



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

BRUNO DOMINGUES GALLI

**PERFIL DE PEPTÍDEOS DE QUEIJO TIPO CAMEMBERT:
EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DO USO DE CULTURA ADJUNTA**
Lactobacillus rhamnosus GG

CAMPINAS

2018

BRUNO DOMINGUES GALLI

**PERFIL DE PEPTÍDEOS DE QUEIJO TIPO CAMEMBERT:
EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DO USO DE CULTURA ADJUNTA
*Lactobacillus rhamnosus GG***

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Bruno Domingues Galli, e orientado pela Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132010/2016-0
ORCID: 0000-0002-1054-5747

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

G136p Galli, Bruno Domingues, 1990-
Perfil de peptídeos de queijo tipo Camembert : efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta *Lactobacillus rhamnosus* GG / Bruno Domingues Galli. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Queijo. 2. Proteólise. 3. Peptídeos bioativos. 4. Espectrometria de massas. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Peptide profile of Camembert type cheese : effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG

Palavras-chave em inglês:

Cheese

Proteolysis

Bioactive peptides

Mass spectrometry

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Lilian Regina Barros Mariutti

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Data de defesa: 12-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante (Orientadora)

Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Lilian Regina Barros Mariutti (Membro Titular)

Universidade Estadual de Campinas

Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco (Membro Titular)

Instituto de Tecnologia de Alimentos

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno Bruno Domingues Galli.

“Tão bom viver dia a dia...
A vida, assim, jamais cansa...

Viver tão só de momentos
Como essas nuvens do céu...

E só ganhar, toda a vida,
Inexperiência... esperança...

E a rosa louca dos ventos
Preso à copa do chapéu.

Nunca dê um nome a um rio:
Sempre é outro rio a passar.

Nada jamais continua,
Tudo vai recomeçar!

E sem nenhuma lembrança
Das outras vezes perdidas,
Atiro a rosa do sonho
Nas tuas mãos distraídas...”

(Mario Quintana)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Marco e Miriam pela onipresença, onisciência e apoio incondicional.

Ao meu irmão Lucas pela proatividade e apoio.

À resiliência.

AGRADECIMENTOS

Ao universo, por cada dia me mostrar um pouco mais dos padrões, encaixes e sentidos que existem no caos de acontecimentos, perdas, ganhos, sucessos e fracassos que é a vida.

Aos meus pais Miriam Domingues Galli, Marco Antonio Galli e meu irmão Lucas Domingues Galli, pelo apoio incondicional desde questões emocionais e financeiras, bem como pela assistência total e onipresente em logística e incentivo em todo o processo desse mestrado, desde viajar de madrugada para me buscar em Campinas como por acordar 5h da manhã para carregar latões de leite.

Ao grupo de pesquisa de proteína no qual encontrei algo mais valioso e raro do que peptídeos bioativos: amizade verdadeira, apoio nas horas mais difíceis, ajuda indispensável em cada etapa do projeto, compreensão total e altruísmo verdadeiro. À Débora Parra Baptista, pela absoluta paciência, inteligência e compromisso com esse trabalho, de certo a aluna mais aplicada e inteligente que conheci aqui. À Flávia Giacometti Cavalheiro, pela aura de calma, pelo pró-ativismo, pelo pensamento positivo que foi uma luz mesmo nas horas mais escuras e pela segurança em si mesmo, em mim e no grupo.

À Prof^a Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, orientação, paciência e compreensão.

Aos membros da banca examinadora, pela absoluta compreensão e atenção bem como pelas correções e sugestões para a redação desse trabalho.

Ao Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, em especial ao Prof. Dr. Marcos Eberlin e à aluna Fernanda Negrão, pela parceria para realização desse trabalho, por todo o apoio e disponibilidade.

À técnica do DTA, Juliana Hashimoto, pela amizade, por me impor limites e expandir muito minha capacidade analítica. Às técnicas Aline, Ana Koon e Diana, por todo o apoio no desenvolvimento desse trabalho. E, em especial, à Bete, por toda ajuda na realização das análises e processos, ensinamentos e pela companhia diária durante a parte experimental do trabalho, confiança e conversas extensas sobre queijos e queijarias.

À colega de laboratório e verdadeira amiga Maria Isabel Landim Neves, que personifica e concentra em uma só pessoa o que o mineiro tem de melhor: a simplicidade no modo de ver a vida, a plenitude e o humor. Obrigado pelo apoio, pelos versículos da bíblia dos quais de alguma forma devo ter usado ou usarei e pelas muitas horas de riso, aconselhamento e prosa mineira.

Aos colegas da sala de pós-graduação, Mayara, Rodolfo, Ana Paula Barth, Carolina Karaziack, pelo companheirismo, socorro nas horas de caos total, descontração nas longas conversas, passeios e cafés na sala da pós-graduação.

Ao amigo Prof. Dr. José Guilherme Prado Martin, que mesmo à distância muito me ajudou com conselhos acadêmicos, decisões importantes em relação à minha carreira e sempre acreditou na minha capacidade de concluir esse e muitos outros objetivos na vida.

Ao meu auto-controle, às minhas convicções sólidas, à minha auto-segurança, à capacidade de arriscar, recomeçar, acreditar e evoluir. *Chi non risica, non rosica!*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta no desenvolvimento do perfil de peptídeos do queijo tipo Camembert durante a maturação. Os queijos foram fabricados a partir de leite cru e tratado termicamente, adicionados ou não de cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Seguiu-se o mesmo protocolo de fabricação para todos os queijos utilizando-se *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* como cultura acidificante. Após 24 horas de fermentação, os queijos foram pulverizados com solução de *Penicillium candidum* e maturados por 50 dias sob condições controladas de temperatura e umidade. O delineamento experimental utilizado foi *Split-split-plot* com três repetições. Os queijos foram avaliados quanto à composição físico-química, e periodicamente quanto à proteólise por eletroforese capilar e perfil de peptídeos por MALDI-ToF MS. O perfil de peptídeos obtidos por MALDI-ToF MS e sua correlação com as variáveis estudadas foi avaliado por quimiometria. Adicionalmente, os queijos foram avaliados quanto ao perfil sensorial através dos métodos Perfil Flash e CATA (*Check-all-that-apply*). Todos os queijos apresentaram perfil de degradação das caseínas semelhante, com formação da para-k-CN, hidrólise das frações α_{s1} -CN 8P e α_{s1} -CN 9P, com a consequente formação das frações de α_{s1} -I-CN 8P e α_{s1} -I-CN 9P, e intensa degradação da β -caseína ao final da maturação. Os resultados revelaram um complexo perfil de hidrólise das caseínas. Ao todo, foram encontrados 103 picos nos espectros de massa obtidos por MALDI-ToF MS, dos quais 70 foram identificados e 15 apresentaram potencial bioativo, com diferentes bioatividades reportadas. Os peptídeos bioativos importantes para a separação dos queijos foram todos derivados da β -caseína [β -CN f122–132 (m/z 1364); β -CN f193-206 (m/z 1556); β -CN f193-207 (m/z 1669); β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f57-72 (m/z 1740)]. O tratamento térmico do leite, a adição de cultura adjunta e o tempo de maturação afetaram o perfil de peptídeos dos queijos tipo Camembert, porém sem produção de peptídeos exclusivos. No início da maturação os queijos apresentaram praticamente o mesmo perfil de peptídeos, o qual se diferenciou no decorrer do tempo, sendo essa diferenciação mais clara para os queijos obtidos a partir de leite cru. A análise sensorial de perfil flash possibilitou o levantamento de ampla gama de atributos descritivos dos queijos, com baixo resíduo entre provadores e amostras e com boa separação das mesmas. A análise sensorial CATA demonstrou que o queijo obtido de leite pasteurizado adicionado de cultura de *Lb. rhamnosus* aproximou-se mais do produto ideal, assim como recebeu melhor avaliação global.

Palavras chave: queijo, proteólise, peptídeos bioativos, espectrometria de massa.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of the heat treatment and the use of adjunct culture in the development of the peptide profile of Camembert cheese during ripening. The cheeses were made from raw and heat-treated milk, with or without added culture of *Lactobacillus rhamnosus* GG. The same manufacturing protocol was followed for all cheeses using *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* as acidifying culture. After 24 hours of fermentation the cheeses were sprayed with *Penicillium candidum* solution and matured for 50 days under controlled conditions of temperature and humidity. The experimental design was split-split-plot with three replicates. Cheeses were evaluated for physicochemical composition, and periodically for proteolysis by capillary electrophoresis and peptide profile by MALDI-ToF MS. The profile of peptides obtained by MALDI-Tof MS and its correlation with the studied variables was evaluated by chemometrics. Additionally, the cheeses were evaluated for the sensory profile through the Flash Profile and CATA (Check-all-that-apply) methods. All cheeses presented a similar casein degradation profile, with formation of para-k-CN, hydrolysis of α s1-CN 8P and α s1-CN 9P fractions, with the consequent formation of α s1-I-CN 8P and α s1-I fractions -CN 9P, and intense β -casein degradation at the end of ripening. The results revealed a rather complex casein hydrolysis profile. In all, 103 peaks were found in the mass spectra obtained by MALDI-ToF MS, of which 70 were identified and 15 presented a bioactive potential, with different bioactivities effects reported. The bioactive peptides important for the separation of cheeses were all derived from β -casein [β -CN f122-132 (m / z 1364); β -CN f193-206 (m / z 1556); β -CN f193-207 (m / z 1669); β -CN f194-209 (m / z 1718) and β -CN f57-72 (m / z 1740)]. The heat treatment of the milk, the addition of the adjunct culture and the ripening time affected the peptide profile of the Camembert cheeses, but without exclusive peptide production. At the beginning of ripening the cheeses presented practically the same peptide profile, which differed with the ripening advance, being this clearer differentiation for the cheeses obtained from raw milk. Sensory analysis of the flash profile allowed the survey of a wide range of descriptive attributes of the cheeses, with low residue between tasters and samples and with good separation of the samples. CATA sensory analysis demonstrated that cheese obtained from pasteurized milk added from *Lb. rhamnosus* approached more of the ideal product, as well as received a better overall evaluation.

Key words: cheese, proteolysis, bioactive peptides, mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação simplificada do sistema proteolítico de bactérias lácticas (adaptado de SAVIJOKI et al., 2006).	23
Figura 2 – Sítios de clivagem da β -caseína identificados para a cepa de <i>Lb. rhamnosus</i> (GUO et al., 2016).	31
Figura 3 – Esquema geral do trabalho.	33
Figura 4 – Efeito do tempo sobre o pH da superfície e do centro dos queijos. (●) Centro do queijo tipo Camembert (leite cru); (▲) Centro do queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>) (■) Centro do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (◆) Centro do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>) (o) Superfície do queijo tipo Camembert (leite cru); (Δ) Superfície do queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>); (□) Superfície do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (◇) Superfície do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>).	45
Figura 5 - Eletroferograma capilar da fração insolúvel em pH 4,6 dos queijos. (A) queijo tipo Camembert (leite cru); (B) queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>); (C) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (D) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus GG</i>).	47
Figura 6 - Evolução da área integrada dos picos referentes às frações caseicas e sua degradação ao longo do tempo. (···) κ -CN; (- - -) α_{S1} ; (—) β -CN; (●) queijo tipo Camembert (leite cru); (▲) queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>); (■) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (◆) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>). (n=3).	48
Figura 7 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite cru).	50
Figura 8 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtidos por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite cru, cultura e <i>Lb. rhamnosus</i>).	51
Figura 9 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado).	52
Figura 10 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>).	53
Figura 11 - Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Gráficos de escores e de pesos, respectivamente, para o queijo tipo Camembert (leite cru) (a e b), queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>) (c e d), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (e e f) e queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>) (g e h). Após (●) 1, (●) 10, (●) 20, (●) 30 e (●) 50 dias de maturação. CS: queijo obtido de leite cru; CR:	

queijo obtido de leite cru e cultura adjunta; PS: queijo obtido de leite pasteurizado; PR: queijo obtido de leite pasteurizado e cultura adjunta.73

Figura 12 – Peptídeos importantes para a discriminação dos queijos identificados por PLS-DA para o queijo tipo Camembert (leite cru) (a), queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) (b), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (c), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (d). As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos correspondentes metabólitos em cada grupo em estudo. VIP score > 1 é considerado estatisticamente significativo.76

Figura 13 – Intensidades relativas (%) dos peptídeos β -CN f122–132 (m/z 1364); β -CN f193–206 (m/z 1556); β -CN f193–207 (m/z 1669); β -CN f194–209 (m/z 1718) e β -CN f57–72 (m/z 1740) ao longo dos 50 dias de maturação. (a) queijo tipo Camembert (leite cru); (b) queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (c) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (d) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (*) peptídeo com VIP>1.78

Figura 14- Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Gráficos de escores dos queijos tipo Camembert ao 1º dia de maturação (a), ao 10º dia de maturação (c), ao 20º dia de maturação(e), ao 30º dia de maturação(g) e ao 50º dia de maturação (j); gráficos de pesos dos queijos tipo Camembert ao 1º dia de maturação(b), ao 10º dia de maturação(d), ao 20º dia de maturação(f), ao 30º dia de maturação(h) e ao 50º dia de maturação. (•) CS-Queijo tipo Camembert (leite cru) (•) CR-Queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (•) PS-Queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (•) PR -Queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*).80

Figura 15 – Peptídeos importantes para discriminação dos queijos identificados por PLS-DA para os queijos tipo Camembert no 10º (a), 20º (b), 30º (c) e 50º dia de maturação (d). As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos correspondentes metabólitos em cada grupo em estudo. VIP score > 1 é considerado estatisticamente significativo. (*) Peptídeos potencialmente bioativos identificados na literatura; queijo obtidos de leite cru sem cultura adjunta (Cru), obtido de leite cru e cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG (Cru+Rh), obtido de leite pasteurizado sem cultura adjunta (Past), e obtido de leite pasteurizado e cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG (Past+Rh).82

Figura 16 – Peptídeos importantes identificados por PLS-DA para os queijos tipo Camembert obtidos de leite cru com e sem cultura adjunta aos 20 dias de maturação (a), queijos tipo Camembert obtidos de leite cru com e sem cultura adjunta aos 30 dias de maturação (c), queijos tipo Camembert obtidos de leite pasteurizado com e sem cultura adjunta aos 20 dias de maturação (e) e queijos tipo Camembert obtidos de leite pasteurizado com e sem cultura adjunta

aos 30 dias de maturação (g). (●) queijo com cultura adjunta de <i>Lb. rhamnosus</i> GG; (●) queijo sem cultura adjunta.....	84
Figura 17 - Frequência de citação de cada atributo entre os 15 provadores.....	86
Figura 18 - Configuração do consenso das amostras dimensões D1 e D2. CS= queijo tipo Camembert (leite cru); PS= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); PR= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>).	87
Figura 19 - Distribuição da variância residual dos provadores na solução bidimensional.	88
Figura 20 - Agrupamento e dispersão dos dados obtidos através da técnica de perfil Flash para os 3 queijos analisados (●) CS= queijo tipo Camembert (leite cru); (●)PS= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) ; (●)PR= queijo tipo Camembert (pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>) ; (▲)consenso de cada grupo de amostras.	90
Figura 21 - Representação das amostras de queijo tipo Camembert, do produto ideal e dos termos na solução bidimensional na análise CATA. Legenda: CS= queijo tipo Camembert obtido de leite cru; PS= queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado; PR= queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i> GG. (▲)Amostras; (●)Atributos descritivos.....	93
Figura 22 - Representação dos atributos que melhor se correlacionaram com notas altas de aceitação global na solução bidimensional na análise CATA.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química do leite cru e do leite tratado termicamente pasteurizado (n=3).	42
Tabela 2 - Composição físico-química dos queijos após 15 dias de fabricação (n=3).....	43
Tabela 3 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite cru) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (<i>continua</i>).....	54
Tabela 4 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (<i>continua</i>).....	58
Tabela 5 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % de amostras de queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (<i>continua</i>).....	62
Tabela 6 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (<i>continua</i>).....	66
Tabela 7 – Relação dos peptídeos com potencial bioativo descritos na literatura e encontrados nos queijos tipo Camembert fabricados.....	70
Tabela 8 - Explicação (%) da solução multidimensional para o Perfil <i>Flash</i>	85
Tabela 9 - Atributos melhor correlacionados ($ r $) com as duas primeiras dimensões (D1, D2) para cada um dos 15 provadores no Perfil <i>Flash</i>	89
Tabela 10 – Frequência dos provadores que selecionaram cada um dos termos na análise CATA.	91
Tabela 11 – Aceitação global dos queijos tipo Camembert (Média $\pm$ Desvio Padrão) (n=80).	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO.....	17
2.1 Queijo Camembert.....	17
2.2. Fabricação do queijo Camembert.....	19
2.3 Maturação do queijo tipo Camembert.....	20
2.4 Perfil de peptídeos em queijos.....	26
2.5 Peptídeos bioativos (PBA).....	28
2.6 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Esquema geral do trabalho.....	32
3.2.1. Fracionamento dos peptídeos pela solubilidade em pH 4,6 e etanol 70%.....	36
3.2.2 Análise da fração insolúvel em pH 4,6 por Eletroforese Capilar.....	36
3.2.3. Análise da fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70% por MALDI-ToF MS.....	37
3.3. Análise sensorial do queijo Camembert por perfil flash e CATA.....	38
3.5. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados.....	39
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Caracterização físico-química do leite.....	41
4.2. Caracterização físico-química dos queijos.....	42
4.3. Desenvolvimento do pH dos queijos tipo Camembert durante a maturação.....	44
4.4. Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre a proteólise dos queijos tipo Camembert.....	46
4.5. Avaliação de peptídeos dos queijos tipo Camembert.....	48
4.6. Análise sensorial.....	85
4.6.1 Perfil Flash.....	85
4.6.2 CATA (Check-all-that-apply).....	90
5.CONCLUSÕES.....	95

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa	115
ANEXO 2 – Laudo das análise microbiológica dos lotes submetidos á análises sensoriais..	122
ANEXO 3 - Ficha de levantamento de atributos para análise sensorial de perfil-flash.	123
ANEXO 4 – ficha de ordenação dos atributos levantados na análise de perfil flash.	124
ANEXO 5 – ficha de avaliação para a analise sensorial CATA e avaliação global.....	125
ANEXO 6 – Termo de consentimento livre e esclarecido.	126

1. INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos, em especial os queijos, são suscetíveis à hidrólise enzimática de suas cadeias proteicas durante a fermentação e maturação, processo denominado de proteólise. As enzimas envolvidas na proteólise podem ser de natureza endógena e exógena, provenientes do leite, do coagulante residual, do fermento láctico, de culturas secundárias e de microrganismos não provenientes da cultura – as chamadas NSLAB (do inglês, *non starter lactic acid bacteria*) (WALSTRA et al., 2006). A proteólise consiste na mais complexa e importante reação bioquímica envolvida na maturação de queijos, sendo responsável por alterações da dureza, da elasticidade e da capacidade de derretimento, além de afetar também o desenvolvimento de sabor e aroma dos diferentes tipos de queijos (FOX et al., 2000).

O Camembert, que é um queijo macio, de alta umidade e coberto por uma camada branca aveludada originada pelo crescimento do fungo *Penicilium candidum*, apresenta maturação extremamente complexa. Sua proteólise é afetada pelas enzimas naturais do leite (especialmente quando se usa leite cru), pelas enzimas produzidas pela cultura láctica iniciadora acidificante, pelas enzimas produzidas pelas NSLAB, pelo coagulante residual e também pelas enzimas produzidas pela presença do fungo, que tem atividade proteolítica intensa e confere ao queijo Camembert suas características específicas de sabor e aroma (SHAW, 1981; SPINLER; GRIPON, 2004).

Além de conferir propriedades típicas dos diferentes queijos, nas últimas duas décadas, a proteólise tem sido relacionada à formação de peptídeos que podem ter impacto positivo nas funções ou condições corpóreas, resultando em benefícios à saúde (SHAHIDI; ZHONG, 2008). Esses são conhecidos como peptídeos biologicamente ativos, que contém de 2 a 20 aminoácidos em sua estrutura e podem apresentar diferentes bioatividades, tais como atividade anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-trombótica, antioxidante, imuno-moduladora e opióide, dentre outras (SHARMA; SINGH; RANA, 2011). Adicionalmente, peptídeos obtidos durante a maturação de queijos têm sido identificados como potenciais agentes capazes de anular efeitos indesejados associados à ingestão de gorduras saturadas, tais como fatores hipercolesterolêmicos e hipertensivos (CLARE; SWAISGOOD, 2000).

Com base na relação entre proteólise e liberação de peptídeos bioativos, é possível considerar que queijos com intensa atividade proteolítica, como o queijo Camembert, possuam maior probabilidade de apresentarem peptídeos bioativos em sua composição (EXPÓSITO et al., 2012), e que o controle dos parâmetros que afetam a atividade enzimática pode também

afetar a formação de peptídeos bioativos durante a maturação (SIEBER et al., 2010). Estes parâmetros incluem o tratamento térmico do leite, o tipo de cultura láctica e secundária utilizado, o teor de sal, o pH e o tempo de maturação dos queijos.

Embora nenhum trabalho disponível na literatura tenha acompanhado o perfil de peptídeos do queijo Camembert durante a maturação, peptídeos com função imunomodulatória (DIONYSUS et al., 2000), inibidores da enzima conversora de angiotensina (SAITO et al., 2000) e de caráter opióide (PIRAINO et al., 2006; SIENKIEWICZ-SZLAPKA et al., 2008; NONI; CATANNEO, 2010) têm sido relatados em queijo Camembert comercial e em queijo Brie, queijos com características muito semelhantes, ambos maturados por bolores brancos de superfície.

