Portanto, a utilização de metodologias rápidas e precisas para auxiliar no controle de qualidade na área de queijos é de grande importância. Assim, as técnicas de espectroscopia do infravermelho têm sido utilizadas para caracterizar queijos e avaliar as mudanças durante a fermentação e maturação (ANDRADE *et al.*, 2018).

A identificação de compostos por espectroscopia de infravermelho é baseada na propriedade das moléculas de absorver a luz infravermelha e experimentar uma ampla variedade de movimentos vibracionais característicos de sua composição. Essa técnica se baseia na geração de picos de absorção que correspondem às frequências de vibrações das ligações intramoleculares, quando a radiação infravermelha é incidida sobre as moléculas e promove vibrações de estreitamento das ligações entre os átomos, ocasionando faixas de absorção

específicas. Assim, cada substância apresenta picos referentes aos grupos químicos funcionais presentes em sua composição. Esses picos correspondem a um perfil espectral único para cada tipo de substância, capaz de identificar as moléculas presentes em diferentes tipos de amostras (FRANCA; OLIVEIRA, 2011).

Dentre as metodologias rápidas com possível aplicação na área de leite e derivados destacam-se a espectroscopia de infravermelho médio (MIR) e de infravermelho próximo (NIR) com transformada de Fourier (FT), que podem ser usadas com intuito de determinar parâmetros de qualidade e adulterações em produtos lácteos. Assim, objetivou-se nesse estudo discriminar os queijos Minas Padrão e Prato controle, contendo somente a cultura starter (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), e adicionados de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* L10, *Lactocaseibacillus casei* L26 e *Bifidobacterium lactis* B94, que já são utilizadas na produção de leites fermentados) por Espectroscopia do Infravermelho Médio e Próximo ao longo da maturação.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do experimento

Os queijos Minas Padrão e Prato controle e contendo isoladamente bactérias probióticas foram elaborados em três repetições. Posteriormente, a fim de discriminar as amostras, análises por espectroscopia do infravermelho médio e por espectroscopia do infravermelho próximo com Transformada de Fourier foram realizadas ao longo da vida de prateleira dos queijos (Figura 1). Após a fabricação, os queijos foram armazenados entre 7°C e 10 °C e, posteriormente, congelados a -20 °C até o momento das análises, sendo utilizadas 72 amostras de queijo Minas Padrão e 60 amostras de queijo Prato.

Elaboração dos queijos Minas Padrão e Prato controle ou adicionado de *L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 ou de *B. lactis* B94

A produção de queijo Minas Padrão foi realizada por Rodrigues (2023) e a de queijo Prato por

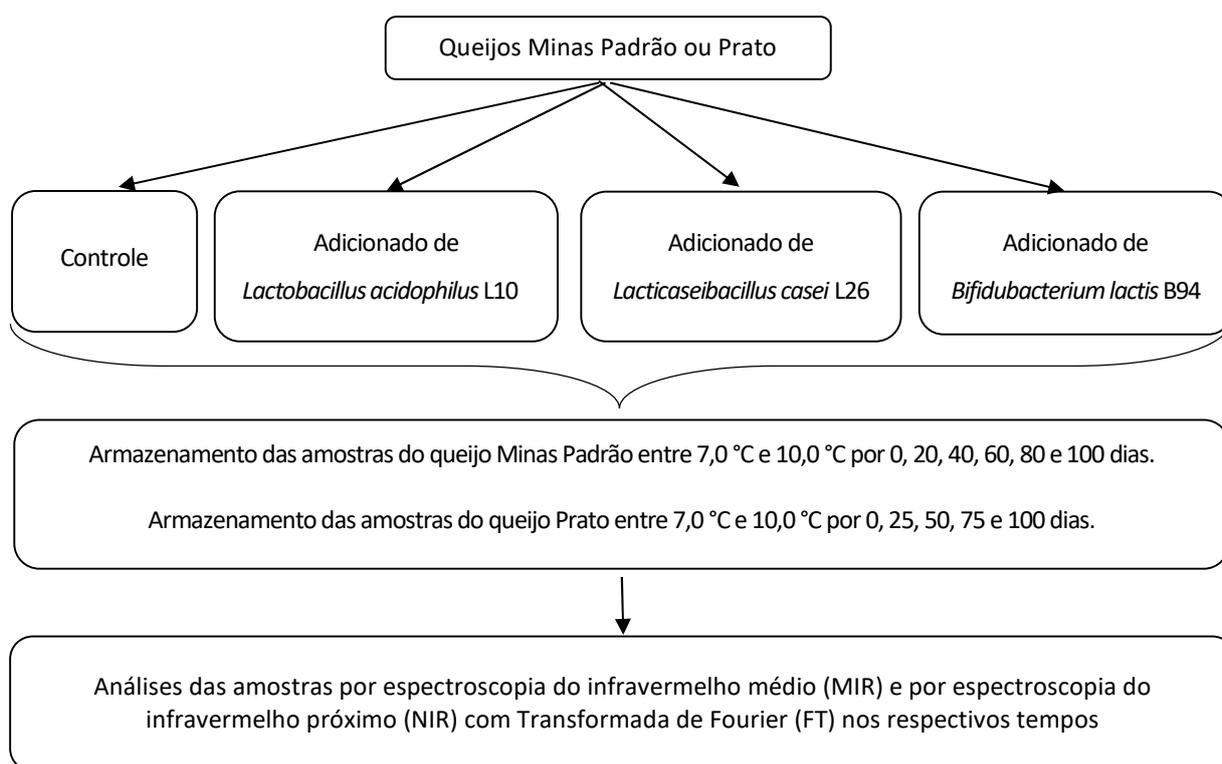


Figura 1. Desenho do estudo para caracterização dos queijos Minas Padrão e Prato.