O reconhecimento do potencial de liberação de peptídeos bioativos durante a maturação de queijos impulsionou pesquisas voltadas para a identificação de cepas específicas de bactérias lácticas capazes de favorecer a liberação de peptídeos bioativos a partir da caseína. Assim, o *Lactobacillus helveticus*, uma cultura termofílica, tem sido utilizado na fabricação de queijos duros e semi-duros, enquanto *Lactobacillus rhamnosus*, uma cultura mesofílica, tem sido cada vez mais explorado para a fabricação de queijos moles e frescos, de forma a adequar os diferentes processos tecnológicos à viabilidade destas cepas para liberação de peptídeos bioativos durante a fabricação e maturação dos queijos (CHAMBA; IRLING, 2004).

Baseado nessas premissas, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta no desenvolvimento do perfil de peptídeos do queijo tipo Camembert durante a maturação. Os queijos foram fabricados a partir de leite cru e tratado termicamente, adicionado ou não de *Lactobacillus rhamnosis* GG e maturados por um período de 50 dias. Adicionalmente, foi avaliado o perfil sensorial dos queijos.

2. REVISÃO

2.1 Queijo Camembert

O queijo “Camembert de Normandie AOC”, cujo processo de fabricação serve de padrão para os queijos do tipo Camembert de todo o mundo, é um dos mais famosos da França. Criado em 1791, é fabricado tradicionalmente com leite de vaca cru, segundo as normas da AOC (Appellation d'Origine Controle) outorgadas em 1983. No seu país de origem é, por definição, um queijo de massa mole, obtido por coagulação enzimática, acidificado com culturas lácticas mesofílicas e maturado por mofos superficiais, o *Penicilium camemberti* (HARBUTT, 2011).

De acordo com o “Codex International Individual Standard for Camembert” de 1973 (CODEX STAN C-33, 1973) o queijo Camembert pode ter dois tamanhos: o pequeno, que possui formato cilíndrico com diâmetro de 6 a 8,5 cm, altura de 2,5 a 3,0 cm e peso mínimo de 80 g, e o modelo padrão, com diâmetro de 10 a 11 cm, altura de 3,0 a 3,5 cm e peso mínimo de 250 g. Uma emenda de 2010 o descreve como um queijo cilíndrico, com altura máxima de 5 cm e peso de 80 g a 500 g (CODEX STAN 276, 2011). O queijo Camembert apresenta, em média, 19,8% de proteína, 24,3% de gordura (45% a 55% da gordura no extrato seco) e 51,8% de umidade (USDA, 2016).

A legislação brasileira não apresenta padrão de identidade e qualidade específico para o queijo tipo Camembert, o qual deve respeitar os parâmetros básicos para fabricação de queijos do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, estabelecido pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária através da Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. A única definição referente ao Camembert na legislação brasileira encontra-se no Decreto Estadual Paulista N°12.486, de 20 de outubro de 1978, no qual o queijo Camembert é definido como “O produto obtido de leite integral ou levemente desnatado, não prensado, maturado pelo espaço mínimo de 4 semanas, desenvolvendo-se em sua superfície o fungo *Penicilium camemberti*, gerando uma massa macia, com crosta fina e levemente rugosa de cor marfim ou branco-acinzentada”. O decreto ainda preconiza que o queijo deve possuir umidade máxima de 52% m/m e teor de gordura mínima de 36% m/m (SÃO PAULO, 1978; BRASIL, 1996).

Todos os queijos tipo Camembert são caracterizados por serem cobertos por uma camada aveludada de fungo branco originada pelo crescimento do fungo *P. camemberti* ou *P. candidum* sobre sua superfície. A presença desse fungo confere ao queijo características específicas de sabor e aroma originadas durante a maturação, a qual é mais complexa do que para outras variedades de queijo com microbiota mais simples (SHAW, 1981; SPINNLER; GRIPON, 2004). Em todo o mundo, e mesmo na França, seu país de origem, o queijo Camembert artesanal ou fabricado na fazenda (*artisanal* ou *fermier*, respectivamente) com leite cru divide as prateleiras com o queijo produzido industrialmente (*latier* ou *industriel*), a partir de leite pasteurizado (MASUI; YAMADA, 2004; WISCONSIN, 1990).

Os queijos finos, principalmente os de origem europeia, vêm sendo incorporados ao cardápio brasileiro e representam uma parcela cada vez maior da produção nacional. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2014), o mercado de queijos em geral cresceu 76% entre 2005 e 2013, alcançando um consumo *per capita* de 5,3 kg por ano em 2014. Estima-se que o consumo *per capita* anual de queijos no Brasil deva alcançar 11 quilos, em

média, em 2030. Resultado alavancado não apenas pelo aumento da produção e consumo dos queijos commodities (Muçarela, Prato, Requeijão), mas também pela popularização dos queijos finos (Gorgonzola, Camembert, Brie) dada a crescente penetração desses queijos no mercado (CARVALHO; VENTURINI; GALAN, 2015). De acordo com Pereira (2017), o destaque aos queijos Artesanais no Brasil tem sido crescente nos últimos anos, e o país vive “uma era de ouro” de valorização e conscientização da importância social e cultural de tais produtos.

2.2. Fabricação do queijo Camembert

A fabricação de queijos é essencialmente um processo de desidratação, no qual a caseína e a gordura do leite são concentradas entre 6 a 12 vezes, dependendo da variedade. O protocolo geral de fabricação da maioria dos queijos inclui a acidificação, coagulação, desidratação (corte do coágulo, agitação, aquecimento e outras operações que promovam sinérese do gel), enformagem, prensagem e salga. O teor de umidade dos queijos é regulado pela extensão e combinação dessas etapas básicas de produção, que são comuns para a maioria das variedades de queijos. Além da umidade, o teor de sal, o pH e a microbiota presente no queijo controlam as mudanças bioquímicas que ocorrem durante a maturação e determinam o sabor, o aroma e a textura do produto final (FOX et al., 2000).

Para a fabricação do queijo Camembert utiliza-se uma cultura iniciadora acidificante mesófila e uma cultura secundária constituída de fungo branco, *Penicilium camemberti*. O leite adicionado de cultura iniciadora é maturado no tanque de fabricação antes da adição do coagulante visando ao aumento prévio de sua acidez (~ 22 °D). A coagulação é conduzida à 35 °C e após a adição do coagulante a coagulação ocorre em aproximadamente 40 minutos, resultando em um gel liso e firme, que é cortado através do uso de liras de corte gerando cubos (grãos) de 2 cm de aresta. Os grãos passam por mexedura lenta por um curto período de tempo (15 minutos) e em seguida a massa é enformada juntamente com o soro e deixada em repouso por 1 hora para que então seja possível a realização de 1 a 3 viragens no período de até 5 h. Essas etapas visam à retenção máxima do soro do leite propiciando um queijo de alta umidade, que retém, conseqüentemente, grande parte do coagulante residual que terá papel fundamental no início do processo de maturação deste queijo (SHAW, 1981; VASSAL; GRIPON., 1984). Após a fermentação à 25 °C por 24 h, os queijos são salgados com solução saturada de cloreto de sódio por 1 hora. Em seguida, são secos por 30 minutos e uma suspensão do fungo *Penicilium camemberti* em água esterilizada é aspergida sobre as peças. O queijo é então encaminhado à câmara climática para o início de sua maturação (SHAW, 1981).

A maturação inicial é realizada sob alta umidade relativa e baixa temperatura (UR% 90 a 12 °C) durante 10 a 15 dias. Tais condições visam principalmente à manutenção da umidade necessária para o crescimento do fungo superficial, principal agente de maturação desse queijo. Após o recobrimento do queijo pelo fungo, os queijos são embalados em papel manteiga ou papel alumínio e armazenados sob refrigeração (4 °C) por até 60 dias para que a maturação prossiga. O rendimento médio do queijo Camembert é de 1 kg de queijo para cada 7 a 8 litros de leite (SHAW, 1981; SPINNLER; GRIPON, 2004).

2.3 Maturação do queijo tipo Camembert

A maturação é o processo natural de envelhecimento dos queijos decorrente de uma série de reações que levam a alterações em suas características físicas, bioquímicas, microbiológicas e principalmente sensoriais. A maturação de queijos em geral envolve diversas mudanças bioquímicas que podem ser agrupadas em eventos primários – como o metabolismo da lactose residual (glicólise), do lactato e do citrato, a proteólise e a lipólise – e eventos secundários – o metabolismo de ácidos graxos e de aminoácidos, essenciais para o desenvolvimento de compostos de aroma e sabor de queijos maturados (MCSWEENEY, 2004).

Os agentes que participam destas reações são as enzimas naturais do leite, enzimas do coagulante residual utilizado na fabricação dos queijos, enzimas provenientes da cultura láctica iniciadora e/ou da cultura secundária, e enzimas provenientes de outras bactérias ácido lácticas, que não as adicionadas através das culturas lácticas – as chamadas NSLAB (do inglês, *non start lactic acid bacteria* ou bactérias ácido lácticas não iniciadoras) (FOX et al., 2000).

Considerando o papel das enzimas naturais do leite na maturação dos queijos, especialmente das enzimas proteolíticas e lipolíticas, é de se esperar que o tratamento térmico do leite afete a maturação. O leite contém aproximadamente 70 enzimas diferentes, as quais, na sua maioria, chegam ao leite durante a síntese e expulsão do glóbulo de gordura do citoplasma das células secretoras para o lúmen da glândula mamária. Muitas dessas enzimas são inativadas pelo tratamento térmico e muitas não têm papel tecnológico reconhecido (FOX et al., 2015). A principal enzima proteolítica natural do leite é a plasmina, uma protease serina de origem sanguínea com atividade ótima em pH próximo de 7,5 e temperatura de 37°C. A plasmina degrada com maior facilidade as frações β -caseína e α_{s2} -caseína do que a fração α_{s1} -caseína. A κ -caseína é resistente à ação da plasmina e não sofre hidrólise de sua cadeia peptídica original (BASTIAN; BROWN, 1996). Em queijos, a β -caseína é o mais importante substrato para a ação da plasmina, clivando sua cadeia peptídica em três sítios: Lys28–Lys29, Lys105–His106 e Lys107–Glu108, produzindo os peptídeos γ 1-CN (β -CN f29–209), γ 2-CN (β -CN f106–209),

γ 3-CN (β -CN f108–209), protease peptona PP8-f (β -CN f1–28), PP8-s (β -CN f29–105 e f29–107) e PP5 (β -CN f1–105 e 1–107) (MCSWEENEY, 2004).

Embora a ação da plasmina, uma enzima termoestável, seja mais significativa para a maturação de queijos de massa cozida, ela é relativamente importante nos queijos maturados por fungos, como o queijo Camembert. O pH do queijo tende a aumentar durante a maturação, caminhando rumo ao pH ótimo de atuação da plasmina ($\sim 7,5$) e afastando-se do pH ótimo de atuação da enzima coagulante quimosina ($\sim 5,5$). No final da maturação do queijo Camembert, observa-se um aumento expressivo de γ -caseínas, resultantes da degradação da β -caseína pela ação da plasmina, que têm ao final da maturação o pH próximo ao ideal para sua atuação (BASTIAN; BROWN, 1996; SPINNLER; GRIPON, 2004; FOX et al. 2004).

Além da plasmina, o leite possui diversos tipos de enzimas proteolíticas endógenas, provenientes de leucócitos e células somáticas. No entanto, das enzimas provenientes destas fontes, apenas catepsina B e D já foram quantificadas de maneira relevante no leite, sendo que a importância da catepsina B para a maturação de queijos é desconhecida. A similaridade da ação da catepsina D e da quimosina durante a maturação de queijos dificulta a análise de seu comportamento isoladamente. De qualquer modo, a contribuição destas enzimas para a maturação de queijos dos mais variados tipos, principalmente os fabricados com leite pasteurizado, tem se mostrado limitada quando comparada a outras enzimas proteolíticas presentes (O'DRISCOLL et al., 1999; MCSWEENEY; FOX; OLSON, 1995).

Uma das principais fontes de enzimas proteolíticas na maioria dos queijos é o coagulante residual proveniente da própria fabricação dos queijos, que permanece preso à sua massa após a drenagem do soro. A quimosina, coagulante comumente utilizado na fabricação de queijos, possui especificidade para cada uma das frações de caseína conhecidas. Sua principal função na fabricação de queijos é a coagulação do leite pela hidrólise da ligação Phe105-Met106 da κ -caseína, tendo essa fração mais susceptibilidade à ação da quimosina do que as outras frações da caseína. Após a hidrólise da κ -caseína, a micela se desestabiliza e se rearranja, formando a para-caseína, que na presença de cálcio ($32 - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) precipita na forma de paracaseinato de cálcio, que é o próprio gel (FOX et al., 2000).

O processo de fabricação reflete diretamente na quantidade e na atividade do coagulante residual que permanece durante a maturação do queijo. Geralmente, a aplicação de tratamento térmico à massa e prensagem – como utilizado para queijos Suíço e Parmesão ($52-54^{\circ}\text{C}$) – resulta em menor retenção do coagulante na massa (cerca de 15% da quantidade inicial). Para queijos de massa crua e de alta umidade, como o queijo Camembert, cerca de 50% do

coagulante, em relação à concentração inicial, permanece na massa. Dessa forma, o coagulante residual interfere significativamente na maturação do queijo e se caracteriza como um dos primeiros fatores a iniciar tal processo, aumentando a suscetibilidade da proteólise à atuação de outros agentes (VASSAL et al., 1984).

Nas primeiras 6 horas após a dessoragem do queijo, ocorre intensa degradação da α_{s1} -caseína pelo coagulante, com produção de peptídeos de grande massa molecular, como a α_{s1} -I-casein (α_{s1} -CN f24-199). Após cerca de 2 semanas, com o aumento expressivo do pH e distanciamento do pH ótimo de ação das enzimas presentes no coagulante, sua ação é praticamente inexistente e a ação das enzimas provenientes do fungo de maturação são muito mais intensas e expressivas, assim como a ação das enzimas provenientes da cultura iniciadora acidificante (MCSWEENEY, 2004; SPINLER; GRIPON, 2004).

As culturas iniciadoras possuem importante papel na maturação de queijos em geral. Estas são culturas de bactérias ácido lácticas (BAL) homo ou heteroláticas que têm por função primária a acidificação do leite através de seu metabolismo e reprodução, para a produção de queijos e fermentados lácteos (TAMIME; SKRIVER; NILSSON, 2006). As BAL são bactérias fastidiosas que necessitam de ambiente rico nutricionalmente. Para tanto, possuem um complexo sistema proteolítico capaz de degradar grandes proteínas em pequenos peptídeos ou até aminoácidos livres assimiláveis; o complexo sistema de proteinases e peptidases das BAL, portanto, são essenciais para a maturação de queijos (HAYEK; IBRAHIM, 2013).

Esse grupo de micro-organismos possui ligada à sua membrana celular uma protease extracelular (Figura 1), que geralmente é responsável pelo início da quebra das moléculas de caseína do substrato. No geral, as bactérias lácticas possuem apenas uma proteinase extracelular, mas a presença de duas dessas enzimas já foi identificada em alguns lactobacilos (PEDERSON et al., 1999). Em algumas bactérias, como *L. lactis* e *Lb. paracasei*, a existência de uma lipoproteína ligada à membrana (PrtM) é essencial para a ativação autocatalítica da proteinase. Ao quebrar a caseína em peptídeos menores, sistemas de transporte (Opp: oligopeptídeo permeasse; Dpp: permeasse de peptídeos de 2 a 9 resíduos; DtpT: permeasse ionizada de di e tripeptídeos) presentes na membrana celular são capazes de transferi-los para o interior da célula para que sejam hidrolisados por peptidases em aminoácidos livres, assim peptidases internas das bactérias ácido lácticas podem metabolizá-los (HAANDRIKMAN et al., 1991).

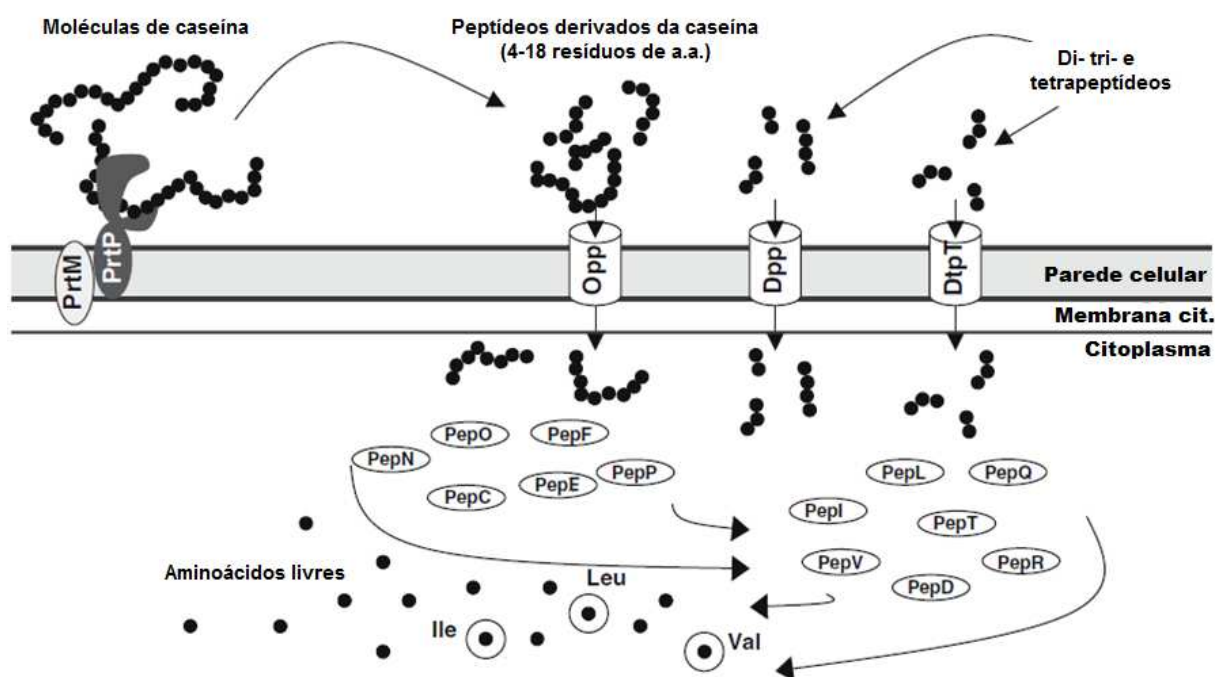


Figura 1 – Representação simplificada do sistema proteolítico de bactérias lácticas (adaptado de SAVIJOKI et al., 2006).

As BAL contêm no interior de suas células diversas peptidases com grande importância nos estágios finais da proteólise em queijos durante sua maturação e na liberação final de aminoácidos livres como substratos para reações catabólicas. As BAL em geral produzem três tipos de oligoendopeptidases em maior quantidade: PepO, PepF e PepE, sendo esta última dependente de grupamentos tiol na clivagem de peptídeos. As BAL produzem também tripeptidases e diversas aminopeptidases em menor escala que possuem ação mais branda e de pouca relevância para a maturação (KUNJI et al., 1996).

As culturas iniciadoras utilizadas na fabricação do queijo Camembert são culturas mesófilas homofermentativas do gênero *Lactococcus* que rapidamente iniciam a metabolização da lactose, levando à produção de ácido láctico (lactato) pela metabolização via hexose difosfato. A intensa acidificação do coágulo durante as primeiras 24 horas de fabricação do queijo levam o pH a cerca de 4,6 no momento da retirada da forma e eleva a concentração de lactato no queijo (SPINNLER; GRIPON, 2004).

Tais culturas correspondem a microrganismos adicionados intencionalmente no leite para a fabricação dos queijos, mas podem ocorrer naturalmente na matéria-prima (NSLAB). São também chamadas de cultura acidificantes, como uma forma de serem diferenciadas das culturas secundárias, que têm a finalidade de desenvolverem características típicas dos diferentes queijos, incluindo características sensoriais. As culturas secundárias podem ser de

origem bacteriana (e.g. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*; *Lactobacillus helveticus*; *Brevibacterium linens*) ou fúngica (e.g. *Penicillium roqueforti*; *Geotrichum candidum*; *Penicillium camemberti*) (SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

A cultura secundária utilizada na fabricação do queijo Camembert é o *Penicillium camemberti*, que é um fungo filamentosos da família Trichocomaceae que possui diversos sinônimos e cepas mutantes como *P. caseicolum*, *P. album* e *P. candidum*. Este é um fungo aeróbio com o pH ideal de crescimento entre 4,5 a 6,7; temperatura ótima de crescimento ao redor de 13°C, umidade relativa do ar necessária de 93 - 94%, capacidade de crescer em meios com até 20% de NaCl e tem como produto do seu desenvolvimento enzimas proteolíticas e lipolíticas (RATTRAY; HANSEN, 1999). *P. album* e *P. candidum* são nomes comumente usados para mofos brancos utilizados na maturação de queijos brancos moles, mas a distinção entre estes dois mofos não é mais cientificamente válida, uma vez que pesquisas os têm identificado como cepas do mesmo *P. camemberti* utilizado industrialmente na produção de queijo Camembert e Brie (DONNELLY; KEHLER, 2016).

Este fungo superficial que cresce sobre o queijo nos primeiros dias de maturação consome o lactato presente na massa. Com isso, há o aumento do pH externo do queijo e a migração do lactato do interior para a superfície do queijo criando um gradiente de pH. Assim, o pH da superfície aumenta até a neutralidade ao redor de 7,0 ao final da maturação (LECLERCQ-PERLAT et al., 2004a).

De acordo com Spinnler e Gripon (2004), o aumento do pH resulta em efeitos importantes durante o processo de maturação: **i)** desenvolvimento de bactérias mais sensíveis a meios ácidos, como os *Micrococcus* e corineformes, que se desenvolvem quando o pH se torna menos ácido, contribuindo para o sabor e aroma tradicional do queijo; **ii)** o favorecimento da atividade da maioria das enzimas responsáveis pela maturação, principalmente proteolíticas, uma vez que estas têm pH ótimo de ação perto da neutralidade; **iii)** a migração de minerais da massa; o cálcio e fósforo migram para o exterior da massa durante o crescimento do fungo devido ao gradiente de pH existente entre o interior e o exterior do queijo. O alto pH da superfície causa a formação de fosfato de cálcio insolúvel tornando a casca mais dura e concentrando cerca de 80% do cálcio e 55% do fósforo total do queijo na casca; **iv)** favorece a dissociação e solubilização das proteínas, afetando as características reológicas do queijo e tornando-o mais macio.

O fungo *P. camemberti* inicia seu crescimento sobre a superfície do queijo logo após sua deossora e tem seu desenvolvimento e recobrimento total após cerca de 10 dias. Durante esse período, há intensa produção de endo e exopeptidases, como metaloproteinase e

aspartilproteinase, que possuem pH ótimo em 5,5-6,0 e 4,0, respectivamente. Sua atividade é baixa no centro do queijo; no entanto, na superfície aumenta substancialmente após os primeiros 6 ou 7 dias de maturação, quando o fungo começa a recobrir todo o produto (LENOIR, 1984).

As peptidases são hidrolases catalíticas que rompem ligações peptídicas (C-N) na presença de água, liberando peptídeos menores e/ou aminoácidos livres. A aspartil proteinase e a metaloproteinase atingem sua concentração máxima ao redor do décimo quinto dia de fabricação, período no qual este é embalado e refrigerado, cessando quase totalmente o crescimento do fungo e permitindo a ação das enzimas de forma estável durante todo o período de maturação, o que resulta na produção de muitos peptídeos e aminoácidos livres no queijo (SPINNLER; GRIPON, 2004; RAWLINGS, 2013).

A amônia livre (NH_4^+) produzida pelas deaminases do fungo superficial do queijo através do catabolismo de aminoácidos, além de indicador de proteólise é também um forte composto aromático que tem função importante no amaciamento do queijo Camembert. Isso ocorre devido ao aumento da concentração de amoníaco no ambiente de maturação. A amônia livre estimula a flora superficial aumentando o pH da superfície, estimulando a difusão de ácido láctico e cálcio na superfície, promovendo a proteólise (LAW; TAMIME; 2010). Assim, a proteólise no queijo Camembert é a principal reação bioquímica responsável pelo desenvolvimento de textura e principalmente do sabor levemente amargo e aroma amoniacal deste queijo, cada vez mais intensos no decorrer da maturação ocasionada por peptidases fúngicas e bacterianas (ENGEL et al., 2001; LEMIEUX; SIMARD, 1992).

Paralela às reações proteolíticas, a lipólise decorrente da ação de lipases tem papel fundamental na maturação de queijos em geral. As lipases são enzimas capazes de hidrolisar os triacilgliceróis (TAG) em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. Essa reação no queijo Camembert ocorre em menor grau e está relacionada à sua textura e principalmente ao seu sabor e aroma. Ademais, os monoacilgliceróis formados também atuam como emulsificantes, promovendo uma textura mais macia ao palato e modificando a cinética de liberação de aromas (MIETTINEN et al, 2002; FOX et al., 2000).

O *P. camemberti* produz grandes quantidades de lipase alcalina extracelular, com pH ótimo de atuação por volta de 9,0. Em pH 6,0, a enzima possui apenas 50% de sua atividade máxima e permanece ativa mesmo em temperatura de refrigeração (4 °C). Essa enzima é o principal promotor de lipólise em queijo Camembert, sendo mais ativa em TAG compostos por ácidos graxos voláteis de baixo peso molecular (LAMBERET; LENOIR, 1976; SPINNLER; GRIPON, 2004). A lipólise não é homogênea por todo o queijo Camembert, é muito mais intensa na superfície do que no seu interior.

Em resumo, a maturação do queijo Camembert é influenciada por diversos fatores e é certamente governada pela cultura iniciadora acidificante e cultura secundária, mas também é dependente do equilíbrio e das mudanças de pH, umidade, sais e outros componentes do queijo que vão sendo alterados durante todo o período de maturação. Tais mudanças propiciam não somente a geração de compostos de sabor e aroma como também a potencial presença de peptídeos de caráter funcional, os denominados peptídeos bioativos (ABRAHAM et al., 2007). A associação da proteólise e da lipólise com o aumento do pH rumo à neutralização no queijo Camembert conferem-lhe suas características de textura particulares (HASSOUNA; GUIZANI, 1995).

2.4 Perfil de peptídeos em queijos

O perfil de peptídeos de queijos, ou seja, a diversidade de pequenas frações proteicas originadas da hidrólise e quebra de ligações peptídicas decorrentes da ação de diferentes agentes proteolíticos, é um dos fatores de maior influência para a diferenciação das características sensoriais, funcionais e até tecnológicas dos produtos (FOX et al., 2015).

Através do estudo peptidômico de diferentes tipos de queijos, em que a cinética de maturação se diferencia por fatores como tipo de cultura acidificante, secundária e adjunta, tipo e tratamento térmico do leite, tratamento da massa e ambiente de maturação, entre outros, pode-se obter, além da diferenciação dos peptídeos produzidos, um meio de pesquisa para peptídeos com potencial bioativo. É ainda possível estabelecer um mapeamento do comportamento hidrolítico dos agentes proteolíticos envolvidos em cada tipo e tratamento de queijo (SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2013; SFORZA et al., 2012).

Os diferentes agentes proteolíticos possuem especificidades para sítios de clivagem de cada uma das frações proteicas presentes no leite, de modo que, ao manipularmos tais agentes, favorecendo-os ou suprimindo-os, podemos modificar o perfil de peptídeos e, em segundo plano, direcionar a produção ou degradação de peptídeos de interesse funcional, sensorial e/ou tecnológico (MALIN; TUNICK, 1995).

O tratamento térmico do leite é um dos principais fatores que afetam o seu perfil enzimático natural e consequentemente a maturação dos queijos. Entre outros efeitos, o tratamento térmico do leite inativa uma série de enzimas, a maioria delas com atividade tecnológica desconhecida. A plasmina, principal enzima proteolítica do leite, que é de fato um complexo sistema constituído de plasmina, plasminogênio e ativador de plasminogênio associados à micela de caseína, e inibidor de plasmina e ativador do ativador de plasminogênio

na fase soro, pode ser, dependendo de vários outros fatores, parcialmente inativada no tratamento térmico. No entanto, estão presentes e ativas no queijo fabricado com leite cru. A plasmina tem especificidade para a fração β -caseína, sendo os principais sítios de clivagem para essa fração as ligações Lys²⁸-Lys²⁹, Lys¹⁰⁵-His/Gln¹⁰⁶, Lys¹⁰⁷-Glu¹⁰⁸, produzindo em grande quantidade fragmentos como β -CN f(1-28); β -CN f(29-209); β -CN f(29-105/7); β -CN f(106-209); β -CN f(108-209) e β -CN f(1-105/7) (FOX et al., 2000).

Outros agentes proteolíticos, como o próprio coagulante residual e os microrganismos das culturas lácticas acidificantes e secundárias, possuem sítios de hidrólise específicos que sugerem o caminho de degradação das proteínas e a formação de peptídeos durante a maturação dos queijos. A quimosina, por exemplo, hidrolisa a fração κ -caseína na ligação peptídica Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, mas também tem ação relevante sobre a fração α_{s1} -caseína. A principal e primordial ação da quimosina nos primeiros dias após a fabricação dos queijos é sobre a ligação Phe²³-Phe²⁴ da α_{s1} -caseína, que tem influência tecnológica, sendo responsável pelo amaciamento dos queijos. Atualmente, reconhece-se também sua importância funcional, uma vez que o fragmento α_{s1} -CN f(1-23) formado após essa reconhecida hidrólise da quimosina é subsequentemente hidrolisado, produzindo peptídeos de baixo peso molecular potencialmente bioativos. De forma menos relevante, a ação da quimosina também é relatada sobre a fração α_{s2} -caseína (JYN et al., 2016; FOX, 2000).

Os diferentes tipos de culturas também definem o perfil de peptídeos dos queijos, uma vez que estas possuem não apenas sistemas proteolíticos exógenos diversos, mas também liberam uma considerável quantidade e variedade de enzimas após a lise celular durante a maturação. Estas enzimas possuem diferentes sítios de clivagem das frações caseicas, que resultam em uma grande variedade de peptídeos. Por exemplo, é reconhecida a ação de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, comumente utilizadas como cultura acidificante nos mais diversos queijos, sobre a fração α_{s1} -CN f(1-23) nos sítios de ligação His⁸-Gln⁹; Gln⁹-Gly¹⁰; Gln¹³-Glu¹⁴; Leu¹⁶-Asn¹⁷ e Leu²¹-Arg²². As cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* agem sobre diversos sítios de ligação da α_{s1} -CN como na ligação Phe²³-Phe²⁴, produzindo o peptídeo α_{s1} -CN f(1-23), e na ligação Asn¹⁷-Glu¹⁸ e Leu¹⁶-Asn¹⁷ deste mesmo peptídeo formado. A produção destes pequenos fragmentos e aminoácidos livres tem relevante influência na produção de peptídeos funcionais e desenvolvimento de sabor e aroma, respectivamente. A ação de cepas de *Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus* e *Lb. paracasei* também têm sido documentada como fatores de importância para a diferenciação do perfil de peptídeos em produtos lácteos. (MCSWEENEY, 2004; FOX, 2000; ANDREWS; VARLEY, 1994).

Por fim, o uso de culturas adjuntas tem também relevante papel na alteração e desenvolvimento de um perfil de peptídeos característico, principalmente em queijos em que tal cultura tem protagonismo na proteólise (queijos maturados por fungos, queijos com olhaduras, queijos adicionados de probióticos etc). Cepas fúngicas de *P. roqueforti* e *P. candidum*, por exemplo, produzem proteinases com reconhecida especificidade sobre as frações α_{s1} - e β -caseína. As proteinases produzidas pelo *P. camemberti* hidrolisam mais rapidamente a fração α_{s1} -caseína, originando principalmente a fração α_{s1} -CN f(24-199); no entanto, as proteinase ácidas, mais ativas no início da maturação, possuem como principais sítios de clivagem reconhecidos as ligações Lys¹⁹⁷-Val¹⁹⁸; Lys⁹⁹-Glu¹⁰⁰ e Lys²⁹-Ile³⁰ (UPADHYAY, 2004; GRIPON, 1993).

2.5 Peptídeos bioativos (PBA)

Peptídeos bioativos (PBA) são fragmentos obtidos pela hidrólise das proteínas por enzimas proteolíticas que podem ter um impacto positivo nas funções ou condições corpóreas, resultando em benefício à saúde. São, portanto, peptídeos com atividade similar a fármacos ou hormônios, que eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo de diversos órgãos, levando à indução de respostas fisiológicas em benefício à saúde (KASTIN, 2013; KITTS; WEILER, 2003).

A atividade dos PBA é dependente de sua composição, e consequentemente da sequência dos resíduos de aminoácidos na cadeia proteica. O tamanho das sequências ativas pode variar de dois a vinte resíduos de aminoácidos e muitos peptídeos são conhecidos por exibirem propriedades multifuncionais. As proteínas do leite são consideradas a fonte mais importante de PBA; nas últimas décadas, mais de 200 sequências peptídicas biologicamente ativas foram identificadas a partir de caseínas e proteínas do soro da maioria dos animais leiteiros. Tal potencial de produção de PBA está relacionado à facilidade de hidrólise devido à conformação aberta da caseína e ao baixo nível de estruturação secundária e terciária decorrente da abundante presença de prolina em suas cadeias primárias (MEISEL; FITZGERALD, 2003).

Os PBA encontrados no leite possuem diversos efeitos sistêmicos no organismo, dentre os quais anti-hipertensivo, anti-trombótico, antimicrobiano, antioxidante, imuno-modulador e opióide (SHARMA; SINGH; RANA, 2011). A ocorrência de tais peptídeos em produtos lácteos tem sido relacionada à baixa incidência de obesidade e problemas cardiovasculares na população francesa, que tem sua dieta e gastronomia toda baseada em produtos lácteos substancialmente gordurosos. Essa associação tem sido chamada por alguns autores de “paradoxo francês” (PETYAEV; BASHMAKOV, 2012).

De modo geral, os PBA podem ser produzidos biologicamente a partir das proteínas do leite das seguintes maneiras: por hidrólise a partir de enzimas digestivas, pela fermentação do leite por culturas proteolíticas iniciadoras ou secundárias e por enzimas proteolíticas derivadas de microrganismos ou vegetais. Muitos estudos relatam que a combinação de métodos pareados, como a prévia hidrólise enzimática e posterior ação de enzimas proteolíticas ou fermentação, resultam na maior probabilidade de formação de peptídeos de cadeia curta de caráter bioativo (KORHONEN; PIHLANTO, 2003; ARDO et al. 2009; AZARNIA et al., 2010; LIU; PISCHETSRIEDER, 2017).

O sistema proteolítico de bactérias lácticas é adequado para produzir PBAs a partir de várias proteínas alimentares, especialmente caseínas, que constituem o principal substrato de nitrogênio presente em derivados lácteos (CLARE; SWAISGOOD, 2000). A hidrólise extracelular das proteínas do leite convertida em vários oligopeptídeos longos é iniciada por uma proteinase ligada à membrana celular (PMC), que possui preferência por caseínas hidrofóbicas. Oligopeptídeos são gerados por esta primeira clivagem e são subsequentemente recolhidos pelas células bacterianas através de sistemas de transporte específicos; no citoplasma, tais peptídeos sofrem uma maior degradação em peptídeos mais curtos (bioativos ou possíveis precursores de compostos bioativos) e aminoácidos (SAVIJOKI et al., 2006).

Sabe-se atualmente que diversas espécies e cepas de bactérias lácticas são capazes de liberar PBA a partir de proteínas alimentares, com especial referência às caseínas do leite, incluindo cepas *L. helveticus* CP790, *Lb. rhamnosus* GG, *L. bulgaricus* SS1, e *L. lactis* subsp. *cremoris* FT4 (GOBBETTI et al., 2002; LIU; PISCHETSRIEDER, 2017). A capacidade hidrolítica de cada cepa é estritamente relacionada ao substrato proteico, isto é, a produção de PBA está relacionada à sua sequência de aminoácidos e ao painel de enzimas proteolíticas de cada estirpe microbiana (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

A utilização de cepas de culturas acidificantes termofílicas visando à produção de peptídeos bioativos, como o *L. helveticus* para queijos duros, semi-duros e leites fermentados, e de mesofílicas, como a *Lb. rhamnosus* para queijos moles e frescos, tem sido cada vez mais explorada, de forma a adequar os diferentes processos tecnológicos à viabilidade destas cepas para fermentação, acidificação e produção dos PBA (CHAMBA; IRLING, 2004).

Os queijos Camembert e Brie, bem como todos os queijos maturados por fungos e/ou culturas secundárias que favoreçam o avanço da proteólise ao longo da maturação, têm sido constantemente alvo de estudos que visam pesquisar e quantificar seus peptídeos funcionais, bem como verificar a atividade destes compostos pós-ingestão. Dionysus et al. (2000) observaram a presença de dois peptídeos bioativos no queijo Camembert comercial, derivados

da β -caseína [β -CN (f193-209) e β -CN (f192-209)] com funções imunomodulatórias. Saito et al. (2000) também relatam a presença de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) em queijo Camembert. Peptídeos de caráter opióide são uma das classes mais relacionadas com queijos maturados por fungos brancos. A presença de β -casomorfina em queijo Brie foi relatada por Piraino et al. (2006), Sienkiewicz-Szlapka et al. (2008) e Noni e Cataneo (2010).

2.6 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria Gram-positiva, heteroláctica, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa ou microaerófila, não-móvel e catalase-negativa, pertencente ao grupo dos micro-organismos mesófilos, com algumas cepas capazes de crescer em temperaturas inferiores a 15°C ou superiores a 40°C. Seu desenvolvimento requer uma grande quantidade de vitaminas e minerais, incluindo ácido fólico, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e cálcio mineral. A faixa de pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 4,5 e 6,4. A dimensão das células em forma de bastonete é de 0,8-1,0 μm de largura e de 2,0 a 4,0 μm de comprimento (CURRY; CROWN, 2004).

Lb. rhamnosus GG (ATCC 53103; LGG), também conhecido pelo nome de *Lactobacillus* GG (275), é uma das cepas probióticas mais conhecidas. A estirpe é classificada como da espécie *Lb. rhamnosus*, de caráter mesofílico, com temperatura de crescimento entre 2,6°C e 52°C, com temperatura ótima situada em 44,4 °C (SAXELIN; KAJANDER, 2008; VALIK et al. 2008). A ampla faixa de temperatura de crescimento desta bactéria faz com que ela permaneça viável durante todo o processo de fabricação e estocagem refrigerada do produto final (MENDES et al. 2014).

A cepa de origem entérica possui capacidade de inibir a adesão de *Clostridium histolyticum*, *C. difficile* e *Salmonella enterica* e possui uma alta tolerância às condições ácidas do estômago, sobrevivendo à passagem intestinal, com capacidade de aderir à mucosa e colonizar o trato gastrointestinal. Devido à sua reconhecida atividade probiótica e antimicrobiana, *Lb. rhamnosus* GG é utilizado na indústria alimentar não só como probiótico, mas também como uma cultura de proteção para produtos lácteos, bebidas, entre outros (RODGERS, 2001; TUOMOLA et al., 2000).

Diversos estudos têm notificado o potencial proteolítico da cepa para a produção de peptídeos bioativos (MÖLLER et al., 2008; GOBBETTI et al., 2002). A cepa possui sistema proteolítico mais eficiente e diversificado do que bactérias comumente utilizadas como culturas iniciadoras, possuindo 2 proteases ligadas à membrana celular e 23 peptidases internas com

ataque preferencial de frações α_{s1} -caseína e peptídeos ricos em prolina da β -caseína (LIU et al., 2010; SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006). Estudo realizado por Guo et al. (2016) sobre o perfil de hidrólise de cepas de *Lb. rhamnosus* também identificou uma taxa de hidrólise mais alta na fração β -caseína, em comparação com α_{s1} -caseína e k-caseína, com os locais de clivagem da caseína β mediada pela proteinase ligada à sua parede celular não concentrados nas porções N- ou C-terminal da molécula, mas dispersos ao longo de toda a sequência de aminoácidos (Figura 2).

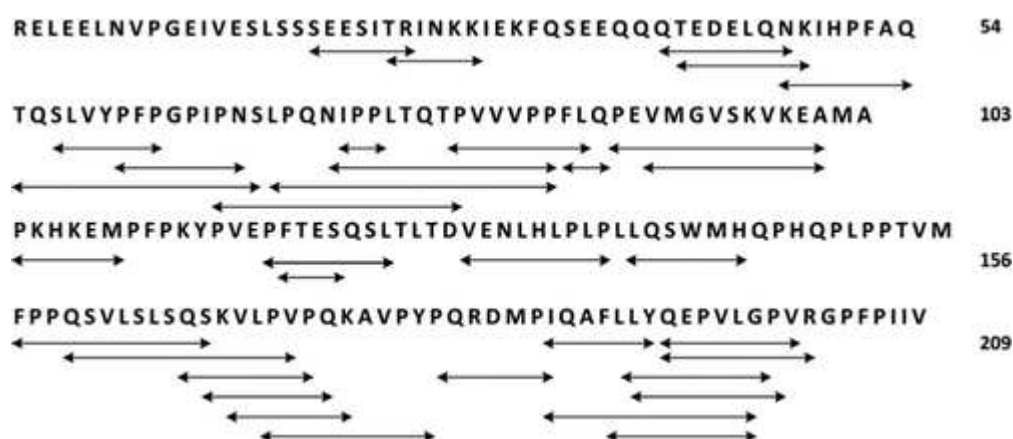


Figura 2 – Sítios de clivagem da β -caseína identificados para a cepa de *Lb. rhamnosus* (GUO et al., 2016).

Proteínas do leite hidrolisadas por *Lb. rhamnosus* GG demonstraram efeitos de estímulo e supressão na proliferação de linfócitos; ademais, os hidrolisados podem induzir o aumento de citocinas anti-inflamatórias e reduzir, de modo paralelo, citocinas pró-inflamatórias e imunoglobulinas produzidas por linfócitos, controlando assim reações alérgicas e inflamatórias de modo sistêmico (DELCENSERIE et al., 2008).

Diversos trabalhos têm utilizado *Lb. rhamnosus* GG ou suas enzimas isoladas na fabricação de queijos, tanto para estudo da sua capacidade probiótica como para estudo da sua viabilidade e capacidade proteolítica durante a maturação em queijos Manchego (GONZÁLEZ-OLIVARES et al., 2014), Karish (MAHMOUD; EL-HALMOUCH; MONTASER, 2013), Coalho (DOS SANTOS et al., 2015), Edam (ALJEWICZ; NALEPA; KOWALSKA, 2014), Cheddar (AZARNIA et al., 2010), e em queijo fresco com apelo probiótico (LAHTINEN et al., 2012). No entanto, os estudos não correlacionam os perfis de peptídeos obtidos com peptídeos bioativos descritos na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Esquema geral do trabalho

O esquema geral do trabalho, realizado em triplicata de processo, é apresentado na Figura 3. Inicialmente, 200 litros de leite cru foram divididos em duas porções de 100 litros, sendo que uma delas foi pasteurizada (65 °C/30 min). Em seguida, cada porção foi subdividida em duas porções de 50 litros que foram utilizadas para a fabricação do queijo tipo Camembert. O leite cru e o leite pasteurizado foram adicionados de cultura láctica tipo O, constituída de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, ou de cultura láctica tipo O e cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lb. rhamnosus* GG; ATCC 53103). Os queijos foram fabricados de acordo com metodologia descrita no item 3.3 e após fermentação por 24 horas foram pulverizados com solução de *Penicillium candidum* e maturados por 50 dias. De acordo com este esquema de trabalho, para cada processamento foram obtidos quatro lotes de queijos, submetidos às seguintes variações de tratamento térmico e adição de cultura adjunta: **1)** queijo tipo Camembert fabricado com leite cru adicionado de cultura láctica tipo O, identificado neste trabalho como queijo tipo Camembert (leite cru); **2)** queijo tipo Camembert fabricado com leite cru utilizando cultura láctica tipo O e cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG, identificado neste trabalho como queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) **3)** queijo tipo Camembert fabricado com leite pasteurizado adicionado de cultura láctica tipo O, identificado neste trabalho como queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); **4)** queijo tipo Camembert fabricado com leite pasteurizado adicionado de cultura láctica tipo O e cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG, identificado neste trabalho como queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*). No 15º dia seguinte após a fabricação os queijos foram caracterizados quanto à composição centesimal. Durante a maturação, periodicamente e a intervalos pré-estabelecidos, os queijos foram avaliados na superfície e no interior quanto ao pH. A proteólise foi avaliada através do acompanhamento da hidrólise das frações caseicas (α -, β - e κ -Caseína) por eletroforese capilar e da formação de peptídeos por espectrometria de massas (MALDI-ToF). Foram realizadas também análises sensoriais de perfil flash e “check all that apply” (CATA) para levantar descritores sensoriais e avaliar a resposta sensorial dos queijos ao período final de maturação avaliada (50 dias).