Calsavara (2023) e foram seguidas as metodologias adaptadas de Lourenço Neto (2013), sendo obtidos quatro tratamentos de cada tipo de queijo: controle e adicionados, individualmente, das culturas probióticas de *L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 ou de *B. Lactis* B94, liofilizadas DVS (*Direct Vat Set*) da empresa Globalfood (Figura 1). Essas culturas foram diluídas em leite desnatado reconstituído a 12% esterilizado, armazenadas em tubos Falcon a -20 °C e adicionadas, individualmente, 30 minutos previamente a adição da cultura *starter* R704 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) da empresa Chr. Hansen (Valinhos, SP, Brasil), durante o processo de fabricação dos queijos Minas Padrão e Prato a fim de atingirem contagens de, aproximadamente, 10^8 UFC/mL de leite. Os queijos Minas Padrão e Prato foram secos por dois dias em câmara fria entre 7 °C e 10 °C, embalados a vácuo em películas termoencolhíveis de polietileno (filme coextrudado em sete camadas a base de PE/EVA/PVDC) e armazenados entre 7 °C e 10 °C por até 100 dias. Os queijos foram produzidos em três repetições.

Espectroscopia FT-MIR-ATR

Os espectros MIR foram registrados em um espectrofotômetro FT-MIR (Bruker, modelo Vertex 70), com acessório ATR (Refletância Total Atenuada) e software OPUS 6.5, do Laboratório Laboratório de Espectroscopia de Materiais, no Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Os espectros foram coletados a partir de 64 varreduras no modo de absorbância no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas à temperatura ambiente (20 °C) e o background (para subtração da linha de base) foi coletado antes de cada amostra ser medida. Todas as medidas foram feitas em triplicatas e os dados foram analisados usando OriginPro 8.0, Minitab 16.1.1 e MS-Excel.

Inicialmente as amostras dos queijos foram descongeladas a, aproximadamente, 20 °C. Devido à utilização de uma grande quantidade de amostras e para evitar erros analíticos e melhorar a resolução de leitura, foi adotado um procedi-

mento padrão de análise que consistiu na transferência das amostras para canudos plásticos de, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento por 0,5 cm de diâmetro, obtendo-se assim amostras preparadas no formato de pastilha.

Após a análise do background, as pastilhas das amostras foram organizadas de acordo com o tipo de queijo, tempo de armazenamento dos mesmos entre 7 °C e 10 °C e tratamento. Cada pastilha foi posicionada sobre o cristal de diamante certificando sua cobertura total. Uma leve pressão foi feita em cada pastilha envolta pelo canudo de plástico para que se obtivesse o máximo de contato com a superfície do diamante. Essa pressão foi feita utilizando uma estrutura apropriada (anvil) que faz parte do equipamento, e a força aplicada foi padronizada para cada amostra, seguindo as instruções de uso do equipamento. Após esses procedimentos, as leituras foram feitas seguindo as etapas e procedimentos de uso do software Opus e de armazenamento dos dados. Após a certificação do armazenamento, a pressão do anvil sobre a amostra foi aliviada e cuidadosamente a pastilha lida foi retirada. O mesmo procedimento foi feito para todas as amostras e entre leituras o cristal foi devidamente limpo utilizando tecido apropriado e álcool isopropílico.

Espectroscopia FT-NIR

Um espectrofotômetro com transformada de Fourier modelo FT-NIR MPA (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha) equipado com um detector de Arsenato de Gálio Índio e Telúrio (Te-InGaAs) e óptica de quartzo do Laboratório de Espectroscopia de Materiais do Departamento de Física da UFJF foi usado. As análises foram realizadas em triplicata, no modo de refletância usando o software OPUS 6.5, no intervalo de 12.000 a 4.000 cm^{-1} , sendo que um total de 64 varreduras foram coletadas em cada amostra com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} . As amostras dos queijos, aproximadamente, 5 g foram transferidas para frascos de quartzo, os quais foram colocados diretamente no compartimento do equipamento para a obtenção dos espectros.

Obtenção dos espectros, tratamento e análise estatística dos dados

O processo completo de obtenção de espectros e tratamento dos dados foi realizado da seguinte forma: (1) aquisição de dados espectrais das amostras no FT-MIR-ATR e no FT-NIR; (2) pré-processamento de dados (mudança de linha de base) para eliminar ruídos de fundo do ambiente; e (3) análise estatística por meio da Análise de Componentes Principais (PCA).

As análises multivariadas foram efetuadas com o software ORIGIN PRO 2023, versão 8.0. A PCA foi realizada com o espectro até 3100 cm^{-1} no MIR e completo no NIR. Os espectros foram normalizados e as triplicatas foram consideradas individualmente (sem realização de médias).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de componentes principais dos espectros obtidos por FT-MIR

As análises FT-MIR realizadas entre 4000 e 400 cm^{-1} (Figuras 2) apresentaram faixas de número de onda importantes, onde se encontram os principais picos de absorbância em alimentos, com destaque para água e frações de gordura, proteína e carboidratos (Figura 2).

As moléculas de água absorvem fortemente em 3300 e 1638 cm^{-1} (REN *et al.*, 2022). Entretanto, a água prejudica os espectros porque algumas bandas da mesma se sobrepõem com as bandas decorrentes de compostos amplamente presentes em alimentos, pois a água estabelece ligações de hidrogênio com macro componentes como, por exemplo, proteínas, carboidratos e lipídios, reduzindo a percepção de certas bandas (amida I, carbonila, grupos carboxilato, dentre outros) (BORBA; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2023). Destaca-se que, apesar da diferença visual (Figura 2), os picos em 3300 cm^{-1} não tiveram relevância nesse estudo, uma vez que grande parte dessa faixa é água, que interfere muito nos resultados, fornecendo informações limitadas.

De acordo com Borba; Gómez-Zavaglia (2023), os espectros dos polissacarídeos podem

ser divididos nas seguintes regiões: 4000-2500 cm^{-1} : Banda forte e larga em 3600-3000 cm^{-1} , correspondendo ao modo $\nu(\text{OH})$ e decorrente de vários grupos hidroxila com diferentes conformações e posições nos anéis dos carboidratos. Os modos vibracionais $\nu(\text{OH})$ da água também dão origem a bandas nessa região, o que por vezes dificulta a análise das mesmas. Os $\nu(\text{CH } 2)$ e $\nu(\text{CH } 3)$ (simétricos e assimétricos) também absorvem nesta re-

gião (3000 - 2500 cm^{-1}), mas sua intensidade é bastante baixa. Na região de estiramento de ligação dupla (1800 - 1500 cm^{-1}), polissacarídeos, incluindo grupos carboxilatos (por exemplo, pectinas e algínatos), possuem bandas características, decorrentes das vibrações $\nu(\text{C } \text{O})$. A água também absorve nesta região $\delta(\text{OH})$ em 1635 cm^{-1} , levando a maiores ou menores reduções de $\nu(\text{C } \text{O})$, dependendo da força das ligações de hidrogênio envolvidas (WOLKERS *et al.*, 2004).

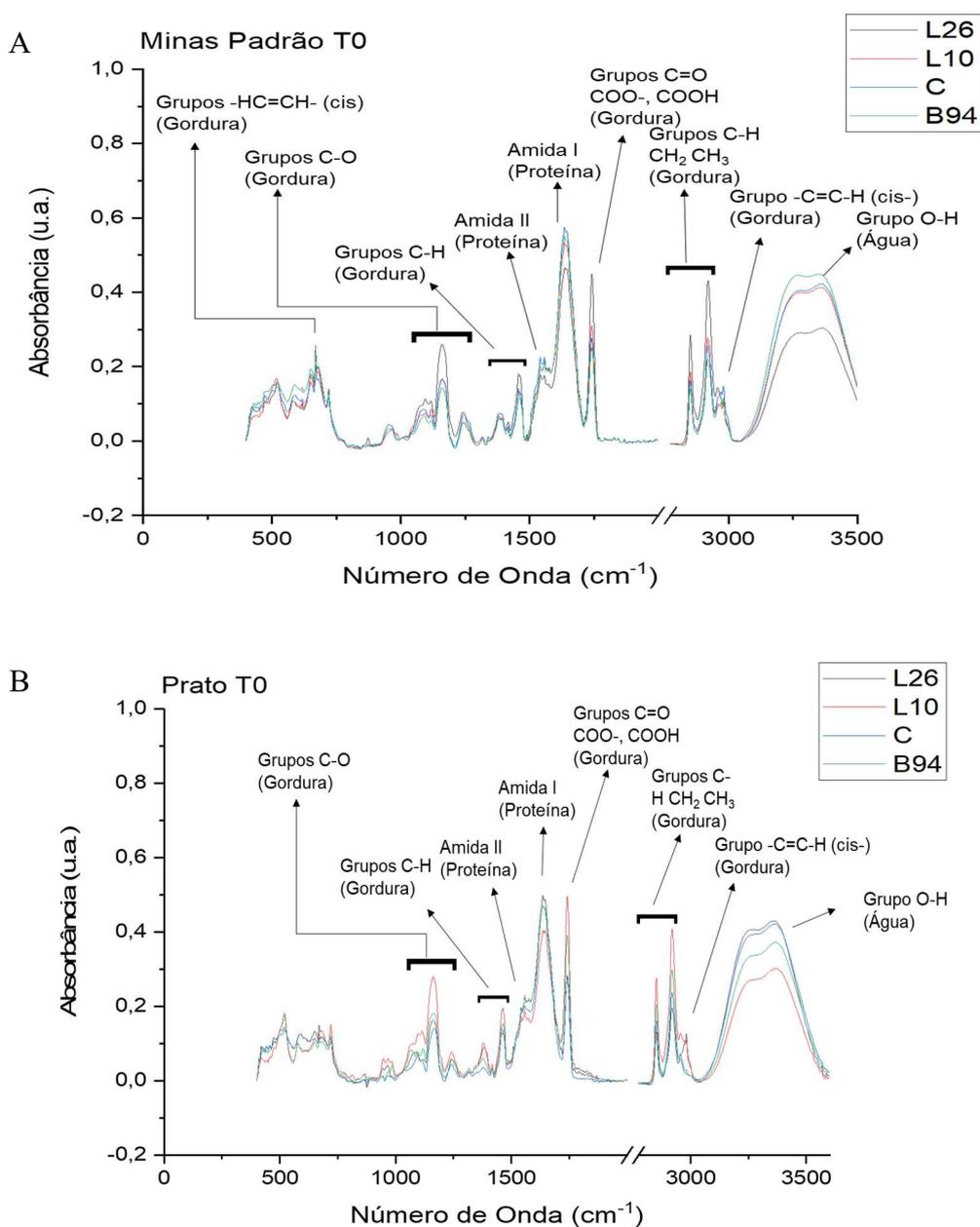


Figura 2. Média dos espectros FT-MIR das amostras de Queijo Minas Padrão (A) e Prato (B) controle e adicionados de probióticos no tempo 0. (L10): *L. acidophilus* L10, (L26): *L. casei* L26, (B94): *B. lactis* B94 e (C): Controle.

Por outro lado, a espectroscopia infravermelha é particularmente útil para determinar a estrutura das proteínas, sendo as amidas I e II as bandas mais relevantes. A amida I é quase inteiramente composta por $\nu(\text{C}=\text{O})$ (80%) proveniente da ligação peptídica, sendo muito sensível à estrutura secundária. De acordo com as correlações empíricas da estrutura de frequência, as folhas β absorvem fortemente em $1640\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$, dando origem a bandas mais fracas em $1690\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$. Por outro lado, α -hélices absorvem em $1650\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$. Amida II ($1575\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$) está associada a $\delta(\text{NH})$ (40-60%) e $\nu(\text{CN})$ (18-40%), sendo altamente sensível à protonação de peptídeos, mas quase insensíveis a alterações da estrutura secundária (FEVZIOGLU *et al.*, 2020).

Além disso, as principais características espectrais dos lipídios incluem: $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{NH})$: Grupos hidroxila ou amina de certos lipídios (por exemplo, glicolipídios) absorvem em números de onda $> 3300\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C}=\text{O})$: ligação éster de triglicerídeo ($\sim 1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$); $\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$ (2950

$\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) e $\delta(\text{CH})$ ($1470\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$): Cadeias de hidrocarbonetos (BORBA; GÓMEZ-ZAVAGLIA, 2023). Constatou-se diferença na região $\sim 700\text{ cm}^{-1}$ referente a grupos $\text{--HC}=\text{CH}$ - cis de gordura entre os queijos Minas Padrão e Prato (Figura 2), o que pode estar relacionado às diferenças nas etapas de processamento e maturação desses queijos, que podem levar a alterações bioquímicas como hidrólise e oxidação nos constituintes dos mesmos a exemplo da gordura.