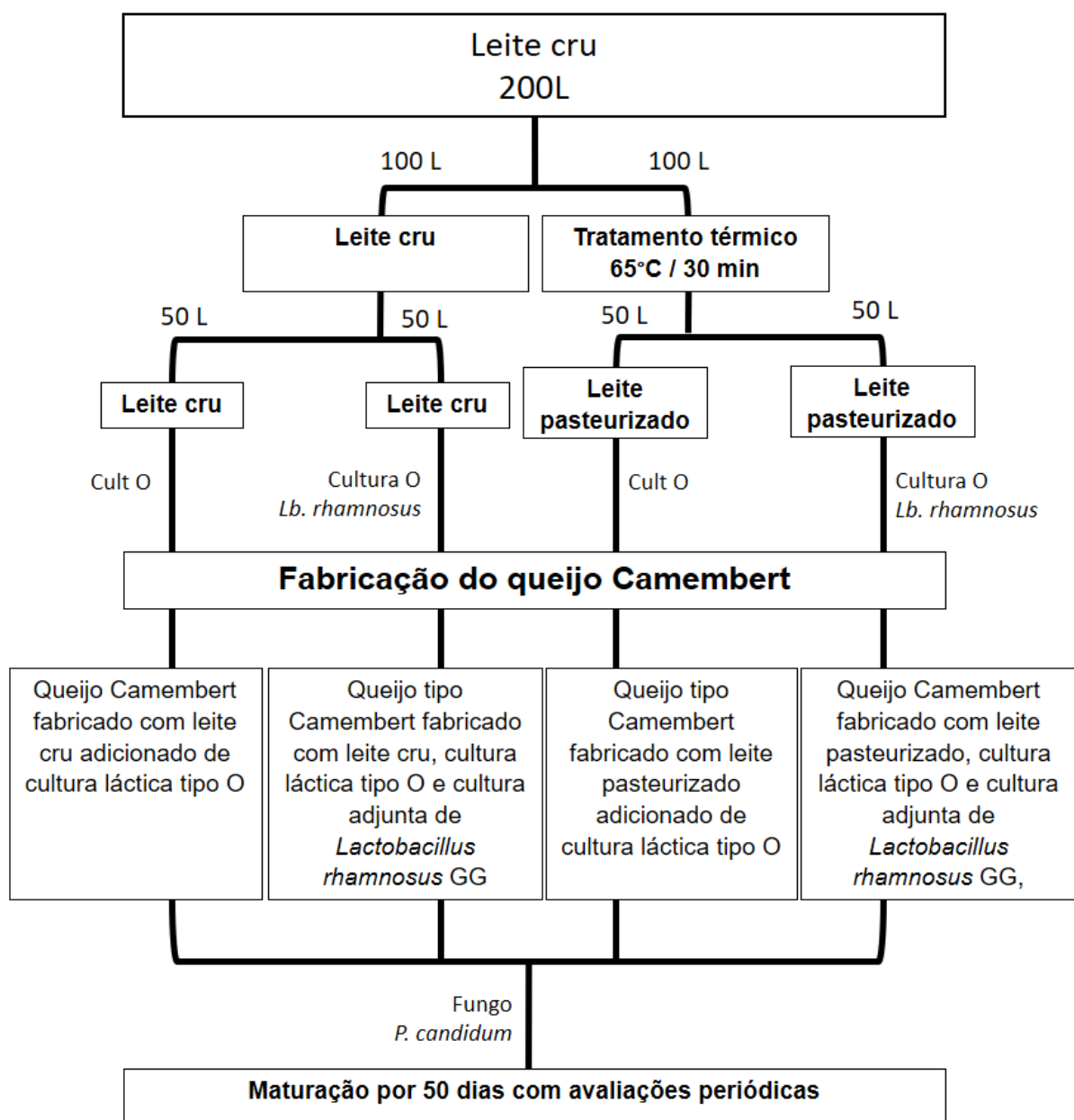


Figura 3 – Esquema geral do trabalho.

3.2. Caracterização do leite cru, tratamento térmico e caracterização do leite tratado termicamente

O leite utilizado foi obtido de vacas da raça Holandesa da ordenha do departamento de zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), refrigerados imediatamente e processados em até 2 horas após a ordenha. Imediatamente após a recepção, uma amostra homogênea do leite cru foi avaliada quanto ao pH, utilizando-se potenciômetro devidamente calibrado, acidez titulável (AOAC, 2006i), densidade a 15 °C através de termolactodensímetro, gordura pelo método de Gerber (AOAC, 2006b) e extrato seco total pelo disco de Ackermann. Foi também avaliado quanto à atividade das enzimas

fosfatase alcalina (AOAC, 2006g) e peroxidase (LANARA, 1981). Em seguida, o leite cru (200 litros) foi dividido em duas porções de 100 litros. Em uma delas o leite foi mantido cru, aquecido a 35 °C e utilizado diretamente para fabricação dos queijos tipo Camembert. A outra porção foi pasteurizada (65°C/30 min.), resfriada a 35 °C e utilizada para fabricação dos queijos tipo Camembert. A eficiência do tratamento térmico foi avaliada pela atividade das enzimas fosfatase alcalina (AOAC, 2006g) e peroxidase (LANARA, 1981).

Antes da fabricação dos queijos, amostras de leite cru e pasteurizado foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: pH, utilizando-se potenciômetro devidamente calibrado, acidez titulável (AOAC, 2006c), gordura pelo método de Gerber (AOAC, 2006b), acidez titulável (AOAC, 2006i), sólidos totais pelo método de secagem em estufa a 105°C (AOAC, 2006a), cinzas por gravimetria após incineração em mufla a 550°C (AOAC, 2006d) e nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2006e). O teor de proteína foi determinado multiplicando-se o nitrogênio total por 6,38. O teor de lactose foi calculado por diferença entre o teor de sólidos totais e os demais constituintes sólidos do leite.

3.3. Fabricação do queijo tipo Camembert

Os queijos foram fabricados em tanques de aço inox de acordo com protocolo adaptado de fabricação de queijo tipo Camembert (MUNK; FERREIRA, 2008; SHAW, 1981). A fabricação, maturação e todas as análises foram feitas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (DTA/FEA – Unicamp). Todos os queijos seguiram exatamente o mesmo protocolo de fabricação e foram fabricados no mesmo dia.

Inicialmente, ao leite cru ou pasteurizado a 35 °C foi adicionada cultura láctica tipo “O” liofilizada constituída de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R704 - Chr. Hansen, Valinhos, Brasil) diretamente no tanque de fabricação (0,03g/L). O leite foi maturado até que a acidez atingisse 22 °D. Após atingir essa acidez, quando era o caso, foi adicionada a cultura adjunta liofilizada (3×10^{10}) constituída de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (Culturelle®). Foi realizada então a adição de cloreto de cálcio (250 ppm) e coagulante (Ha La 1175, Chr. Hansen, Valinhos - SP, Brasil) em quantidade suficiente para coagulação em 45 minutos. Ao atingir o ponto de corte (quando a acidez do soro exsudado do gel correspondia a 2/3 da acidez inicial do leite), o coágulo foi cortado em cubos de 2 cm de aresta e deixado em repouso por 3 minutos. Em seguida foi realizada a mexedura lenta da massa (agitação por 15 minutos em velocidade mínima com repouso de 3 minutos a cada 5 minutos). Após a mexedura, o soro foi drenado somente até a massa aflorar à superfície. A massa foi

colocada em formas cilíndricas de 0,200 kg (80 mm de diâmetro x 100 mm de altura) até preencher as formas. Após uma hora de repouso foi realizada apenas uma viragem. Em seguida, os queijos foram fermentados por aproximadamente 24 horas em temperatura ambiente controlada (25 °C) até que a acidez do soro exsudado atingisse 80 a 100 °D. Após a fermentação, a altura dos queijos foi padronizada em $3 \pm 0,5$ cm e foram colocados em salmoura estática com 20% NaCl e 0,5% de CaCl por 30 minutos. O volume de salmoura utilizado foi 3,5 vezes maior que o volume de queijo e as salmouras foram mantidas a 4 °C durante todo o período de salga. Ao final da salga, os queijos foram secos por 30 minutos (12 °C) e então pulverizados de maneira homogênea com 0,1g do fungo *P. candidum* (PC001 - Chr. Hansen, Valinhos, Brasil) suspenso em 500 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). Após 30 minutos os queijos foram virados, a aspersão foi realizada novamente e foi aguardada uma hora para secagem dos queijos. Após a secagem, os queijos permaneceram 11 dias na câmara de maturação (UR% 95 / 12°C) com viragens diárias até o recobrimento total do fungo. Após 11 dias os queijos foram embalados em papel alumínio e armazenados em câmara de refrigeração (4°C) para que prosseguissem sua maturação, até completarem 50 dias.

3.4. Avaliação dos queijos Camembert

3.4.1. Composição físico-química dos queijos

No 15º dia seguinte à fabricação, os queijos foram avaliados quanto ao pH (AOAC, 2006h), gordura pelo método de Gerber (BSI, 1989), umidade por secagem em estufa a 105 °C (AOAC, 2006f), cinzas por gravimetria após incineração em mufla a 550°C (AOAC, 2006c), nitrogênio total pelo método de macro-Kjedhal (AOAC, 2006e), sal pelo método de Volhard (RICHARDSON, 1985) e lactose por diferença entre os sólidos totais e os demais sólidos do leite. O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator de correção 6,38.

3.4.2. Avaliação dos queijos durante a maturação

Durante a maturação os queijos foram avaliados quanto ao pH e hidrólise proteica. A amostragem dos queijos tipo Camembert para avaliação do pH foi realizada conforme descrito por Vassal e Gripon (1984). Assim, essas análises foram realizadas em duas regiões específicas do queijo: o centro geométrico da peça, uma peça cilíndrica central de 2 cm de espessura por 4 cm de diâmetro, sendo esta retirada com sonda metálica cilíndrica; e a superfície (até 2 mm abaixo do fungo e sem a presença deste). O pH foi avaliado a cada 2 dias nos primeiros 15 dias e depois aos 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias de maturação. A eletroforese capilar foi realizada

na fração insolúvel em pH 4,6 com amostras homogêneas do queijo inteiro aos 1, 10, 20, 30, 40 e 50 dias de maturação. Diferentemente, o perfil de peptídeos foi avaliado a partir de uma amostra homogênea da peça inteira (PIRAINO et al., 2006) após 1, 10, 20, 30 e 50 dias de maturação, através da análise da fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70% por MALDI-ToF-MS.

Foram realizadas também análises sensoriais de perfil flash e CATA para levantar atributos sensoriais dos queijos no estágio final de maturação (50 dias).

3.4.2.1. Fracionamento dos peptídeos pela solubilidade em pH 4,6 e etanol 70%

Para obtenção do extrato solúvel em pH 4,6, o queijo triturado foi inicialmente homogeneizado em Stomacher 400 (Seward Laboratory, UK) com o dobro da quantidade de água por 3 minutos (m/m), de acordo com a metodologia de Kuchroo e Fox (1982). O fracionamento dos peptídeos foi realizado de acordo com Piraino et al. (2006). A mistura homogeneizada obtida foi acidificada a pH 4,6 com HCl 1,0 M, mantida a temperatura ambiente por 30 minutos e, então, o pH foi reajustado a 4,6. A solução foi mantida a 40 °C por 1 hora e centrifugada a 3000 g por 30 minutos a 4 °C em centrífuga Allegra R64 (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, USA). O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e papel de filtro Whatman Nº 113 e congelado a -80°C. O *pellet* obtido, fração insolúvel em pH 4,6, foi recolhido para posterior análise por eletroforese capilar. O sobrenadante, fração solúvel em pH 4,6 foi liofilizado. Alíquotas das amostras liofilizadas (10 mg), em duplicata, foram dissolvidas em 1 mL de etanol 70%, mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugadas à 13000 g por 10 minutos. O sobrenadante obtido, fração solúvel em pH 4,6 e em etanol 70 %, foi então separado para análise peptidômica por MALDI-ToF.

3.4.2.2 Análise da fração insolúvel em pH 4,6 por Eletroforese Capilar

A fração insolúvel em pH 4,6 foi analisada por eletroforese capilar de acordo com Ortega et al. (2003) e Otte et al. (1997), com as modificações descritas por Alves et al. (2013). A separação foi realizada utilizando-se capilar de sílica fundida de 57 cm (50 cm de comprimento efetivo até o detector x 75 µm) usando o sistema P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e software Karat 32 (Beckman Coulter). Uma amostra de 20 mg da fração insolúvel em pH 4,6 foi dissolvida em 1 mL de solução tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, 8 M de uréia e 10 mM de ditioneitol (DTT) em pH 8,00 e mantida em repouso por aproximadamente 24 horas e reajustado no momento do uso quando necessário. As amostras foram filtradas (0,45 µm) e injetadas por 5 segundos a 0,5 psi. A separação ocorreu a 18,5 kV e 23 °C e a detecção foi realizada a 214 nm durante 60 minutos. Entre as corridas, o

capilar foi condicionado por lavagem com NaOH (0,5 M) por 5 minutos, água ultra-pura (Milli-Q) por 5 minutos e tampão de corrida (10 mM de fosfato de sódio, uréia 6 M e 0,05 % hidroxipropilmetilcelulose - HPMC) com pH ajustado para 3,00 e mantida em repouso por aproximadamente 24 horas e reajustado no momento do uso quando necessário. Os picos obtidos nos eletroferogramas capilares foram identificados de acordo com Otte et al. (1997), Rehn et al. (2010) e Alves et al. (2013) e as suas áreas integradas através do software Karat 32. Padrões das 3 frações proteicas (Casein from bovine milk $\geq 70\%$, Sigma-Aldrich®) foram corridos ao final das análises para identificação dos picos correspondentes. As áreas dos picos relacionados foram integradas de maneira imparcial e automatizada pelo software, com Threshold de 0,50 U/A e linha de base ajustada para o início da corrida.

3.4.2.3. Análise da fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70% por MALDI-ToF MS

Procedimentos Experimentais Gerais

Acetonitrila grau HPLC ($\geq 99,9\%$), ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA, 99 %) e ácido trifluoroacético (99 %) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), e o padrão de calibração de peptídeos II da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha) composto por 9 peptídeos.

Análise por MALDI-ToF MS

Os espectros de massas dos peptídeos foram obtidos em um instrumento MALDI-TOF/TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com um laser SmartBeam. As amostras (1 μ L) foram aplicadas sobre uma placa de aço (MSP 96 polished-steel target, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), secas à temperatura ambiente, e sobrepostas com a solução de matriz (1 μ L), a qual foi previamente preparada a partir de CHCA dissolvido em 50 % de acetonitrila e ácido trifluoroacético 2,5 %. Posteriormente, a gotícula foi completamente evaporada e a placa inserida no espectrômetro de massas. O equipamento foi operado no modo reflector de íons positivos na faixa de massa de m/z 600-3500, controlado pelo software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics). A potência do laser foi ajustada a 50-80 % e as voltagens da fonte de íons 1, fonte de íons 2, lentes, reflector e o reflector 2 foram de 20,00; 17,77; 7,90; 21,95 e 10,03 kV, respectivamente. O tempo de extração dos íons pulsados foi de 30 ns e o limite de supressão de massa foi ajustado a m/z 600. O instrumento foi externamente calibrado utilizando o padrão de calibração de peptídeos II. Cada amostra foi analisada em quintuplicata.

3.4.3. Análise sensorial do queijo Camembert por perfil flash e CATA

A análise sensorial de Perfil Flash (PF) definida por Dairou e Sieffermann (2002) é uma técnica descritiva rápida originada da metodologia de perfil livre. Consiste numa avaliação comparativa de um conjunto de produtos, em que o consumidor escolhe os atributos sensoriais livremente e o método de ordenação é baseado na apresentação simultânea das amostras que se pretende estudar. No PF não é necessário treino individual, cada provador utiliza a sua própria lista de descritores avaliados numa escala ordinal e é instruído a ordenar as amostras em cada atributo separadamente.

Foram realizados os métodos Perfil Flash e CATA (*Check-all-that-apply*) após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP sob número CAAE 66734317.9.0000.5404 (Anexo 1) e realização das análises microbiológicas exigidas para comercialização dos produtos segundo a legislação (BRASIL, 2007) (Anexo 2). Optou-se pela avaliação apenas dos tratamentos obtidos de leite pasteurizado com cultura starter tipo “O”, de leite pasteurizado, cultura starter tipo “O” e *Lb. rhamnosus* GG; e por fim do tratamento obtido com leite cru e cultura starter tipo “O”, não incluindo na avaliação sensorial o quarto tratamento de queijo tipo Camembert obtido de leite cru, cultura starter tipo “O” e *Lb. rhamnosus* GG. Tal decisão foi tomada após o resultado das análises microbiológicas desse quarto tratamento estar fora do padrão preconizado pela legislação vigente (RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001).

As análises sensoriais foram realizadas após 50 dias de maturação. Foram recrutados 15 provadores para o teste que não possuísem restrições quanto às amostras oferecidas e que tivessem familiaridade com o queijo tipo Camembert. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz branca. As amostras (cunhas de 10g cortadas a partir do centro das peças) foram servidas a temperatura ambiente controlada (25 ± 2 °C), em travessas de inox codificadas com três dígitos. Foi servida água mineral à temperatura ambiente e bolacha água e sal, para que os provadores pudessem efetuar a limpeza do palato, entre as amostras.

Antes do início do teste, foi dada uma explicação simplificada a cada provador sobre o método de Perfil Flash, descrevendo-se as etapas básicas do teste. Foi apresentado também um protocolo para ser utilizado durante o levantamento de atributos e para as análises, com instruções para avaliar os atributos de aparência (observando cor e aspecto), aroma (cheirando a amostra duas vezes), sabor (degustando a amostra), textura (mastigando e avaliando a sensação conferida na boca) e, também, qualquer sensação na cavidade oral após engolir (residual). Para levantamento de atributos, as amostras foram apresentadas simultaneamente, solicitando-se que os provadores anotassem as similaridades e diferenças em ficha específica (Anexo 3). Após o levantamento, em entrevista individual com cada participante, foi montada

uma ficha de avaliação das amostras específica e personalizada para cada provador (Anexo 4). Em seguida, as amostras foram novamente apresentadas, orientando-se os provadores para que ordenassem as amostras em ordem crescente de intensidade para cada um dos atributos definidos anteriormente, utilizando a ficha modelo de escala não estruturada para análise descritiva quantitativa. Os provadores foram instruídos que, se necessário, poderiam alterar a ficha durante o procedimento de ordenação, retirando ou incluindo atributos, ou mudando as definições no glossário.

Para realizar o teste de consumidor e de aceitação global, foi realizada uma análise sensorial CATA com 80 provadores com familiaridade mínima (já ter provado ao menos uma vez o queijo) com o queijo Camembert de acordo com metodologia descrita por Ares et al. (2007). Os participantes responderam a um questionário (Anexo 5) contendo atributos sensoriais levantados pela equipe da análise de perfil flash para descrever as amostras. Para evitar tendenciamento, a posição dos termos no questionário foi balanceada e aleatorizada para cada ficha de acordo com metodologia adaptada recomendada por Ares et al. (2014). Antes da avaliação de todas as amostras, os consumidores foram convidados a responder um questionário CATA igual, marcando os termos que consideraram que descrevia o queijo tipo Camembert ideal, de acordo com o sugerido por Bruzzone et al. (2015). Em cada ficha correspondente a cada uma das amostras, os consumidores avaliaram a impressão global dos queijos através de escala hedônica de 9 pontos, que exibia termos variando de “desgostei extremamente” à “gostei extremamente”, e foram orientados a marcar a opção que melhor se adequava ao produto, em relação à impressão global (STONE; BLEIBAUM; THOMAS, 2012). Os resultados foram obtidos através da substituição de cada termo hedônico por seu escore respectivo, de forma decrescente do escore 9 (gostei extremamente) ao escore 1 (desgostei extremamente).

Em todas as análises foram disponibilizadas aos provadores duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 6), o qual foi assinado e uma via recolhida e arquivada.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental utilizado foi *Split-split-plot* com três repetições. O fator principal foi o tratamento térmico do leite (cru ou pasteurizado); o fator secundário foi o tipo de cultura utilizada (cultura láctica tipo “O” ou cultura láctica tipo “O” e *Lactobacillus rhamnosus* GG) e o fator terciário foi o tempo de maturação, que foi variável dependendo do tipo de análise a ser considerada. O efeito do tratamento térmico do leite e do tipo de cultura sobre a composição dos queijos foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA). Em caso de

diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey considerando-se nível de significância de 5 %.