Constatou-se pela PCA que os dois primeiros componentes explicaram 91% da variância dos dados espectrais no MIR, sendo que o primeiro componente principal explicou 75% da variância dos resultados e o segundo, aproximadamente, 16% (Figura 3). Esse resultado está relacionado com o grande número de amostras, sendo avaliados dois tipos de queijos (Minas Padrão e Prato), com diferentes probióticos (*L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 e *B. lactis* B94), além do controle, e diferentes tempos de maturação, totalizando 132 amostras analisadas.

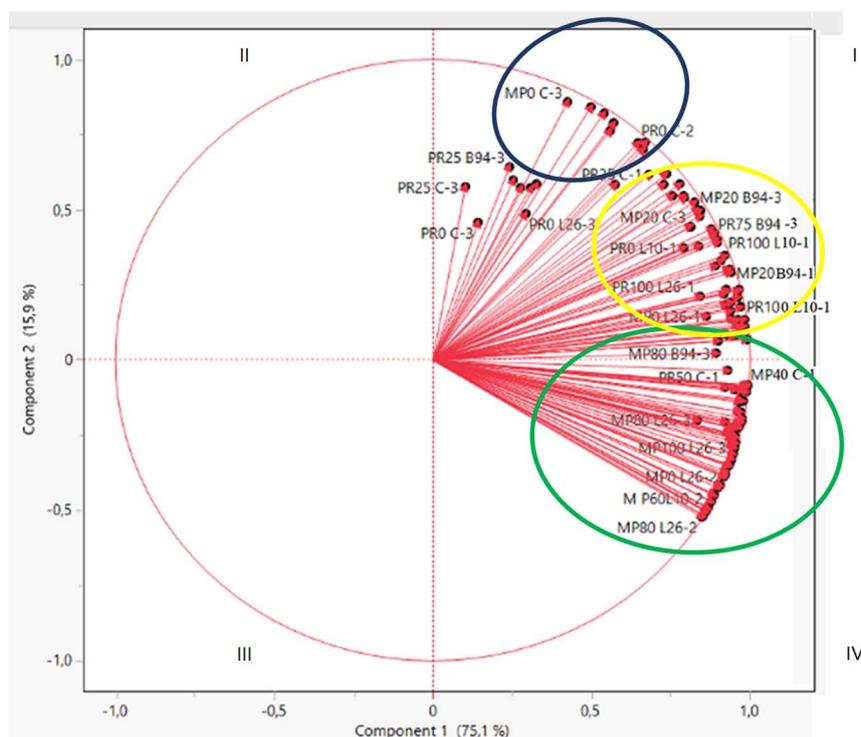


Figura 3. PCA dos espectros obtidos por FT-MIR das amostras dos queijos Minas Padrão e Prato controle e adicionados de probióticos (n=132). (MP): Queijo Minas Padrão, (PR): Queijo Prato, (0): Tempo 0, (20): Tempo 20, (25): Tempo 25, (40): Tempo 40, (50): Tempo 50, (60): Tempo 60, (75): Tempo 75, (80): Tempo 80, (100): Tempo 100, (L10): *L. acidophilus* L10, (L26): *L. casei* L26, (B94): *B. lactis* B94, (C): Controle, (-1): Primeira repetição; (-2): Segunda repetição e (-3) Terceira repetição.

Constatou-se ainda que, as amostras dos queijos dos tratamentos controle, encontram-se, no tempo 0, no primeiro quadrante (Componente Principal 1 – PC1 e componente principal 2 – PC2 em torno de 0,5, elipse azul), estando separadas das demais (Figura 3). Portanto, a técnica de MIR identificou as amostras controle (cultura *starter*) como diferentes das que continham os probióticos (cultura *starter* mais probiótico), o que pode estar relacionado à atividade metabólica das bactérias probióticas nos queijos, bem como a presença das mesmas nas amostras que as continham.

Segundo Rodrigues (2023) e Calsavara (2023) as contagens das bactérias do fermento láctico mesofílico (cultura *starter*) usado na produção dos queijos dos tratamentos controle reduziram ao longo do armazenamento, sendo constatada diferença do tempo 0 (9,44 Log UFC/g) para o tempo 20 (8,54 Log UFC/g) no queijo Minas Padrão e do tempo 0 (9,64 Log UFC/g) para o tempo 25 (8,63 Log UFC/g) no queijo Prato. Essas contagens continuaram reduzindo até o final do experimento, sendo constatada contagem de 3,00 log UFC/g e 6,67 log UFC/g no tempo 100 dias nos queijos Minas Padrão e Prato, respectivamente. Esse comportamento é característico da cultura

mesofílica, provavelmente devido às reações bioquímicas ocorridas durante a maturação dos queijos, a baixa temperatura de armazenamento e aos fatores intrínsecos como pH, atividade de água e potencial de oxirredução.

Por outro lado, as contagens médias de *L. acidophilus* L10 e de *L. casei* L26, nas amostras de queijos Minas Padrão usados no presente trabalho, ficaram acima de 7,99 log UFC/g (RODRIGUES, 2023), enquanto as contagens médias dessas bactérias probióticas nos queijos Prato usados no presente trabalho ficaram acima de 8,26 log UFC/g (CALSAVARA, 2023). Rodrigues (2023) e Calsavara (2023) constataram ainda que a contagem de *B. lactis* B94 aumentou ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento dos queijos Minas Padrão e Prato, respectivamente, atingindo contagens mínimas para serem considerados probióticos aos 40 dias (6,08 log UFC/g) e aos 50 dias (acima de 7,00 log UFC/g) de armazenamento refrigerado das amostras. Dessa forma, os resultados obtidos por Rodrigues (2023) e Calsavara (2023) demonstram contagens elevadas das bactérias probióticas nos queijos, o que pode ter contribuído para a discriminação das amostras pela técnica FT-MIR (Figuras 4 e 5).

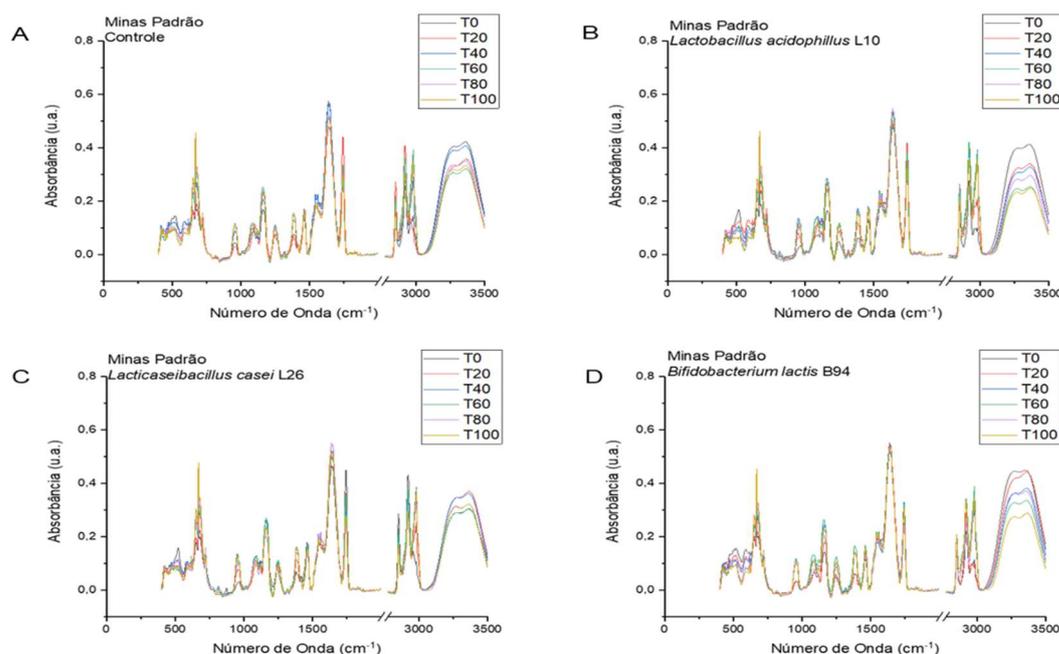


Figura 4. Espectros característicos de FT-MIR dos queijos Minas Padrão durante a evolução da maturação. (A): Controle, (B): *L. acidophilus* L10, (C): *L. casei* L26, (D): *B. lactis* B94, (T0): Tempo 0, (T20): Tempo 20, (T40): Tempo 40, (T60): Tempo 60, (T80): Tempo 80, (T100): Tempo 100.

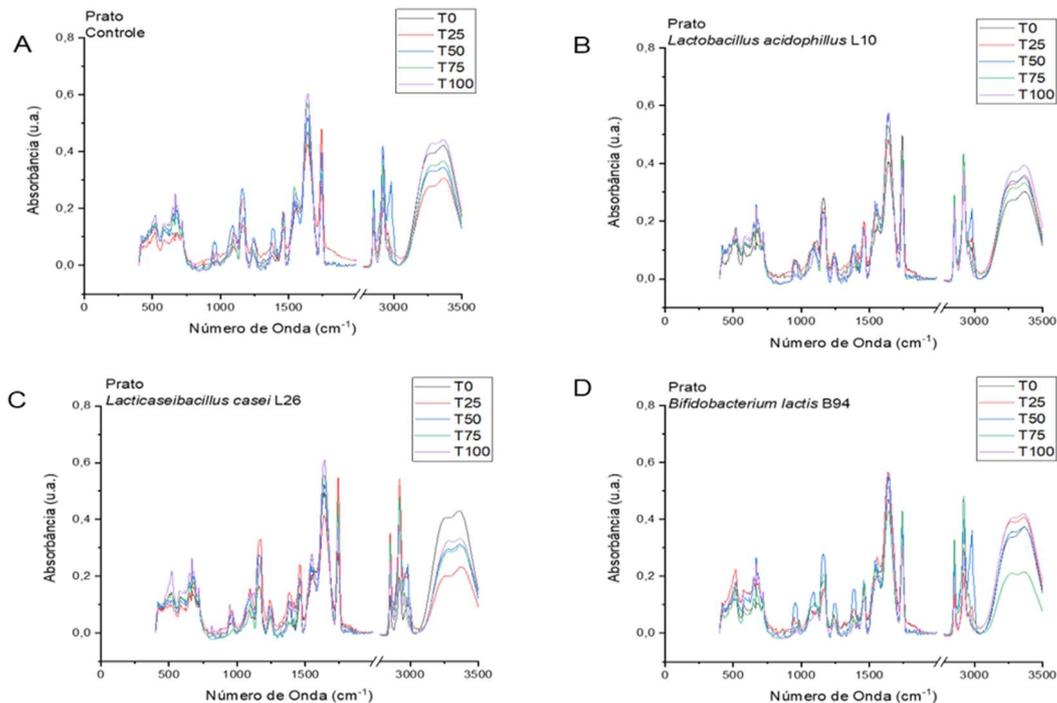


Figura 5. Espectros característicos de FT-MIR dos queijos Prato durante a evolução da maturação. (A): Controle, (B): *L. acidophilus* L10, (C): *L. casei* L26 e (D): *B. lactis* B94, (T0): Tempo 0, (T25): Tempo 25, (T50): Tempo 50, (T75): Tempo 75, (100): Tempo 100

A maioria das amostras de queijo Minas Padrão está no quarto quadrante, com PC1 positivo e PC2 negativo, elipse verde, e a grande maioria das amostras de queijo Prato está no primeiro quadrante, com PC1 positivo (>0,7) e PC2 positivo, elipse amarela, mostrando diferenças entre os tipos de queijo (Figura 3).