O perfil de peptídeos obtidos por MALDI-Tof MS e sua correlação com as variáveis estudadas foi avaliado por quimiometria. Os dados dos espectros de massas foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics), que incluiu subtração da linha de base e normalização. Para cada espectro, uma lista de massas com as correspondentes intensidades relativas (%) foram exportadas para o Excel, onde foi montada a matriz de dados. Dos 30 espectros obtidos para cada ponto amostral foram removidos 4 espectros com os dados mais discrepantes dos demais considerados *outliers* pela análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), assim foram utilizados 26 espectros para cada ponto amostral. O software online MetaboAnalyst 3.0 foi utilizado para as análises quimiométricas (XIA et al. 2012), no qual foi utilizada tolerância de massa de 1 m/z , desenvolvido filtro de dados de intervalo intercuartil, normalização dos dados pela soma e escalamento dos dados método de Pareto (dados centrados na média e divididos pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável). A ferramenta quimiométrica utilizadas foi a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), um método supervisionado aplicado com o intuito de identificar variáveis importantes com poder de discriminação, o qual foi validado pelos coeficientes de correlação múltipla (R^2) e validação cruzada (Q^2). A significância dos biomarcadores foi ranqueada usando o escore de importância de variável em projeção (VIP score > 1) do PLS-DA.

Os resultados da análise sensorial de perfil flash foram analisados por Análise Procrustes Generalizada. Os dados foram inseridos na forma de n matrizes (uma por provador) de 3 linhas (uma para cada amostra) e o número de colunas variando de acordo com o número de atributos levantados. Os dados da Aceitação Hedônica (Impressão Global) da análise CATA, foram analisados considerando a amostra como fonte fixa de variação e o consumidor como efeito aleatório, em um nível de significância de 5%. Quando os efeitos foram significativos, as diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey. Para o CATA, a Análise de Penalidades seguiu o proposto por Ares et al. (2014) e Meyners, Castura e Carr (2013). Também foram criadas duas variáveis “dummy” (Z^+ and Z^-). Se um atributo foi usado para descrever a amostra, mas não o ideal, atribuiu-se 0 à Z^+ e 1 à Z^- . Por outro lado, se um atributo foi usado para descrever o ideal, mas não a amostra, atribuiu-se 1 para Z^+ e 0 para Z^- . Quando o atributo foi usado para descrever ambos, foi atribuído 0 para as duas variáveis “dummy”. Além disso, foi determinada a percentagem de consumidores que usaram cada atributo para descrever diferentemente cada amostra e o ideal (ARES et al., 2014; BRUZZONE, et al., 2015).

A análise de Penalidades e Regressão de Quadrados Mínimos Parciais (PLS) foi utilizada para estimar o quanto os atributos dos produtos avaliados desviaram do produto ideal no CATA. As notas da impressão global foram consideradas como variáveis dependentes e as variáveis “dummy” como regressores. Esta análise estatística pode prever a pontuação média de preferência das amostras quando todos os atributos estão em sua intensidade ideal, permitindo assim o direcionamento para a reformulação de produtos baseado na pontuação de impressão global obtida pela avaliação dos consumidores (XIONG; MEULLENET, 2006).

Os resultados foram avaliados utilizando-se o programa XLSTAT 2014, com exceção da de peptídeos obtidos por MALDI-Tof MS cujos dos espectros de massas foram processados conforme descrito anteriormente.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química do leite

O leite cru utilizado no processo de fabricação dos queijos atendeu aos parâmetros exigidos pela Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2011) que estabelece teor de gordura mínimo de 3 %, teor de sólidos não gordurosos mínimo de 8,4 %, densidade relativa a 15 °C entre 1,028 e 1,034 g/mL e mínimo de 2,9 % de proteína total (Tabela 1). No entanto, o leite cru apresentou acidez titulável próxima do limite mais alto da legislação (14 a 18 °D) e o leite pasteurizado, ligeiramente superior. Segundo Fox et al. (2015) o aquecimento tem pouco efeito nos sais de leite com duas exceções: carbonatos e fosfatos de cálcio. A maior parte do carbonato potencial do leite ocorre como CO_2 , que é expulso durante o aquecimento, com o consequente aumento do pH. Entre os sais de leite, o fosfato de cálcio possui comportamento diferente dos demais, uma vez que a sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura. No aquecimento, a solubilidade do fosfato de cálcio diminui e este transferido para a fase coloidal, associada às micelas de caseína acarretando na diminuição da concentração de íons de cálcio e por fim um pH mais baixo no leite.

Em adição, a presença de compostos de caráter ácido, tais como as proteínas, contribui para a elevação da acidez do leite. Logo, a alta acidez observada pode ser atribuída ao alto teor proteico (3,43 %) já que o pH, parâmetro mais significativo para caracterização da acidez do leite, encontrou-se dentro da faixa considerada normal (6,6 a 6,8) (WASLTRA et al., 2006).

O leite cru apresentou atividade positiva para as enzimas fosfatase e peroxidase e o leite tratado termicamente apresentou inativação da atividade da enzima fosfatase alcalina, revelando a eficiência do tratamento térmico aplicado.

Tabela 1 - Composição físico-química do leite cru e do leite tratado termicamente pasteurizado (n=3).

Determinações analíticas	Leite Cru	Leite Pasteurizado
Densidade relativa a 15 °C (g/mL)	1,04 ±0,004	1,03 ±0,003
pH	6,72 ±0,06	6,63 ±0,05
Acidez Titulável (°D)	17,40 ±0,42	18,6 ±0,61
Umidade %	87,20 ±0,29	87,15 ±0,37
Gordura (%)	3,62 ±0,20	3,63 ±0,16
Extrato seco total (%)	12,80 ±0,29	12,85 ±0,37
Proteína total (%)	3,12 ±0,06	3,31 ±0,02
Cinzas (%)	0,77 ±0,08	0,77 ±0,04
Atividade da fosfatase alcalina	Positivo	Negativo
Atividade da lactoperoxidase	Positivo	Positivo

4.2. Caracterização físico-química dos queijos

A composição físico-química dos queijos tipo Camembert, determinada após 15 dias de fabricação é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição físico-química dos queijos após 15 dias de fabricação (n=3).

Características físico-químicas	Queijo tipo				p-valor*
	Camembert (leite cru)	Camembert (leite cru e <i>Lb. rhamnosus</i>)	Camembert (leite pasteurizado)	Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>)	
pH dia ¹	4,60 ±0,03 ^a	4,60 ±0,02 ^a	4,63 ±0,05 ^a	4,66 ±0,01 ^a	0,1186
Umidade (U) (%)	47,74 ±0,60 ^b	47,95 ±0,58 ^b	50,05 ±0,05 ^a	50,57 ±0,42 ^a	<0,0001
EST ² (%)	52,26 ±0,60 ^a	52,05 ±0,58 ^a	49,95 ±0,05 ^b	49,43 ±0,42 ^b	<0,0001
Gordura (%)	26,83 ±0,58 ^a	27,00 ±0,50 ^a	25,00 ±0,87 ^{ab}	24,67 ±1,04 ^b	0,0112
GES ³ (%)	51,27 ±1,46 ^a	52,06 ±1,56 ^a	50,00 ±1,87 ^a	49,77 ±1,41 ^a	0,3047
Proteína total (%)	19,58 ±0,47 ^b	19,39 ±0,34 ^b	21,07 ±0,45 ^a	20,75 ±0,41 ^a	0,0025
PES ⁴ (%)	37,47 ±0,79 ^b	37,26 ±0,50 ^b	42,18 ±0,93 ^a	42,00 ±1,15 ^a	<0,0001
Cinzas (%)	3,11 ±0,04 ^a	3,09 ±0,15 ^a	3,07 ±0,12 ^a	3,19 ±0,04 ^a	0,5181
Sal (S) (%)	2,04 ±0,01 ^a	2,03 ±0,02 ^a	2,01 ±0,02 ^a	2,03 ±0,01 ^a	0,2232
S/U (%)	4,27 ±0,03 ^a	4,23 ±0,01 ^a	4,01 ±0,03 ^b	4,01 ±0,01 ^b	<0,0001
Rendimento bruto (L leite/kg queijo)	8,09 ± 0,16 ^a	8,04 ± 0,20 ^a	7,59 ± 0,22 ^b	7,50 ± 0,18 ^b	<0,0001

¹pH ao 1º dia de maturação; ²EST: extrato seco total; ³GES: gordura no extrato seco; ⁴PES: proteína no extrato seco. *Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Observa-se que os tratamentos não afetaram significativamente o pH, gordura no extrato seco, cinzas e sal. Todos os queijos apresentaram teor de umidade e gordura em extrato seco que atendem ao preconizado no Codex Alimentarius, que classifica o queijo Camembert como um queijo com um mínimo de 30% de gordura no extrato seco e valor referenciado de 45 a 55 % de gordura em base seca; e com extrato seco total mínimo de 46% para os valores encontrados de gordura no extrato seco (CODEX, 2011).

Os tratamentos afetaram significativamente a umidade, extrato seco total, gordura, proteína total, proteína no extrato seco, sal na umidade e o rendimento bruto dos queijos. As diferenças observadas devem-se, possivelmente, ao tratamento térmico do leite. Um dos seus principais efeitos do tratamento térmico do leite para a fabricação de queijos é a desnaturação

de parte das proteínas do soro, mais especificamente da β -lactoglobulina, que uma vez desnaturada, complexa-se com a fração κ -caseína, formando o complexo κ -caseína- β -lactoglobulina (WALSTRA et al., 2006). Assim, no momento da coagulação, as proteínas do soro complexadas à caseína também precipitam-se, aumentando não somente o teor proteico total como também a capacidade de retenção de água adsorvida por essas proteínas. Além da β -lactoglobulina, outras proteínas do soro desnaturadas também se complexam com as micelas de caseína aumentando a retenção de água e rendimento de queijos obtidos de leite pasteurizado.

4.3. Desenvolvimento do pH dos queijos tipo Camembert durante a maturação

A Figura 4 apresentam o desenvolvimento do pH no centro e na superfície dos queijos tipo Camembert durante 50 dias de maturação.

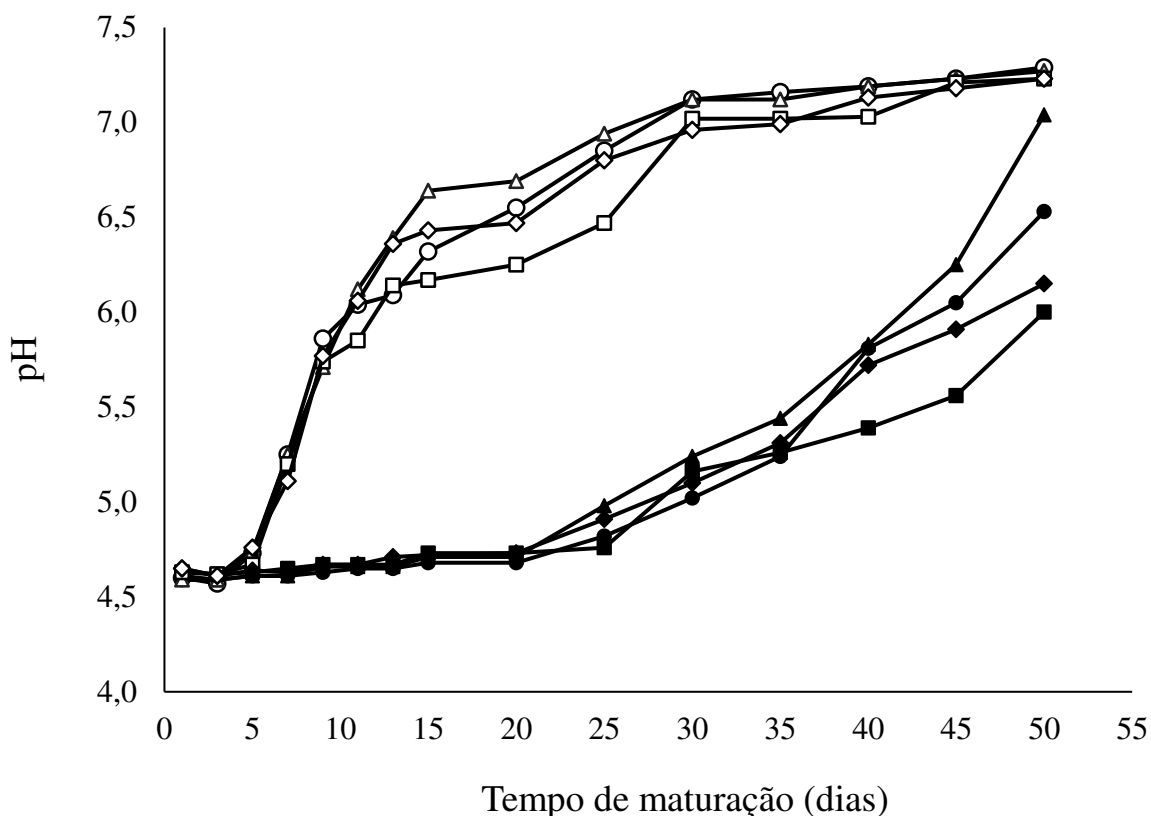


Figura 4 – Efeito do tempo sobre o pH da superfície e do centro dos queijos. (●) Centro do queijo tipo Camembert (leite cru); (▲) Centro do queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) (■) Centro do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (◆) Centro do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (○) Superfície do queijo tipo Camembert (leite cru); (Δ) Superfície do queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (□) Superfície do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (◇) Superfície do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*).

De maneira geral, pode-se observar a diferenciação do pH das regiões de centro e superfície dos queijos a partir do quinto dia de maturação, com tendência à convergência do pH após 50 dias de maturação. A cinética de alteração do pH, bem como dos compostos do queijo Camembert que o influenciam, é bem descrita por McSweeney (2004) e por Spinller e Gripon (2004). Segundo os autores, após a fabricação do queijo e a intensa produção de lactato pelas bactérias ácido lácticas, o pH do queijo se torna bastante ácido e aproxima-se rapidamente do ponto isoeletrico da caseína (pH 4,6). Isso ocorre logo nas primeiras 24 horas após a fermentação e tal produção de lactato estende-se até aproximadamente o quinto dia de fabricação. No caso do queijo Camembert, a maturação ocorre de maneira mais relevante da superfície para o centro do queijo devido, principalmente, ao crescimento superficial de seu principal agente de maturação, o fungo do gênero *Penicillium*. Assim, o pH do queijo na região

logo abaixo da superfície tende a aumentar rapidamente após o quinto dia de maturação, devido ao intenso consumo de lactato pelo fungo, que ao oxidar tal composto libera CO_2 e H_2O para o meio. Com menor concentração de lactato na superfície há redução da acidez e o aumento do pH. O consumo massivo de lactato na região a partir do décimo ou décimo quinto dia resulta em um gradiente de lactato entre a superfície e o centro do queijo, impelindo a migração do lactato presente no centro para a superfície do queijo. A partir do décimo quinto ou vigésimo dia após a fabricação pode-se observar também o ligeiro aumento do pH no centro, embora a ação direta do fungo sobre essa região ainda não seja aparente. Caminhando para o final da maturação, não apenas o consumo de lactato influenciará na convergência do pH à neutralidade. A intensa hidrólise proteica a partir do quadragésimo ou quadragésimo quinto dia de maturação resulta na liberação de aminoácidos livres e formação de compostos nitrogenados, resultando na produção de amônia, que por seu caráter básico contribui para o aumento do pH do queijo.

4.4. Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre a proteólise dos queijos tipo Camembert

A Figura 5 apresenta o perfil de hidrólise das caseínas analisado por eletroforese capilar das frações insolúveis em pH 4,6 avaliados durante a maturação. Todos os queijos apresentaram perfil de degradação das caseínas semelhante. Observa-se a presença da para-k-CN, que é resultante da hidrólise da κ -CN pelo coagulante nas ligações Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Já no primeiro dia de maturação observa-se a hidrólise das frações α_{s1} -CN 8P e α_{s1} -CN 9P, o que sugere a hidrólise da ligação Phe₂₃-Phe₂₄ da α_{s1} -caseína pelo coagulante residual, e o consequente aparecimento dos picos α_{s1} -I-CN 8P e α_{s1} -I-CN 9P, que representam o fragmento α_{s1} -CN f24-199, com 8 ou 9P. A hidrólise da ligação peptídica Phe₂₃-Phe₂₄ da α_{s1} -caseína é responsável pelo amaciamento de queijos (UPADHYAY et al., 2004). Adicionalmente, após 40 dias de maturação, observa-se intensa degradação da β -caseína em todos os queijos, caracterizada pela redução na intensidade dos picos das variantes β -CN A1 e β -CN A2. A hidrólise da β -caseína na ligação Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ é atribuída à ação da quimosina, sendo essa ligação, considerada um sítio prioritário da ação dessa enzima na proteólise primária da β -caseína (UPADHYAY et al., 2004). Para todos os queijos, independente do tratamento, os eletroferogramas obtidos após 50 dias de maturação revelam intensa proteólise, o que é característica desse tipo de queijo.

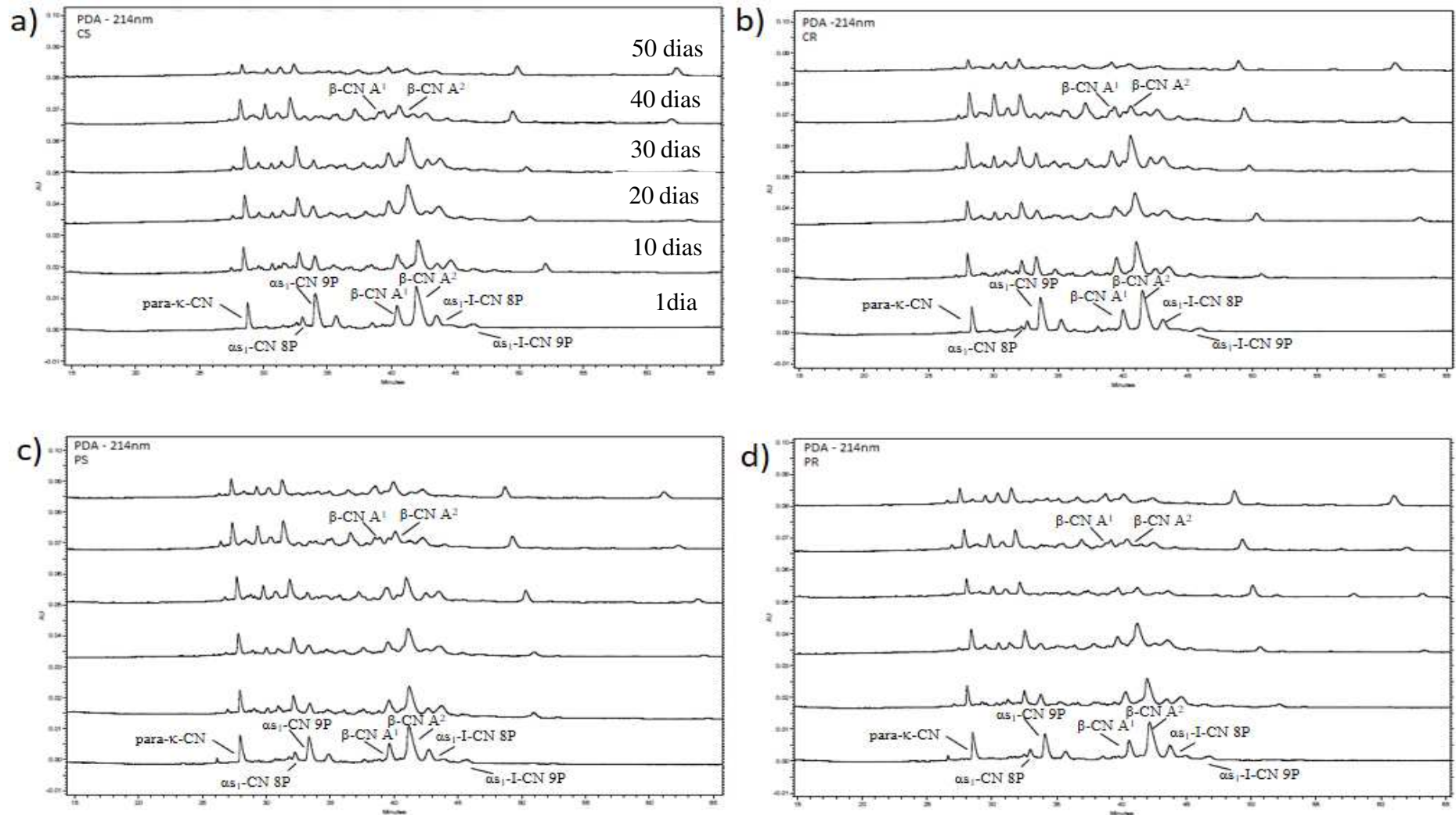


Figura 5 - Eletroferograma capilar da fração insolúvel em pH 4,6 dos queijos. (A) queijo tipo Camembert (leite cru); (B) queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (C) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (D) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus* GG).

A Figura 6 apresenta evolução da área integrada dos picos referentes às frações α_{s1} -, β - e κ -caseína, representando sua hidrólise ao longo do tempo. A para- κ -caseína possui diversos sítios de clivagem para quimosina e demais enzimas proteolíticas presente no leite. No entanto, seu alto grau de estruturação secundária, comparada com as outras frações caseica, a torna pouco susceptível a ação enzimática, o que justifica a menor hidrólise dessa fração caseica (WASLTRA, 2000; FOX 2000; MCSWEENEY, 2004). Por outro lado, a β -caseína, que apresentou a hidrólise mais intensa, é a fração com o menor nível de estruturação secundária, decorrente principalmente do grande número de resíduos de prolina em sua estrutura. Tal característica a torna mais suscetível à ação das proteases (WALSTRA, 2006).