Além disso, não se constatou uma tendência clara de separação entre as amostras adicionadas de probióticos (*L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 e *B. lactis* B94) e não foi possível identificar uma tendência clara de separação em função do tempo de maturação dos queijos. Rodrigues (2023) e Cal-savara (2023), ao avaliarem as características físico-químicas (pH, acidez titulável, umidade, extrato seco total, gordura, proteína, cinzas e cloretos) dos queijos Minas Padrão e Prato, respectivamente, não constataram diferenças ($p > 0,05$) entre os queijos do tratamento controle e adicionados de probióticos (*L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 e *B. lactis* B94), sendo os mesmos utilizados neste trabalho. Além disso, as autoras também não constataram diferença ($p > 0,05$) de cor instrumental e no perfil de textura dos queijos do tratamento controle e adicionados de probióticos. Entretanto, as

absorções na região do MIR apresentam alta intensidade, pois são provenientes das transições fundamentais (SILVA, 2017). Assim, a espectroscopia MIR pode identificar estruturas muito complexas e semelhantes e tem sido considerada uma excelente ferramenta para identificação de compostos (SHI; YU, 2017). Porém, neste trabalho constatou-se diferenças significativas em termos de intensidades relativas dos picos no MIR para cada espectro das triplicatas de todas as amostras (Figura 6), o que reduziu o poder discriminatório da técnica.

A Figura 6 representa com clareza a diferença entre os picos do espectro do queijo Minas Padrão no tempo 0 adicionado de *L. casei* L26 como um exemplo do que ocorreu em todas as amostras. Como os queijos são uma matriz complexa, com diferentes constituintes, os mesmos apresentam diferentes respostas em regiões similares. Assim, como as triplicatas das amostras avaliadas mostraram diferenças espectrais significativas entre si ($p > 0,05$) (Figura 6), sugere-se que as amostras são heterogêneas, sendo uma avaliação global melhor para caracterizar os queijos desse estudo, nesse momento.

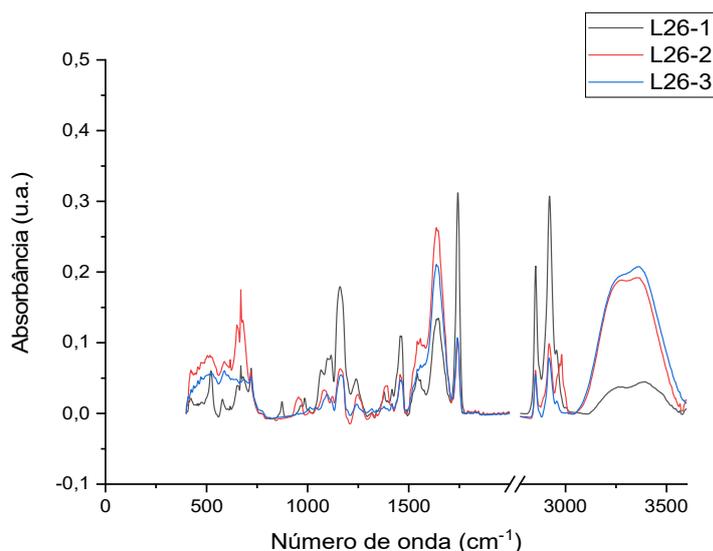


Figura 6. Espectro FT-MIR da amostra de Queijo Minas Padrão adicionada de *L. casei* L26 no tempo 0. (L26): *L. casei* L26, (-1): Primeira repetição; (-2): Segunda repetição e (-3) Terceira repetição.

Rodrigues (2023) constatou que os índices de extensão de maturação (IEM) e de profundidade de maturação (IPM) dos queijos Minas Padrão usados neste estudo dos tratamentos controle, adicionados de *L. acidophilus* L10 ou de *B. lactis* B94 aumentaram ao longo do tempo de armazenamento, o que evidencia o aumento da proteólise primária e secundária durante o período que os queijos adicionados dessas culturas foram analisados. Por outro lado, Calsavara (2023) constatou aumento do IEM dos queijos Prato dos tratamentos adicionados de *L. casei* L26 ou de *B. lactis* B94. Portanto, era esperado que a técnica de FT-MIR diferenciasse as amostras em função da proteólise, lipólise e glicólise, que normalmente ocorrem durante a maturação dos queijos. Entretanto, a técnica de FT-MIR não diferenciou os queijos ao longo da maturação, o que pode estar relacionado a heterogeneidade das amostras (Figura 6).

Os resultados deste trabalho não sofreram alterações significativas utilizando pré-tratamentos dos dados como: normalização, uso de partes dos espectros e uso de primeira derivada. Um dos fatores responsáveis pela limitação do poder discriminatório do MIR deve-se, provavelmente, à heterogeneidade das amostras, revelada pelas diferenças significativas em termos de intensidades relativas dos picos no MIR para cada espectro das triplicatas (Figura 6).

Essa heterogeneidade pode ter acontecido pelas amostras não estarem bem trituradas e conterem partes dos cortes de queijo (da casca e interior) obtidas em diferentes profundidades, ocasionando diferenças na concentração de sal, quantidade de água e textura. Destaca-se que os experimentos foram realizados em três repetições, ou seja, cada tipo de queijo (Minas Padrão ou Prato) foi produzido três vezes e em dias diferentes utilizando o leite de uma mesma propriedade. Na produção dos queijos emprega-se tecnologias de fabricação bem distintas, portanto, os mesmos apresentam teores de umidade e de sal diferentes entre si. Entretanto, Rodrigues (2023) e Calsavara (2023) constataram que os queijos Minas Padrão e Prato, respectivamente, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) nas características físico-químicas ao longo do armazenamento, bem como quando adicionados ou não dos probióticos.

Análise de componentes principais dos espectros obtidos por FT-NIR

A Figura 7 mostra espectros de absorção NIR típicos de queijos Prato e Padrão. As bandas 1 e 3, centradas em 1200 e 1730 nm, são atribuídas ao segundo e ao primeiro sobretom das ligações C-H. Estas bandas estão associadas a carboidratos, proteínas e gorduras. Por outro lado, as bandas 2

e 4, centradas em 1.450 e 1.900 nm, correspondem ao primeiro sobretom de estiramento de O-H e à banda de combinação de estiramento e defor-

mação angular de O-H de água, respectivamente. Pode-se notar que a maior variabilidade entre as amostras está relacionada à umidade (Figura 7).

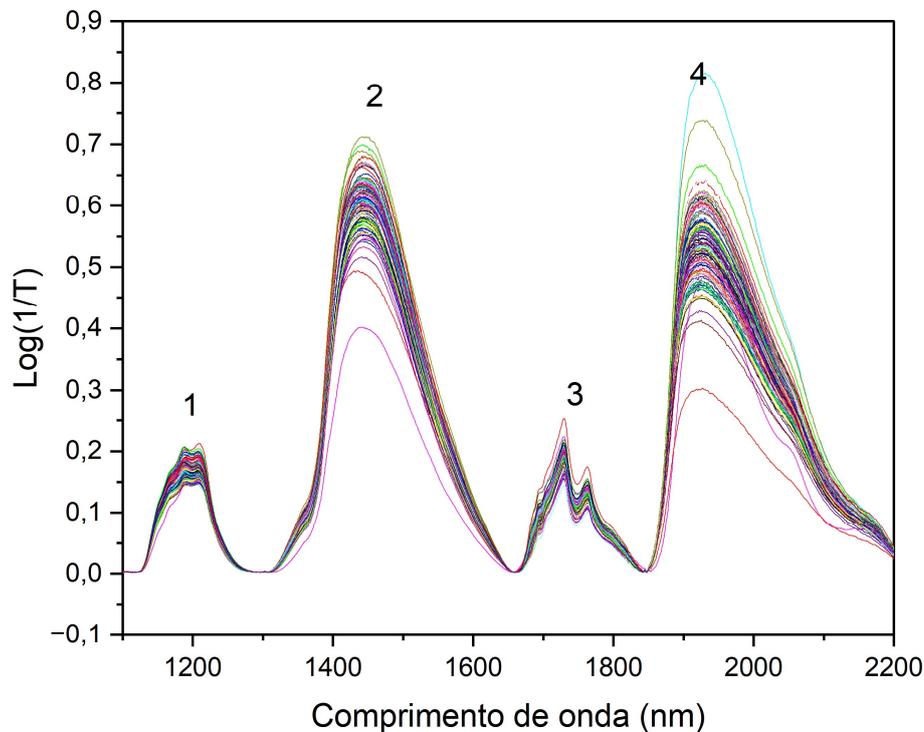


Figura 7. Espectros de absorção NIR típicos de queijos Prato e Padrão.

A Figura 8 mostra resultados de PCA utilizando as amostras controle no tempo 0 de maturação. Foram necessários 3 componentes principais para explicar 89.5% da variância dos dados. Neste caso, foi possível discriminar claramente os tipos de queijo Minas Padrão (elipse azul) e Prato (elipse vermelha). Contudo, os dados obtidos não foram conclusivos para discriminar os probióticos (resultados não mostrados). Ou seja, a técnica de NIR apresenta menos especificidade que a técnica de MIR. O resultado é similar se considerarmos pré-tratamentos das amostras como normalização e primeira derivada.

As bandas de absorção predominantes nos espectros NIR de amostras se originam de combinações de vibrações fundamentais de ligações C-H, N-H, O-H e S-H (SANDORFY *et al.*, 2006). A es-

pectroscopia MIR produz picos de absorção nítidos para ligações químicas individuais sob certas condições químicas, permitindo a identificação de compostos orgânicos. No entanto, à alta absorção da radiação MIR pelo material, limita a profundidade de penetração, permitindo apenas medições superficiais. Em contraste, a absorção na espectroscopia NIR é mais fraca do que na espectroscopia MIR, geralmente por um fator de 10 a 100, permitindo assim alta profundidade de penetração. Isso é crucial para aplicações que medem material biológico não homogêneo (SANDORFY *et al.*, 2006). Infelizmente, as bandas NIR são geralmente largas e severamente sobrepostas, resultando em bandas frequentemente difíceis (OZAKI *et al.*, 2006) tornando os espectros NIR menos valiosos para fins de identificação de compostos.

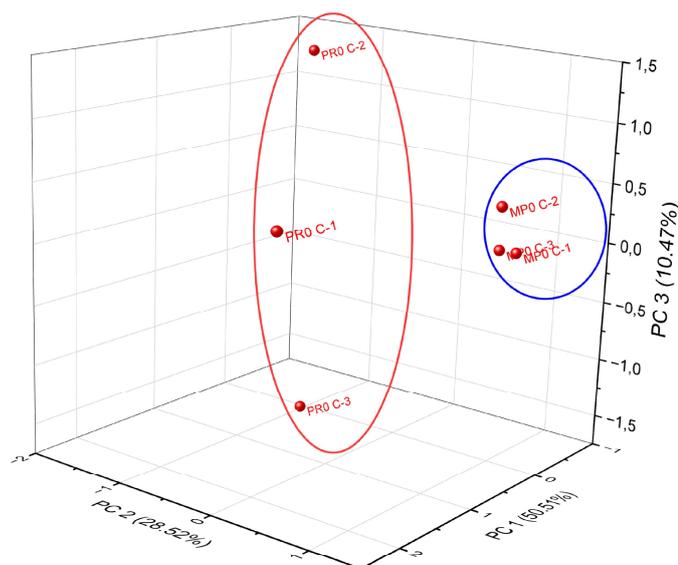


Figura 8. PCA dos espectros obtidos por FT-NIR das amostras dos queijos Prato e Minas Padrão controle no tempo 0. (PR): Queijo Prato, (MP): Queijo Minas Padrão, (C): Controle, (-1): Primeira repetição; (-2): Segunda repetição e (-3) Terceira repetição.

CONCLUSÃO

As triplicatas mostraram diferenças espectrais significativas entre si, sugerindo que as amostras são heterogêneas. Portanto, trabalhos futuros devem ser realizados levando-se em consideração a homogeneidade das amostras de queijo, ou seja, as mesmas devem ser trituradas previamente às análises para conter partes da casca e interior dos queijos compondo de forma homogênea a amostra que será analisada. O FT-MIR foi mais sensível à heterogeneidade das amostras e distinguiu os queijos controle dos adicionados de probióticos. Por outro lado, o FT-NIR foi menos específico para discriminar as amostras.