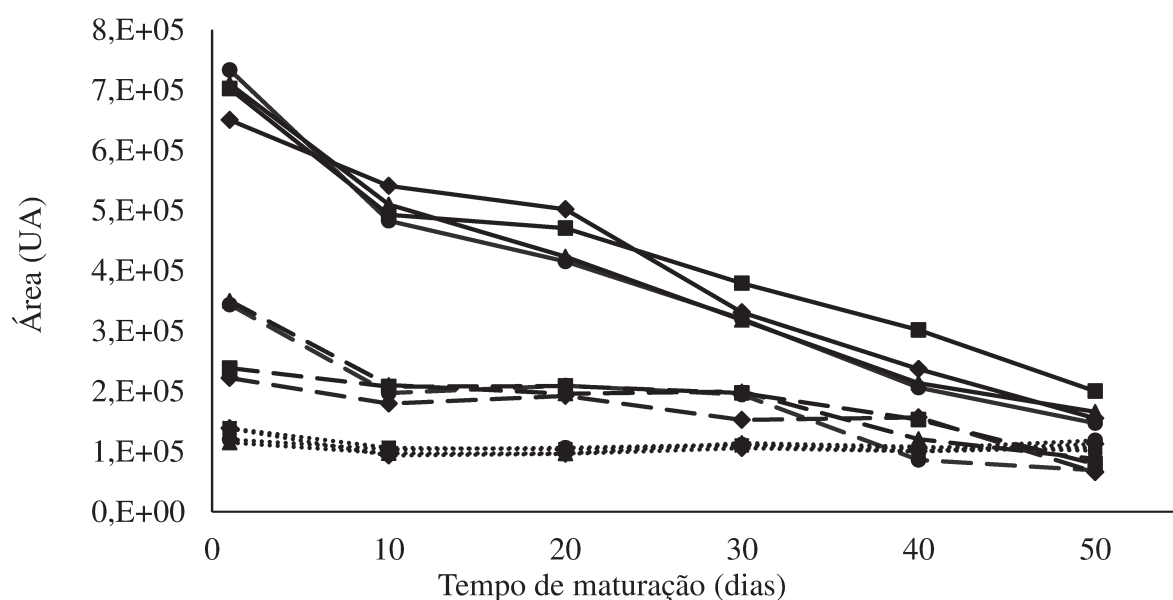


Figura 6- Evolução da área integrada dos picos referentes às frações caseicas e sua degradação ao longo do tempo. (···) κ -CN; (- - -) α_{s1} ; (—) β -CN; (●) queijo tipo Camembert (leite cru); (▲) queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (■) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) ; (◆) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*). (n=3).

4.5. Avaliação de peptídeos dos queijos tipo Camembert

Os espectros de massa obtidos na análise das frações peptídicas solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % por MALDI-ToF são apresentados nas Figuras 7, 8, 9 e 10. A análise dos espectros de massa revelou um perfil de hidrólise e formação de peptídeos bastante complexo. Ao todo, 103 picos foram detectados para os quatro queijos analisados ao longo dos 50 dias de maturação, dos quais 70 picos correspondem às razões m/z já reportadas na literatura como peptídeos presentes em queijos, derivados da hidrólise da caseína. Estes foram apresentados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 para os queijos tipo Camembert (leite cru), Camembert (leite cru e *Lb.*

rhamnosus), Camembert (leite pasteurizado), Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*), respectivamente. Em todos os queijos e para todos os tempos avaliados, o peptídeo β -CN f193-209 (m/z 1881) foi o mais intenso, sendo, portanto, utilizado como referência para o cálculo da intensidade relativa dos demais peptídeos. A identificação dos peptídeos foi realizada pela comparação das razões massa-carga (m/z) dos peptídeos encontrados nos queijos tipo Camembert fabricados neste estudo com àqueles previamente identificados por diferentes autores em diversas variedades de queijos e outros produtos lácteos (EXTERKATE et al., 1996; ADDEO et al., 1992; ADDEO et al., 1994; GOULDSWORTHY et al. 1996; ALLI et al. 1998; SOERYAPRANATA et al, 2004; SOERYAPRANATA et al., 2008; GAGNAIRE et al. 2001; BROADBENT et al., 1998; JIN et al., 2016; ONG et al., 2008; KUNDA et al., 2012).

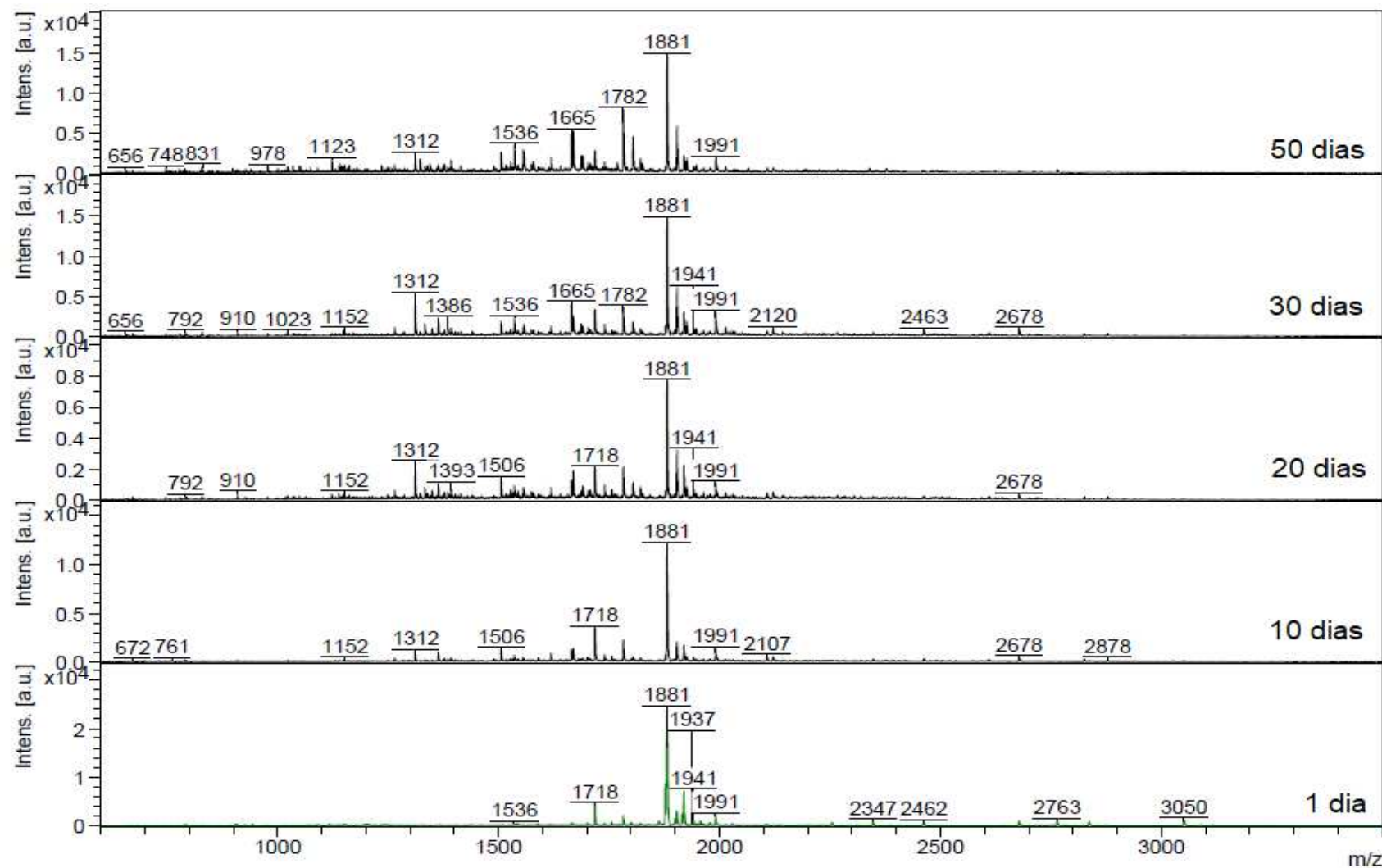


Figura 7 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite cru).

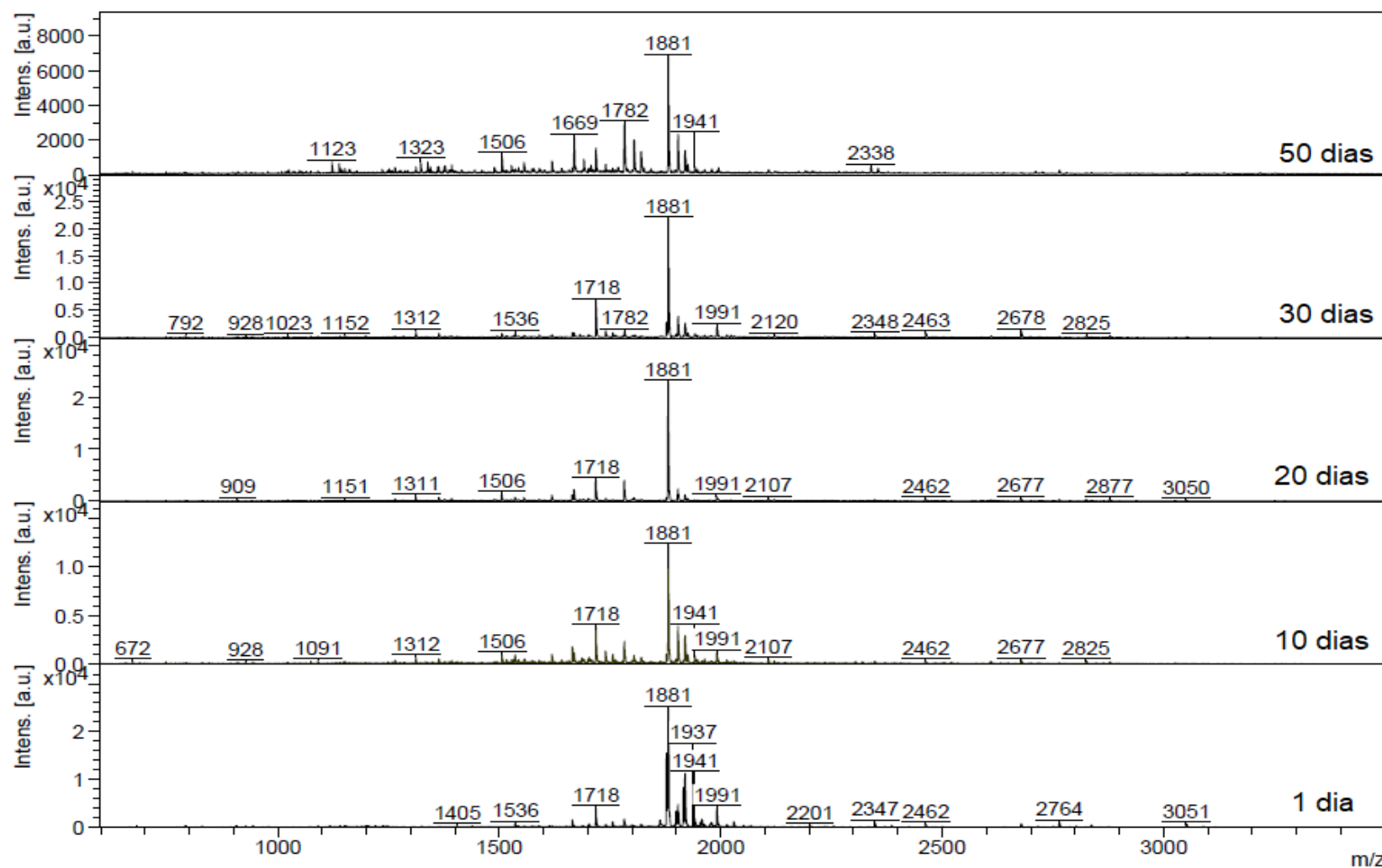


Figura 8 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtidos por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite cru, cultura e *Lb. rhamnosus*)

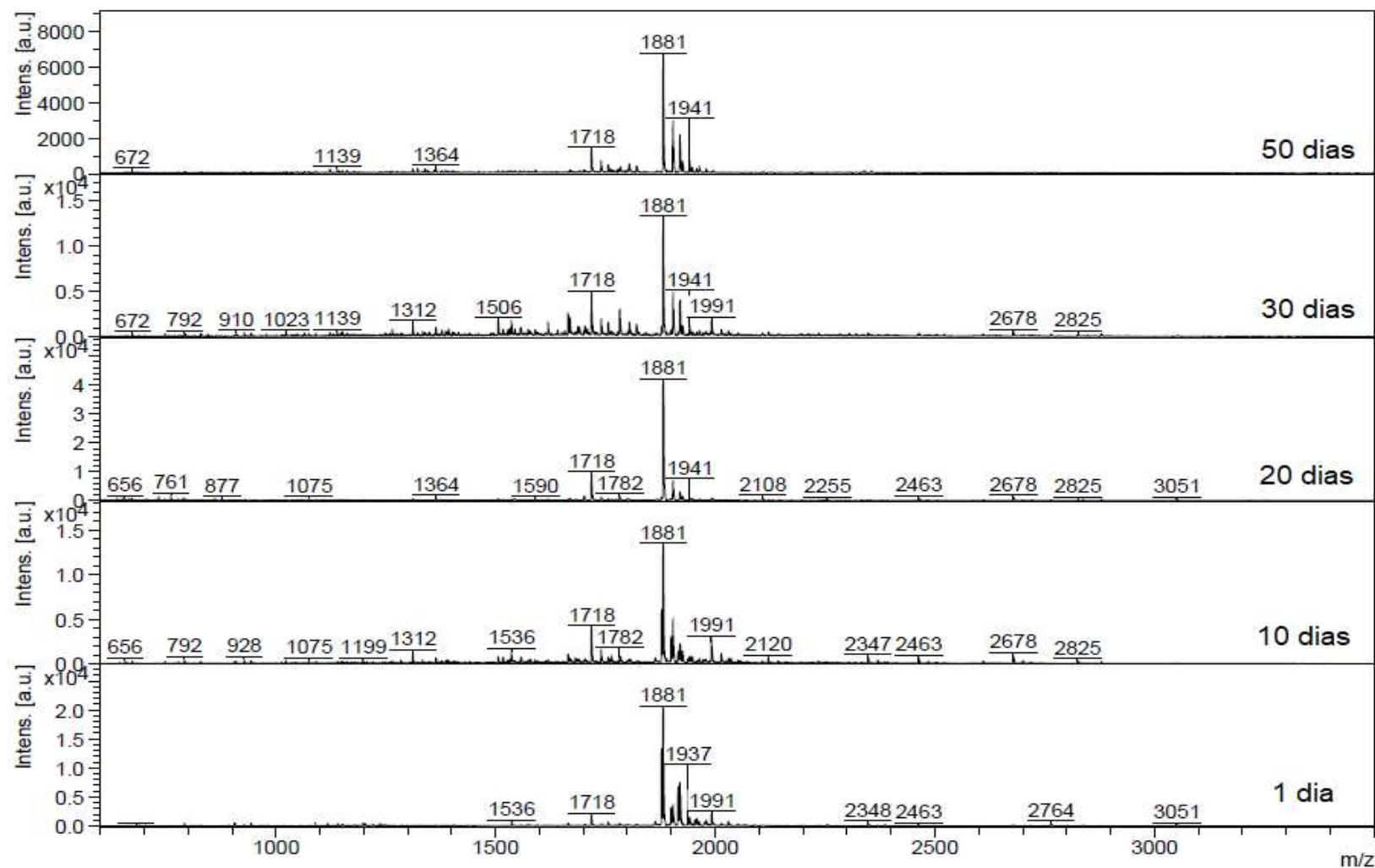


Figura 9 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado)

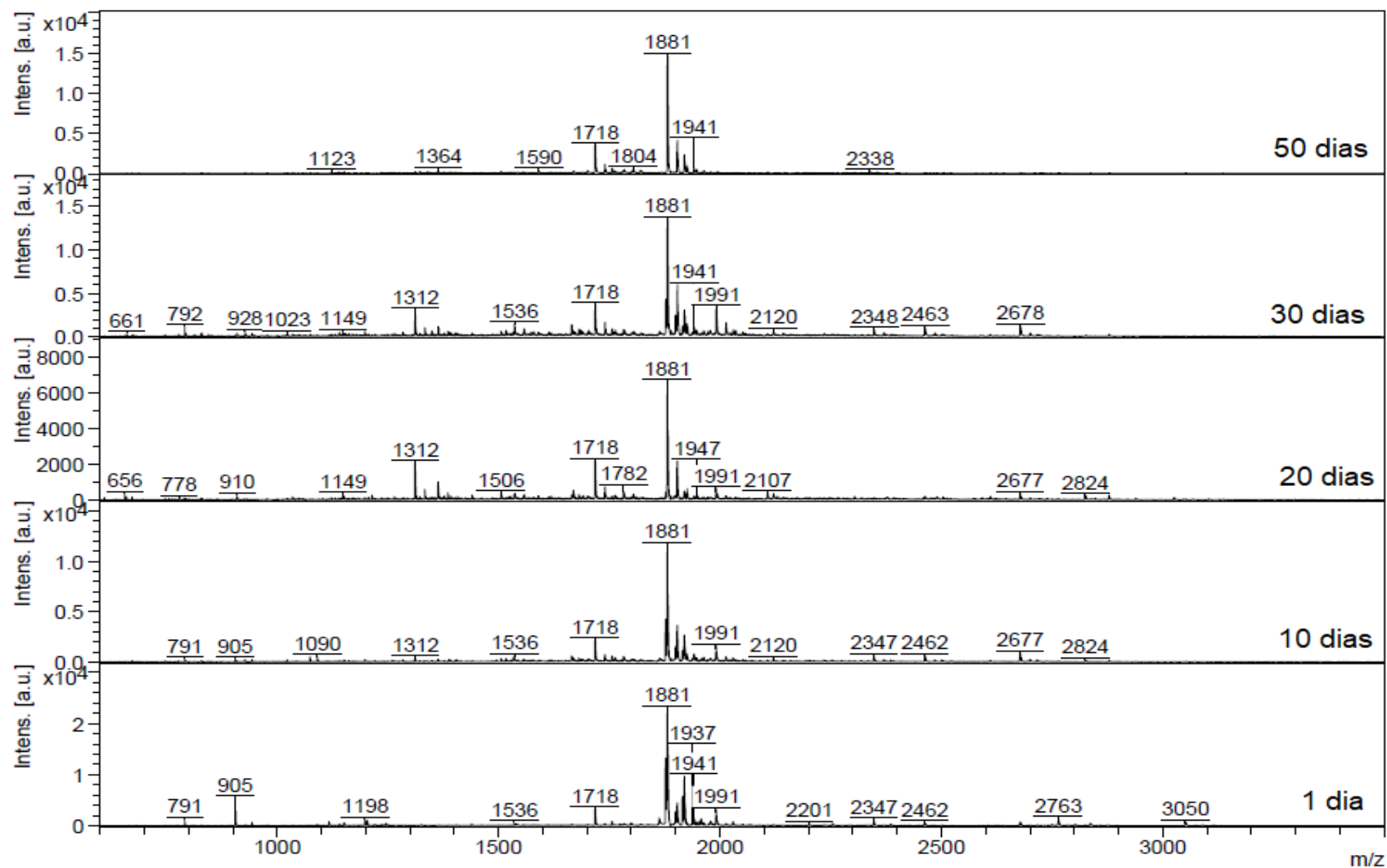


Figura 10 - Espectros de massas dos peptídeos solúveis em pH 4,6 e etanol 70 % obtido por MALDI-ToF do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*).