De forma geral, as técnicas de MIR e NIR apresentaram sensibilidade para identificar as diferenças entre os queijos Minas Padrão e Prato, apresentando potencial para emprego no controle de qualidade de queijos adicionados de probióticos. O MIR foi mais específico, identificando o conjunto de amostras controle, ou seja, identificou a presença dos probióticos (*L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 e *B. lactis* B94), embora não tenha sido possível realizar a discriminação de cada um deles. Além disso, não houve uma discriminação entre

tempos de maturação dos queijos, sendo necessários estudos que avaliem a maturação imediatamente após a fabricação, analisando diariamente até o mínimo de dias estabelecido pela legislação, a fim de detectar possíveis diferenças nos queijos Minas Padrão e Prato.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Geras (FAPEMIG) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, campus Rio Pomba pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. *et al.* Long-Term ripening evaluation of ewes' cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under real industrial conditions. **Journal of Spectroscopy**, v. 2018, n. 1, 1381864, 2018. DOI: 10.1155/2018/1381864

BORBA, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Infrared spectroscopy: an underexploited analytical tool for assessing physicochemical properties of food products and processing. **Current Opinion in Food Science**, v. 49, e100953, 2023. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100953

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 04 de setembro de 1997.
- CALSAVARA, J. F. V. **Aplicação de questionário on-line, desenvolvimento e caracterização de queijo prato adicionado de probióticos e elaboração de boletim técnico**. Orientador: Maurilio Lopes Martins. 2023. 153f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2023.
- COSTA, R. G. B. *et al.* Sodium substitutes in Prato cheese: Impact on the physicochemical parameters, rheology aspects and sensory acceptance. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 643-649, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.051
- CUFFIA, F. *et al.* Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 111-117, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.03.039
- DOMINGO, J. J. S. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 40, n. 6, p. 417-429, 2017. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2016.12.003
- FEVZIOGLU, M. *et al.* Quantitative approach to study secondary structure of proteins by FT-IR spectroscopy, using a model wheat gluten system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2753-2760, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.299
- FLACH, J. *et al.* The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2570-2584, 2018. DOI: 10.1080/10408398.2017.1334624
- FRACASSO, R.; PFÜLLER, E. E. Processamento do leite para a fabricação do queijo na indústria de laticínios Camozzato Ltda, Sananduva - RS. **RAMVI**, v. 01, n. 02, p. 1-20, 2014.
- FRANCA, A.; OLIVEIRA, L. Potential uses of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in food processing and engineering. In: SIEGLER, B. C. **Food Engineering**. New York: Nova Science Publishers, 2011. p. 211-258.
- FURTADO, M. M. **Quesos típicos de latinoamerica**: Tecnología y puntos críticos. Saarbrücken: VDM Verlag, 2017. 212p.
- KARIMI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. Review article: Sensory characteristics of probiotic cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 5, p. 437-452, 2012. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00194.x
- LOURENÇO NETO, J. P. M. **Queijos**: aspectos tecnológicos. São Paulo: Master Graf, 2013. 270 p.
- MUSHTAQ, M. *et al.* Himalayan cheese (Kalari/Kradi) – Effect of different probiotic strains on oxidative stability, microbiological, sensory and nutraceutical properties during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, p. 74-81, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.11.039
- OZAKI, Y.; MORITA, S.; DU, Y. Spectral Analysis. In: OZAKI, Y.; McCLURE, W. F.; CHRISTY, A. A. **Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology**. John Wiley & Sons, 2006. p. 47-72.
- PUMPA, K. L.; MCKUNE, A. J.; HARNETT, J. A new role for probiotics in enhancing rugby elite athlete: a double-blind controlled study randomized. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 22, n. 8, p. 876-881, 2019. DOI: 10.1016/j.jsams.2019.03.013
- REHMAN, M. U. *et al.* Probiotics (*Bacillus clausii* and *Lactobacillus fermentum* NMCC-14) ameliorate stress behavior in mice by increasing monoamine levels and mRNA expression of dopamine receptors (D1 and D2) and synaptophysin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, e915595, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.915595
- REN, Y. *et al.* Recent developments in vibrational spectral analyses for dynamically assessing and monitoring food dehydration processes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 16, p. 4267-4293, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2021.1947773
- RODRIGUES, C. H. G. **Aplicação de questionário on-line e incorporação de bactérias probióticas em queijo minas padrão**. Orientador: Maurilio Lopes Martins. 2023. 121f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2023.
- ROSA, L. de S.; CRUZ, A. G.; TEODORO, A. J. Produtos lácteos probióticos e câncer – uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, e30211528221, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i5.28221
- SANDORFY, C.; BUCHET, R.; LACHENAL, G. Principles of molecular vibrations for near-infrared spectroscopy. In:

-
- OZAKI, Y. W.; McCLURE, F.; CHRISTY, A. A. **Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology**. John Wiley & Sons, 2006. p. 11-46.
- SHI, H.; YU, P. Comparison of grating-based near-infrared (NIR) and Fourier transform mid-infrared (ATR-FT/MIR) spectroscopy based on spectral preprocessing and wavelength selection for the determination of crude protein and moisture content in wheat. **Food Control**, v. 82, p. 57-65, 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.06.015
- SILVA, C. S. **Espectroscopia no Infravermelho para Aplicações Forenses: documentoscopia e identificação de sêmen em tecidos**. Orientadora: Fernanda Pimentel. 2017. 139 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- SIQUEIRA, K. B. **Consumo de lácteos na pandemia, estudo da Embrapa**. *In*: MilkPoint. Disponível em: milkpoint.com.br/colunas/kennya-siqueira/consumo-de-lacteos-na-pandemia-estudo-da-embrapa-219327/ Acesso em: 5 ago. 2022.
- WOLKERS, W. F. *et al.* A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1077–1085, 2004. DOI: 10.1016/j.carres.2004.01.016