Tabela 3 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite cru) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (*continua*)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
*656	β -CN (25–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 2,24	1,70 $\pm$ 4,30	0,49 $\pm$ 1,07	0,95 $\pm$ 1,86
666	**	-	0,62 $\pm$ 0,86	0,62 $\pm$ 1,89	0,67 $\pm$ 3,43	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
672	κ -CN f(75–79)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,46 $\pm$ 3,44	3,09 $\pm$ 3,83	0,59 $\pm$ 1,16	0,80 $\pm$ 1,83
682	**	-	1,07 $\pm$ 1,13	0,85 $\pm$ 2,59	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
*748	α s1-CN f(194–199)	Pihlanto-Leppälä et al. (1998)	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 1,06	0,42 $\pm$ 1,58	0,28 $\pm$ 0,83	0,48 $\pm$ 1,70
791	α s1-CN f(18–23)	Yan Jin et al. (2016)	2,86 $\pm$ 3,71	0,64 $\pm$ 1,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
792	**	-	2,42 $\pm$ 3,40	0,13 $\pm$ 0,67	0,69 $\pm$ 1,77	0,78 $\pm$ 1,51	0,19 $\pm$ 0,96
893	**	-	0,76 $\pm$ 1,16	0,64 $\pm$ 1,77	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
905	α s1-CN f(17–23)	Alli (1998)	11,60 $\pm$ 14,66	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
910	α s2-CN f(118–125)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,69 $\pm$ 1,39	2,91 $\pm$ 3,57	0,93 $\pm$ 1,80	0,16 $\pm$ 0,80
927	α s2-CN f(83–89)	Yan Jin et al. (2016)	0,66 $\pm$ 1,26	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
928	β -CN f(134–141)	Yan Jin et al. (2016)	0,73 $\pm$ 1,34	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
943	α s1-CN f(14–21)	Yan Jin et al. (2016)	2,14 $\pm$ 3,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
944	α s2-CN f(196–203)	Yan Jin et al. (2016)	2,06 $\pm$ 3,70	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1023	k-CN f(18–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 1,63	0,24 $\pm$ 1,24	0,85 $\pm$ 1,68	0,65 $\pm$ 1,96
1090	α s1-CN f(25–34)	Yan Jin et al. (2016)	1,18 $\pm$ 1,55	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,71
1091	α s1-CN f(191–199)	Yan Jin et al. (2016)	1,20 $\pm$ 1,66	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1118	α s1-CN (f15–23)	Soeryapranata (2008)	2,38 $\pm$ 1,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1122	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 1,69	0,00 $\pm$ 0,00	4,04 $\pm$ 4,64
1123	α s2-CN f(176–184)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,39 $\pm$ 4,07	0,00 $\pm$ 0,00	3,15 $\pm$ 5,57
1139	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,66 $\pm$ 4,22	0,00 $\pm$ 0,00	1,66 $\pm$ 3,42
*1141	α s1-CN f(1–9)	Broadbent (1998)	1,37 $\pm$ 1,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,77 $\pm$ 2,34
*1151	β -CN f(199–209)	Addeo (1992)	1,78 $\pm$ 1,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1152	β -CN f(197–207)	Soeryapranata (2004)	0,44 $\pm$ 0,76	1,35 $\pm$ 1,87	2,08 $\pm$ 3,17	2,28 $\pm$ 2,22	2,07 $\pm$ 2,77
1199	α s1-CN f(23–32)	Yan Jin et al. (2016)	5,24 $\pm$ 4,92	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1204	α s1-CN f(143–151)	Yan Jin et al. (2016)	3,13 $\pm$ 1,58	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1221	κ -CN f(42–51)	Yan Jin et al. (2016)	1,16 $\pm$ 1,46	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1237	α s1-CN f(24–34)	Yan Jin et al. (2016)	1,72 $\pm$ 2,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
*1247	α s1-CN f(14–23)	Soeryapranata (2008)	0,88 $\pm$ 0,93	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1265	α s1-CN f(115–124)	Soeryapranata (2008)	0,00 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 2,46	6,76 $\pm$ 4,03	4,67 $\pm$ 3,28	3,55 $\pm$ 3,01
1312	β -CN f(152–163)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	10,82 $\pm$ 8,24	21,06 $\pm$ 17,91	14,80 $\pm$ 15,32	4,98 $\pm$ 6,05
1323	α s2-CN f(115–126)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,55 $\pm$ 3,76	0,00 $\pm$ 0,00	5,87 $\pm$ 5,46
1334	β -CN f(134–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 2,36	7,26 $\pm$ 7,27	2,96 $\pm$ 4,45	0,00 $\pm$ 0,00
1339	α s1-CN f(147–156)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,84 $\pm$ 4,69	0,00 $\pm$ 0,00	3,19 $\pm$ 4,25
1345	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 4,36
*1364	β -CN f(122–132)	Ahtesh (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	10,09 $\pm$ 2,22	11,88 $\pm$ 4,61	11,71 $\pm$ 4,51	1,92 $\pm$ 2,62
1376	α s1-CN f(8–19)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,75	0,29 $\pm$ 1,16	0,36 $\pm$ 1,03	2,58 $\pm$ 2,79
1377	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 1,32	0,07 $\pm$ 0,34	0,00 $\pm$ 0,00
1378	β -CN f(172–183)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,71 $\pm$ 1,37	1,24 $\pm$ 3,43	0,78 $\pm$ 1,51	1,19 $\pm$ 2,34
1386	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,48 $\pm$ 3,64	2,33 $\pm$ 2,61	0,00 $\pm$ 0,00
*1393	β -CN f(194–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	2,26 $\pm$ 2,91	6,37 $\pm$ 4,62	2,72 $\pm$ 2,60	6,64 $\pm$ 3,79
1405	κ -CN f(127–140)	Yan Jin et al. (2016)	0,91 $\pm$ 1,34	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1506	β -CN f(194–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	12,20 $\pm$ 3,92	15,59 $\pm$ 6,56	8,20 $\pm$ 4,59	13,80 $\pm$ 4,33
1528	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,73 $\pm$ 2,17	6,17 $\pm$ 6,13	0,84 $\pm$ 2,08	3,52 $\pm$ 4,60
1536	α s1-CN f(1–13)	Gouldsworthy (1996)	2,07 $\pm$ 1,99	5,61 $\pm$ 5,57	7,68 $\pm$ 9,43	5,74 $\pm$ 7,66	5,21 $\pm$ 8,55
*1556	β -CN f(193–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	2,24 $\pm$ 2,64	5,07 $\pm$ 5,08	3,62 $\pm$ 3,46	14,14 $\pm$ 4,55
*1590	beta-cn f(195–209)	Soeryapranata (2004)	0,31 $\pm$ 0,68	1,21 $\pm$ 1,74	0,21 $\pm$ 0,62	0,34 $\pm$ 0,86	0,00 $\pm$ 0,00
1619	α s1-CN f(131–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,11 $\pm$ 0,39	8,12 $\pm$ 2,36	7,90 $\pm$ 4,04	6,74 $\pm$ 2,75	11,32 $\pm$ 2,22
*1665	α s1-CN f(1–14)	Soeryapranata (2004)	3,61 $\pm$ 3,05	10,69 $\pm$ 9,13	13,04 $\pm$ 12,87	10,04 $\pm$ 12,20	9,93 $\pm$ 11,07
*1669	β -CN f(193–207)	YuFangLiu (2017)	0,04 $\pm$ 0,18	12,07 $\pm$ 2,66	20,77 $\pm$ 6,30	11,71 $\pm$ 4,76	29,72 $\pm$ 6,11
1682	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,86	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1687	β -CN f(125–139)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,49 $\pm$ 3,61	4,14 $\pm$ 6,82	1,79 $\pm$ 3,66	2,39 $\pm$ 5,12
1691	κ -CN f(41–54)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,29 $\pm$ 2,58	9,28 $\pm$ 5,60	3,01 $\pm$ 3,38	12,70 $\pm$ 5,55

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1701	β -CN f(12-24)	Soeryapranata (2004)	0,57 $\pm$ 0,93	0,96 $\pm$ 1,64	0,44 $\pm$ 0,94	0,69 $\pm$ 1,18	0,33 $\pm$ 1,19
1703	**	-	1,64 $\pm$ 1,96	1,00 $\pm$ 2,84	1,46 $\pm$ 4,24	0,83 $\pm$ 3,06	0,35 $\pm$ 1,80
*1718	β -CN f(194-209)	Soeryapranata (2004)	13,63 $\pm$ 4,08	32,29 $\pm$ 3,28	25,91 $\pm$ 5,04	20,92 $\pm$ 4,69	18,96 $\pm$ 2,21
*1740	β -CN f(57-72)	Padghan (2012)	1,86 $\pm$ 1,67	8,84 $\pm$ 3,97	10,45 $\pm$ 5,70	5,63 $\pm$ 3,29	8,09 $\pm$ 3,69
1756	**	-	4,37 $\pm$ 2,37	5,38 $\pm$ 3,36	4,94 $\pm$ 5,79	2,06 $\pm$ 2,92	0,00 $\pm$ 0,00
1782	β -CN f(193-208)	Gouldsworthy (1996)	5,57 $\pm$ 1,57	17,57 $\pm$ 2,27	24,34 $\pm$ 4,63	20,34 $\pm$ 4,20	46,68 $\pm$ 5,30
1804	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	4,94 $\pm$ 3,16	11,12 $\pm$ 6,24	5,61 $\pm$ 3,69	24,13 $\pm$ 10,25
1820	α s1-CN f(180-196)	-	1,84 $\pm$ 1,53	1,45 $\pm$ 2,31	8,50 $\pm$ 6,56	3,39 $\pm$ 3,67	12,40 $\pm$ 6,37
1863	α s1-CN f(151-165)	Yan Jin et al. (2016)	3,23 $\pm$ 1,95	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1877	α s1-CN f(1-16)	Gagnaire (2001)	49,35 $\pm$ 20,64	1,79 $\pm$ 4,36	1,30 $\pm$ 3,70	1,27 $\pm$ 3,64	0,00 $\pm$ 0,00
*1881	β -CN f(193-209)	Ong (2008); Lund (2004)	99,40 $\pm$ 2,32	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
1899	α s1-CN f(183-199)	Yan Jin et al. (2016)	10,09 $\pm$ 7,60	0,23 $\pm$ 1,15	0,45 $\pm$ 2,27	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1903	β -CN f(126-142)	Yan Jin et al. (2016)	14,54 $\pm$ 6,98	21,93 $\pm$ 9,79	32,42 $\pm$ 16,07	20,67 $\pm$ 9,73	32,67 $\pm$ 12,29
1905	α s1-CN f(8-23)	Yan Jin et al. (2016)	2,68 $\pm$ 3,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1915	α s1-CN f(180-196)	Yan Jin et al. (2016)	26,23 $\pm$ 23,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1919	**	-	39,07 $\pm$ 20,00	15,34 $\pm$ 6,49	22,27 $\pm$ 13,12	13,47 $\pm$ 7,82	15,15 $\pm$ 6,54
1921	**	-	1,47 $\pm$ 4,78	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1925	α s2-CN f(99-114)	Yan Jin et al. (2016)	2,73 $\pm$ 2,34	5,63 $\pm$ 3,44	8,87 $\pm$ 5,84	5,00 $\pm$ 3,01	8,76 $\pm$ 3,69
1937	**	-	5,18 $\pm$ 5,38	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1941	**	-	7,15 $\pm$ 5,27	3,94 $\pm$ 3,23	6,06 $\pm$ 6,12	3,41 $\pm$ 3,33	2,86 $\pm$ 3,65
1947	α s2-CN f(107-123)	Yan Jin et al. (2016)	0,86 $\pm$ 1,46	0,30 $\pm$ 1,51	0,77 $\pm$ 2,72	0,16 $\pm$ 0,82	0,72 $\pm$ 2,17
1953	**	-	3,94 $\pm$ 4,17	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1957	α s1-CN f(136-151)	Yan Jin et al. (2016)	5,78 $\pm$ 4,93	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1959	**	-	2,55 $\pm$ 3,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1963	β -CN f(172-188)	Yan Jin et al. (2016)	2,97 $\pm$ 3,17	0,58 $\pm$ 1,67	1,38 $\pm$ 3,62	0,41 $\pm$ 1,47	0,00 $\pm$ 0,00
1979	**	-	3,88 $\pm$ 4,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1991	α s1-CN f(1-17)	Broadbent (1998)	9,38 $\pm$ 5,57	8,05 $\pm$ 7,33	6,99 $\pm$ 8,16	6,51 $\pm$ 8,20	1,97 $\pm$ 3,81
1995	**	-	1,56 $\pm$ 2,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
2013	**	-	0,61 ± 1,29	0,77 ± 2,19	0,80 ± 2,95	1,29 ± 2,84	0,00 ± 0,00
2029	αs1-CN f(182–199)	Yan Jin et al. (2016)	3,44 ± 2,96	0,26 ± 1,32	0,00 ± 0,00	0,39 ± 1,98	0,00 ± 0,00
2107	β-CN f(191–209)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 ± 0,00	3,44 ± 1,92	2,32 ± 2,85	2,24 ± 1,78	0,19 ± 0,67
2254	αs1-CN f(125–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,73 ± 0,94	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2338	β-CN f(108–127)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,92 ± 1,81
2347	**	-	1,82 ± 1,74	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2385	**	-	0,54 ± 0,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2462	**	-	1,18 ± 1,19	0,74 ± 1,42	0,06 ± 0,28	0,42 ± 1,14	0,00 ± 0,00
2463	**	-	0,60 ± 0,91	0,42 ± 0,94	0,00 ± 0,00	1,43 ± 1,63	0,00 ± 0,00
2677	β-CN f(166–189)	Yan Jin et al. (2016)	1,29 ± 1,25	1,26 ± 1,78	0,32 ± 0,95	0,36 ± 0,92	0,00 ± 0,00
2678	**	-	0,62 ± 0,97	0,89 ± 1,34	1,18 ± 1,76	1,99 ± 1,86	0,00 ± 0,00
*2764	αs1-CN f(1–23)	Gagnaire (2001)	3,14 ± 1,15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,09
2801	**	-	0,21 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2825	**	-	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,67	0,21 ± 0,63	0,47 ± 0,71	0,00 ± 0,00
2835	**	-	0,45 ± 0,77	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,28	0,00 ± 0,00
2836	**	-	0,70 ± 0,68	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,15	0,00 ± 0,00
2878	**	-	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,60	0,24 ± 0,70	0,34 ± 0,66	0,00 ± 0,00
3050	αs1-CN f(125–150)	Yan Jin et al. (2016)	0,50 ± 0,94	0,03 ± 0,14	0,15 ± 0,38	0,12 ± 0,44	0,04 ± 0,18
3051	**	-	0,89 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,15	0,22 ± 0,42	0,05 ± 0,27

*Peptídeos com potencial bioativo descrito na literatura. **Peptídeos não identificados

Tabela 4 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (continua).

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
*656	β -CN (25–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 1,82	0,76 $\pm$ 1,69	0,31 $\pm$ 1,35	2,55 $\pm$ 4,50
666	**	-	0,96 $\pm$ 1,05	0,95 $\pm$ 2,32	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 2,04	0,00 $\pm$ 0,00
672	κ -CN f(75–79)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,81 $\pm$ 1,74	1,10 $\pm$ 1,58	1,65 $\pm$ 2,98	2,86 $\pm$ 5,97
682	**	-	1,59 $\pm$ 1,48	0,50 $\pm$ 1,58	0,05 $\pm$ 0,24	0,30 $\pm$ 1,15	0,00 $\pm$ 0,00
*748	α s1-CN f(194–199)	Pihlanto-Leppälä et al. (1998)	0,00 $\pm$ 0,00	1,52 $\pm$ 1,80	1,70 $\pm$ 2,13	0,58 $\pm$ 1,32	1,04 $\pm$ 2,23
791	α s1-CN f(18–23)	Yan Jin et al. (2016)	3,91 $\pm$ 4,55	0,08 $\pm$ 0,42	0,16 $\pm$ 0,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
792	**	-	2,27 $\pm$ 3,25	0,68 $\pm$ 1,48	0,82 $\pm$ 1,47	2,12 $\pm$ 2,95	0,00 $\pm$ 0,00
893	**	-	1,02 $\pm$ 1,24	0,46 $\pm$ 1,45	0,00 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,81	0,00 $\pm$ 0,00
905	α s1-CN f(17–23)	Alli (1998)	15,52 $\pm$ 17,77	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
910	α s2-CN f(118–125)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,75 $\pm$ 1,54	2,03 $\pm$ 2,44	0,68 $\pm$ 1,39	0,00 $\pm$ 0,00
927	α s2-CN f(83–89)	Yan Jin et al. (2016)	1,37 $\pm$ 2,02	0,43 $\pm$ 1,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,59 $\pm$ 2,09	0,00 $\pm$ 0,00
928	β -CN f(134–141)	Yan Jin et al. (2016)	0,43 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 1,96	1,04 $\pm$ 1,48	3,05 $\pm$ 3,32	0,22 $\pm$ 1,13
943	α s1-CN f(14–21)	Yan Jin et al. (2016)	4,00 $\pm$ 5,27	0,49 $\pm$ 1,09	0,00 $\pm$ 0,00	0,71 $\pm$ 2,14	0,00 $\pm$ 0,00
944	α s2-CN f(196–203)	Yan Jin et al. (2016)	1,04 $\pm$ 1,85	0,37 $\pm$ 1,12	0,00 $\pm$ 0,00	2,77 $\pm$ 2,78	0,00 $\pm$ 0,00
1023	κ -CN f(18–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,55	1,90 $\pm$ 2,14	0,60 $\pm$ 1,40	0,30 $\pm$ 1,55
1075	α s2-CN f(80–88)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,51 $\pm$ 1,80	0,31 $\pm$ 0,90	2,71 $\pm$ 2,60	0,00 $\pm$ 0,00
1090	α s1-CN f(25–34)	Yan Jin et al. (2016)	1,25 $\pm$ 1,67	0,28 $\pm$ 1,00	0,07 $\pm$ 0,37	0,86 $\pm$ 2,30	0,00 $\pm$ 0,00
1091	α s1-CN f(191–199)	Yan Jin et al. (2016)	1,32 $\pm$ 1,64	0,75 $\pm$ 1,36	0,93 $\pm$ 1,69	2,76 $\pm$ 2,41	0,00 $\pm$ 0,00
1118	α s1-CN f(15–23)	Soeryapranata (2008)	3,08 $\pm$ 1,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1122	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,96	0,00 $\pm$ 0,00	1,85 $\pm$ 4,24
1123	α s2-CN f(176–184)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,05 $\pm$ 2,18	0,22 $\pm$ 0,80	9,57 $\pm$ 11,49
1139	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,85 $\pm$ 2,24	0,00 $\pm$ 0,00	7,36 $\pm$ 10,28
*1141	α s1-CN f(1–9)	Broadbent (1998)	1,75 $\pm$ 1,73	0,00 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,87	0,66 $\pm$ 1,68	0,37 $\pm$ 1,90
*1151	β -CN f(199–209)	Addeo (1992)	2,16 $\pm$ 1,14	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,28	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1152	β -CN f(197–207)	Soeryapranata (2004)	1,13 $\pm$ 1,26	0,66 $\pm$ 1,15	0,38 $\pm$ 1,02	0,00 $\pm$ 0,00	2,45 $\pm$ 3,39

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1199	α s1-CN f(23–32)	Yan Jin et al. (2016)	6,65 $\pm$ 4,43	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,91 $\pm$ 2,02	0,00 $\pm$ 0,00
1204	α s1-CN f(143–151)	Yan Jin et al. (2016)	3,81 $\pm$ 2,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1221	κ -CN f(42–51)	Yan Jin et al. (2016)	1,23 $\pm$ 1,61	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1237	α s1-CN f(24–34)	Yan Jin et al. (2016)	3,02 $\pm$ 3,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
*1247	α s1-CN f(14–23)	Soeryapranata (2008)	1,22 $\pm$ 1,06	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1265	α s1-CN f(115–124)	Soeryapranata (2008)	0,00 $\pm$ 0,00	2,46 $\pm$ 2,19	3,62 $\pm$ 2,14	0,00 $\pm$ 0,00	2,86 $\pm$ 4,36
1312	β -CN f(152–163)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	4,96 $\pm$ 4,79	6,89 $\pm$ 5,29	4,30 $\pm$ 5,71	5,39 $\pm$ 6,61
1323	α s2-CN f(115–126)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	11,70 $\pm$ 9,28
1334	β -CN f(134–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 1,37	0,16 $\pm$ 0,81	1,28 $\pm$ 2,51	0,00 $\pm$ 0,00
1339	α s1-CN f(147–156)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	8,16 $\pm$ 9,63
1345	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	7,98 $\pm$ 10,31
*1364	β -CN f(122–132)	Ahtesh (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	4,01 $\pm$ 1,82	4,87 $\pm$ 1,58	3,95 $\pm$ 2,31	2,41 $\pm$ 3,14
1376	α s1-CN f(8–19)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,58	0,00 $\pm$ 0,00	0,84 $\pm$ 2,21
1377	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,21 $\pm$ 4,75
1386	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00
*1393	β -CN f(194–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,99 $\pm$ 1,59	2,91 $\pm$ 2,56	0,00 $\pm$ 0,00	5,32 $\pm$ 5,52
1405	κ -CN f(127–140)	Yan Jin et al. (2016)	1,26 $\pm$ 1,29	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1506	β -CN f(194–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	8,12 $\pm$ 4,32	8,87 $\pm$ 2,69	1,42 $\pm$ 2,08	17,22 $\pm$ 7,31
1517	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	2,34 $\pm$ 3,15	3,46 $\pm$ 3,03	2,51 $\pm$ 3,50	0,00 $\pm$ 0,00
1528	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	1,28 $\pm$ 2,32	0,46 $\pm$ 1,44	0,00 $\pm$ 0,00	5,57 $\pm$ 5,93
1533	α s1-CN f(150–161)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,05 $\pm$ 2,78	3,72 $\pm$ 3,36	1,92 $\pm$ 3,02	0,00 $\pm$ 0,00
1536	α s1-CN f(1–13)	Gouldsworthy (1996)	2,46 $\pm$ 1,99	6,69 $\pm$ 7,35	8,32 $\pm$ 7,71	3,47 $\pm$ 5,13	3,32 $\pm$ 5,86
*1556	β -CN f(193–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	2,43 $\pm$ 2,84	4,30 $\pm$ 2,72	1,00 $\pm$ 0,61	9,71 $\pm$ 4,99
*1590	beta-cn f(195–209)	Soeryapranata (2004)	0,06 $\pm$ 0,32	0,41 $\pm$ 0,87	0,21 $\pm$ 0,74	0,09 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,00
1619	α s1-CN f(131–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	7,60 $\pm$ 2,65	6,92 $\pm$ 1,41	0,00 $\pm$ 0,00	11,36 $\pm$ 4,23
*1665	α s1-CN f(1–14)	Soeryapranata (2004)	4,88 $\pm$ 3,16	12,55 $\pm$ 12,50	12,14 $\pm$ 10,63	2,89 $\pm$ 4,67	4,11 $\pm$ 6,53
*1669	β -CN f(193–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	8,45 $\pm$ 2,96	12,64 $\pm$ 2,43	1,10 $\pm$ 1,70	33,59 $\pm$ 9,26
1682	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,53	0,12 $\pm$ 0,64	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1687	β-CN f(125–139)	Yan Jin et al. (2016)	0,13 ± 0,66	3,29 ± 5,51	3,27 ± 4,32	0,68 ± 2,40	0,00 ± 0,00
1691	κ-CN f(41–54)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 ± 0,00	0,82 ± 2,14	4,16 ± 2,91	0,00 ± 0,00	13,57 ± 8,00
1701	β-CN f(12–24)	Soeryapranata (2004)	0,84 ± 1,22	3,06 ± 2,05	1,00 ± 1,65	1,03 ± 1,36	0,75 ± 1,85
1703	**	-	1,71 ± 2,51	2,20 ± 3,84	2,07 ± 3,30	0,26 ± 1,31	0,00 ± 0,00
*1718	β-CN f(194–209)	Soeryapranata (2004)	15,04 ± 5,92	31,67 ± 6,24	22,90 ± 3,51	29,22 ± 6,04	23,02 ± 3,81
*1740	β-CN f(57–72)	Padghan (2012)	1,74 ± 1,65	8,13 ± 4,44	6,91 ± 3,06	12,30 ± 6,66	8,35 ± 4,91
1756	**	-	4,66 ± 2,48	4,49 ± 3,55	3,62 ± 3,47	8,28 ± 4,85	0,00 ± 0,00
1782	β-CN f(193–208)	Gouldsworthy (1996)	5,73 ± 1,76	16,88 ± 3,39	19,35 ± 3,80	2,91 ± 2,26	39,98 ± 6,62
1804	**	-	0,00 ± 0,00	4,21 ± 2,73	7,15 ± 3,23	1,28 ± 2,49	25,83 ± 12,92
1820	αs1-CN f(180–196)	-	2,08 ± 1,47	1,75 ± 2,45	5,77 ± 3,40	0,00 ± 0,00	15,40 ± 10,64
1863	αs1-CN f(151–165)	Yan Jin et al. (2016)	3,65 ± 2,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1877	αs1-CN f(1–16)	Gagnaire (2001)	53,41 ± 21,10	5,50 ± 5,97	1,26 ± 3,63	6,15 ± 8,75	0,00 ± 0,00
*1881	β-CN f(193–209)	Ong (2008); Lund (2004)	99,85 ± 0,78	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
1899	αs1-CN f(183–199)	Yan Jin et al. (2016)	10,45 ± 6,79	1,55 ± 3,59	0,00 ± 0,00	4,82 ± 6,74	0,00 ± 0,00
1903	β-CN f(126–142)	Yan Jin et al. (2016)	13,57 ± 5,95	20,66 ± 9,55	25,17 ± 9,89	34,82 ± 15,94	29,37 ± 12,66
1905	αs1-CN f(8–23)	Yan Jin et al. (2016)	4,01 ± 3,65	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1915	αs1-CN f(180–196)	Yan Jin et al. (2016)	26,68 ± 19,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,37 ± 3,83	0,00 ± 0,00
1919	**	-	38,85 ± 16,77	13,41 ± 6,16	17,85 ± 8,22	23,99 ± 11,78	16,71 ± 8,69
1921	**	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,50 ± 3,91	0,00 ± 0,00
1925	αs2-CN f(99–114)	Yan Jin et al. (2016)	2,74 ± 1,70	5,34 ± 2,85	6,50 ± 3,29	9,88 ± 5,72	7,19 ± 4,79
1937	**	-	5,00 ± 4,66	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1941	**	-	6,53 ± 3,68	4,31 ± 2,47	5,09 ± 3,34	8,01 ± 5,08	1,48 ± 3,15
1947	αs2-CN f(107–123)	Yan Jin et al. (2016)	0,26 ± 0,74	1,31 ± 2,15	1,69 ± 2,69	4,99 ± 4,14	0,00 ± 0,00
1953	**	-	4,17 ± 4,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1957	αs1-CN f(136–151)	Yan Jin et al. (2016)	5,52 ± 3,20	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,73	0,53 ± 1,93	0,00 ± 0,00
1959	**	-	2,30 ± 3,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1963	β-CN f(172–188)	Yan Jin et al. (2016)	2,49 ± 2,02	1,25 ± 2,25	2,30 ± 2,83	5,13 ± 3,84	0,00 ± 0,00
1979	**	-	3,58 ± 2,90	0,26 ± 0,91	0,00 ± 0,00	0,65 ± 1,64	0,00 ± 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1991	α s1-CN f(1-17)	Broadbent (1998)	11,08 $\pm$ 6,13	6,98 $\pm$ 7,02	5,56 $\pm$ 4,81	4,90 $\pm$ 7,25	0,00 $\pm$ 0,00
1995	**	-	1,74 $\pm$ 1,66	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,29 $\pm$ 1,46
2013	**	-	1,04 $\pm$ 1,52	1,15 $\pm$ 2,96	0,64 $\pm$ 1,81	2,34 $\pm$ 4,02	0,00 $\pm$ 0,00
2029	α s1-CN f(182-199)	Yan Jin et al. (2016)	3,89 $\pm$ 2,87	0,55 $\pm$ 1,96	0,00 $\pm$ 0,00	1,35 $\pm$ 2,61	0,00 $\pm$ 0,00
2107	β -CN f(191-209)	Yan Jin et al. (2016)	0,09 $\pm$ 0,33	2,41 $\pm$ 1,91	1,24 $\pm$ 1,59	0,35 $\pm$ 0,84	1,17 $\pm$ 2,06
2254	α s1-CN f(125-144)	Yan Jin et al. (2016)	1,27 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,30	0,00 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,75
2338	β -CN f(108-127)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,09 $\pm$ 2,83
2347	**	-	2,41 $\pm$ 1,67	0,41 $\pm$ 1,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,53	0,00 $\pm$ 0,00
2385	**	-	0,78 $\pm$ 0,87	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2462	**	-	1,14 $\pm$ 1,09	0,88 $\pm$ 1,35	0,21 $\pm$ 0,51	0,06 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00
2463	**	-	0,49 $\pm$ 0,82	0,48 $\pm$ 0,86	0,04 $\pm$ 0,19	1,41 $\pm$ 1,59	0,00 $\pm$ 0,00
2677	β -CN f(166-189)	Yan Jin et al. (2016)	1,18 $\pm$ 1,04	1,10 $\pm$ 1,38	0,42 $\pm$ 0,87	0,07 $\pm$ 0,34	0,00 $\pm$ 0,00
2678	**	-	1,09 $\pm$ 0,83	1,19 $\pm$ 1,52	0,89 $\pm$ 1,09	1,99 $\pm$ 1,67	0,75 $\pm$ 0,00
*2764	α s1-CN f(1-23)	Gagnaire (2001)	1,58 $\pm$ 1,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,87 $\pm$ 0,86	0,00 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,25
2801	**	-	0,17 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2825	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	1,81 $\pm$ 1,32	0,25 $\pm$ 0,57	0,09 $\pm$ 0,30	0,00 $\pm$ 0,00
2835	**	-	0,29 $\pm$ 0,58	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2836	**	-	0,89 $\pm$ 0,79	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,23	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,22
2878	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,90 $\pm$ 0,74	0,24 $\pm$ 0,46	0,18 $\pm$ 0,44	0,00 $\pm$ 0,00
3050	α s1-CN f(125-150)	Yan Jin et al. (2016)	0,44 $\pm$ 0,81	0,00 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,27	0,05 $\pm$ 0,25	0,04 $\pm$ 0,22
3051	**	-	0,99 $\pm$ 0,81	0,06 $\pm$ 0,28	0,12 $\pm$ 0,37	0,00 $\pm$ 0,00	0,31 $\pm$ 0,76

*Peptídeos com potencial bioativo descrito na literatura; **Peptídeos não identificados

Tabela 5 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % de amostras de queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (continua).

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
*656	β -CN (25–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	1,97 $\pm$ 3,71	1,82 $\pm$ 3,63	0,30 $\pm$ 1,08	1,72 $\pm$ 3,08
666	**	-	1,11 $\pm$ 1,28	0,05 $\pm$ 0,24	0,12 $\pm$ 0,43	0,00 $\pm$ 0,00	0,86 $\pm$ 4,06
672	κ -CN f(75–79)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,71 $\pm$ 3,19	2,58 $\pm$ 4,00	0,58 $\pm$ 1,93	1,53 $\pm$ 3,09
682	**	-	1,67 $\pm$ 1,68	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,05 $\pm$ 5,33
*748	α s1-CN f(194–199)	Pihlanto-Leppälä et al. (1998)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 1,38	2,31 $\pm$ 2,85	0,55 $\pm$ 1,38
791	α s1-CN f(18–23)	Yan Jin et al. (2016)	3,06 $\pm$ 4,15	1,41 $\pm$ 2,44	0,74 $\pm$ 1,44	0,57 $\pm$ 1,50	0,00 $\pm$ 0,00
792	**	-	1,89 $\pm$ 2,63	1,21 $\pm$ 1,85	1,92 $\pm$ 2,61	2,77 $\pm$ 2,81	0,24 $\pm$ 0,86
893	**	-	1,59 $\pm$ 1,70	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
905	α s1-CN f(17–23)	Alli (1998)	13,07 $\pm$ 17,21	0,28 $\pm$ 0,98	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
910	α s2-CN f(118–125)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 1,11	0,00 $\pm$ 0,00	3,09 $\pm$ 2,99	0,27 $\pm$ 0,95
927	α s2-CN f(83–89)	Yan Jin et al. (2016)	0,74 $\pm$ 0,92	1,49 $\pm$ 2,43	0,35 $\pm$ 1,18	0,56 $\pm$ 1,39	0,00 $\pm$ 0,00
928	β -CN f(134–141)	Yan Jin et al. (2016)	0,68 $\pm$ 1,25	1,36 $\pm$ 2,18	2,25 $\pm$ 2,88	2,39 $\pm$ 2,44	1,28 $\pm$ 2,21
943	α s1-CN f(14–21)	Yan Jin et al. (2016)	1,86 $\pm$ 2,05	1,63 $\pm$ 2,71	0,90 $\pm$ 1,73	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
944	α s2-CN f(196–203)	Yan Jin et al. (2016)	1,80 $\pm$ 3,03	0,69 $\pm$ 1,37	1,42 $\pm$ 2,28	1,30 $\pm$ 2,07	0,00 $\pm$ 0,00
1023	κ -CN f(18–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,60 $\pm$ 1,48	0,14 $\pm$ 0,70	2,20 $\pm$ 2,34	0,39 $\pm$ 1,22
1075	α s2-CN f(80–88)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,64 $\pm$ 2,00	3,15 $\pm$ 3,58	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1090	α s1-CN f(25–34)	Yan Jin et al. (2016)	0,57 $\pm$ 0,75	1,33 $\pm$ 2,07	1,08 $\pm$ 2,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1091	α s1-CN f(191–199)	Yan Jin et al. (2016)	0,68 $\pm$ 0,98	0,29 $\pm$ 0,85	2,97 $\pm$ 3,20	0,17 $\pm$ 0,88	0,00 $\pm$ 0,00
1118	α s1-CN f(15–23)	Soeryapranata (2008)	2,46 $\pm$ 1,74	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1122	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 1,02
1123	α s2-CN f(176–184)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,12 $\pm$ 2,46	4,27 $\pm$ 4,94
1139	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,38 $\pm$ 2,37	2,84 $\pm$ 4,11
*1141	α s1-CN f(1–9)	Broadbent (1998)	2,28 $\pm$ 1,89	0,00 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 1,82	0,85 $\pm$ 2,13	0,57 $\pm$ 1,66
*1151	β -CN f(199–209)	Addeo (1992)	1,83 $\pm$ 1,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1152	β -CN f(197–207)	Soeryapranata (2004)	0,47 $\pm$ 0,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,29	1,83 $\pm$ 2,14	1,36 $\pm$ 1,74

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1199	α s1-CN f(23–32)	Yan Jin et al. (2016)	3,32 $\pm$ 3,66	0,32 $\pm$ 0,92	0,19 $\pm$ 0,95	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1204	α s1-CN f(143–151)	Yan Jin et al. (2016)	2,58 $\pm$ 1,64	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1221	κ -CN f(42–51)	Yan Jin et al. (2016)	0,70 $\pm$ 1,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1237	α s1-CN f(24–34)	Yan Jin et al. (2016)	1,15 $\pm$ 1,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
*1247	α s1-CN f(14–23)	Soeryapranata (2008)	1,29 $\pm$ 1,09	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1265	α s1-CN f(115–124)	Soeryapranata (2008)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,31 $\pm$ 2,81	0,00 $\pm$ 0,00
1312	β -CN f(152–163)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	5,44 $\pm$ 3,87	4,05 $\pm$ 3,19	13,15 $\pm$ 7,19	5,58 $\pm$ 5,97
1323	α s2-CN f(115–126)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,70 $\pm$ 4,04
1334	β -CN f(134–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,71	0,00 $\pm$ 0,00	1,01 $\pm$ 2,50	1,33 $\pm$ 2,66
1339	α s1-CN f(147–156)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,59 $\pm$ 3,52
1345	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,26 $\pm$ 3,90
*1364	β -CN f(122–132)	Ahtesh (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	3,86 $\pm$ 1,83	2,65 $\pm$ 1,58	8,10 $\pm$ 2,41	5,76 $\pm$ 2,72
1376	α s1-CN f(8–19)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 1,61	0,00 $\pm$ 0,00
1378	β -CN f(172–183)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,65 $\pm$ 2,69	0,00 $\pm$ 0,00
1386	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 1,16
*1393	β -CN f(194–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,89 $\pm$ 3,12	0,00 $\pm$ 0,00
1405	κ -CN f(127–140)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,91	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1506	β -CN f(194–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	3,87 $\pm$ 2,34	0,26 $\pm$ 0,73	15,14 $\pm$ 4,98	1,07 $\pm$ 1,72
1517	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	2,90 $\pm$ 3,25	0,49 $\pm$ 1,71	4,35 $\pm$ 4,38	0,75 $\pm$ 2,14
1528	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,77 $\pm$ 4,01	0,00 $\pm$ 0,00
1533	α s1-CN f(150–161)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,37 $\pm$ 3,35	1,26 $\pm$ 2,37	5,25 $\pm$ 4,28	0,00 $\pm$ 0,00
1536	α s1-CN f(1–13)	Gouldsworthy (1996)	2,62 $\pm$ 2,24	5,38 $\pm$ 5,12	3,51 $\pm$ 4,06	16,49 $\pm$ 11,46	2,12 $\pm$ 3,81
*1556	β -CN f(193–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 1,85	0,00 $\pm$ 0,00
*1590	beta-cn f(195–209)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,30	0,07 $\pm$ 0,34	0,41 $\pm$ 1,17	0,33 $\pm$ 0,79
1619	α s1-CN f(131–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	11,93 $\pm$ 3,24	0,00 $\pm$ 0,00
*1665	α s1-CN f(1–14)	Soeryapranata (2004)	2,22 $\pm$ 2,09	3,59 $\pm$ 4,18	2,67 $\pm$ 3,74	25,94 $\pm$ 17,93	0,74 $\pm$ 2,17
*1669	β -CN f(193–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 1,79	0,16 $\pm$ 0,55	15,98 $\pm$ 4,31	1,36 $\pm$ 1,85
1682	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	2,70 $\pm$ 2,83	0,28 $\pm$ 0,82	0,22 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1687	β -CN f(125–139)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 2,59	7,50 $\pm$ 8,63	0,00 $\pm$ 0,00
1691	κ -CN f(41–54)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,25 $\pm$ 3,82	0,00 $\pm$ 0,00
1701	β -CN f(12–24)	Soeryapranata (2004)	0,12 $\pm$ 0,42	0,44 $\pm$ 1,07	0,70 $\pm$ 1,05	1,89 $\pm$ 2,52	1,43 $\pm$ 1,77
1703	**	-	0,34 $\pm$ 0,82	0,38 $\pm$ 1,95	0,27 $\pm$ 1,35	6,21 $\pm$ 6,56	0,00 $\pm$ 0,00
*1718	β -CN f(194–209)	Soeryapranata (2004)	11,47 $\pm$ 3,65	27,78 $\pm$ 3,92	18,80 $\pm$ 2,72	37,91 $\pm$ 5,61	23,28 $\pm$ 4,64
*1740	β -CN f(57–72)	Padghan (2012)	1,24 $\pm$ 1,26	10,11 $\pm$ 4,94	8,73 $\pm$ 4,84	10,95 $\pm$ 5,25	10,52 $\pm$ 5,35
1756	**	-	3,49 $\pm$ 1,60	6,43 $\pm$ 3,53	5,76 $\pm$ 3,13	7,48 $\pm$ 4,79	4,80 $\pm$ 4,19
1782	β -CN f(193–208)	Gouldsworthy (1996)	2,48 $\pm$ 1,02	4,47 $\pm$ 2,49	1,65 $\pm$ 1,63	21,89 $\pm$ 3,82	1,76 $\pm$ 2,19
1804	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 1,36	0,41 $\pm$ 1,41	8,21 $\pm$ 3,81	7,17 $\pm$ 4,50
1820	α s1-CN f(180–196)	Yan Jin et al. (2016)	0,07 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,26 $\pm$ 4,52	4,40 $\pm$ 3,90
1863	α s1-CN f(151–165)	Yan Jin et al. (2016)	2,73 $\pm$ 1,82	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1877	α s1-CN f(1–16)	Gagnaire (2001)	55,33 $\pm$ 21,79	21,68 $\pm$ 14,25	5,85 $\pm$ 5,92	6,53 $\pm$ 6,46	0,00 $\pm$ 0,00
*1881	β -CN f(193–209)	Ong (2008); Lund (2004)	99,59 $\pm$ 2,10	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
1899	α s1-CN f(183–199)	Yan Jin et al. (2016)	11,07 $\pm$ 5,91	10,89 $\pm$ 9,56	4,17 $\pm$ 5,52	1,92 $\pm$ 3,72	0,00 $\pm$ 0,00
1903	β -CN f(126–142)	Yan Jin et al. (2016)	13,84 $\pm$ 5,83	31,31 $\pm$ 14,79	37,94 $\pm$ 18,11	24,29 $\pm$ 9,04	37,30 $\pm$ 17,43
1905	α s1-CN f(8–23)	Yan Jin et al. (2016)	1,96 $\pm$ 2,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1915	α s1-CN f(180–196)	Yan Jin et al. (2016)	25,66 $\pm$ 13,77	6,79 $\pm$ 7,61	1,91 $\pm$ 3,08	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1919	**	-	33,32 $\pm$ 13,27	19,38 $\pm$ 8,44	24,02 $\pm$ 11,77	18,17 $\pm$ 7,82	20,01 $\pm$ 11,29
1921	**	-	1,90 $\pm$ 4,27	5,09 $\pm$ 6,34	3,35 $\pm$ 4,96	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1925	α s2-CN f(99–114)	Yan Jin et al. (2016)	2,60 $\pm$ 1,86	9,17 $\pm$ 5,73	11,20 $\pm$ 7,20	5,95 $\pm$ 3,17	10,29 $\pm$ 6,45
1937	**	-	5,13 $\pm$ 3,62	1,03 $\pm$ 3,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1941	**	-	6,51 $\pm$ 3,35	7,35 $\pm$ 4,03	8,00 $\pm$ 5,08	5,46 $\pm$ 3,76	6,46 $\pm$ 4,31
1947	α s2-CN f(107–123)	Yan Jin et al. (2016)	2,10 $\pm$ 1,34	3,88 $\pm$ 5,02	6,31 $\pm$ 5,89	0,00 $\pm$ 0,00	4,91 $\pm$ 4,56
1953	**	-	3,95 $\pm$ 2,94	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1957	α s1-CN f(136–151)	Yan Jin et al. (2016)	4,95 $\pm$ 2,81	0,39 $\pm$ 1,42	0,86 $\pm$ 2,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1959	**	-	2,61 $\pm$ 2,35	0,56 $\pm$ 2,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1963	β -CN f(172–188)	Yan Jin et al. (2016)	2,83 $\pm$ 2,21	4,93 $\pm$ 3,45	5,56 $\pm$ 4,10	0,00 $\pm$ 0,00	3,06 $\pm$ 3,70
1979	**	-	3,06 $\pm$ 2,69	0,40 $\pm$ 1,14	1,63 $\pm$ 2,34	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1991	α s1-CN f(1-17)	Broadbent (1998)	9,01 $\pm$ 6,42	9,70 $\pm$ 6,89	5,17 $\pm$ 4,39	14,10 $\pm$ 9,88	1,25 $\pm$ 2,45
1995	**	-	1,45 $\pm$ 1,32	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2013	**	-	0,60 $\pm$ 0,97	3,70 $\pm$ 4,07	1,99 $\pm$ 3,05	3,02 $\pm$ 4,19	0,00 $\pm$ 0,00
2029	α s1-CN f(182-199)	Yan Jin et al. (2016)	3,26 $\pm$ 1,84	1,52 $\pm$ 3,21	0,91 $\pm$ 2,19	1,92 $\pm$ 3,34	0,00 $\pm$ 0,00
2107	β -CN f(191-209)	Yan Jin et al. (2016)	0,04 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 1,32	0,40 $\pm$ 0,76	0,41 $\pm$ 1,27	0,44 $\pm$ 1,19
2254	α s1-CN f(125-144)	Yan Jin et al. (2016)	1,07 $\pm$ 1,78	0,07 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,58
2338	β -CN f(108-127)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 1,18
2347	**	-	1,56 $\pm$ 1,77	2,15 $\pm$ 2,02	0,10 $\pm$ 0,34	0,67 $\pm$ 1,48	0,00 $\pm$ 0,00
2385	**	-	0,39 $\pm$ 0,53	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2462	**	-	0,58 $\pm$ 0,75	1,66 $\pm$ 1,60	1,17 $\pm$ 1,26	1,03 $\pm$ 1,64	0,00 $\pm$ 0,00
2463	**	-	0,18 $\pm$ 0,40	0,80 $\pm$ 1,40	0,53 $\pm$ 1,03	0,86 $\pm$ 1,53	0,00 $\pm$ 0,00
2677	β -CN f(166-189)	Yan Jin et al. (2016)	0,66 $\pm$ 0,75	2,27 $\pm$ 2,08	1,47 $\pm$ 1,30	1,09 $\pm$ 1,76	0,00 $\pm$ 0,00
2678	**	-	0,21 $\pm$ 0,41	1,35 $\pm$ 1,86	0,80 $\pm$ 1,24	2,24 $\pm$ 1,96	0,00 $\pm$ 0,00
*2764	α s1-CN f(1-23)	Gagnaire (2001)	2,02 $\pm$ 0,92	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,53	0,07 $\pm$ 0,26
2801	**	-	0,25 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2825	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 1,14	0,00 $\pm$ 0,00
2835	**	-	0,59 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2836	**	-	0,25 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,20
2878	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,50	0,02 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 1,15	0,00 $\pm$ 0,00
3050	α s1-CN f(125-150)	Yan Jin et al. (2016)	0,58 $\pm$ 0,67	0,03 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,28	0,03 $\pm$ 0,13	0,02 $\pm$ 0,11
3051	**	-	0,52 $\pm$ 0,77	0,06 $\pm$ 0,23	0,02 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,23

*Peptídeos com potencial bioativo descrito na literatura; **Peptídeos não identificados

Tabela 6 – Peptídeos detectados por MALDI-ToF MS na fração solúvel em pH 4,6 e etanol 70 % do queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) reportados em intensidade relativa (intensidade relativa média $\pm$ desvio padrão). (continua).

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
*656	β -CN (25–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	1,97 $\pm$ 3,71	1,82 $\pm$ 3,63	0,30 $\pm$ 1,08	1,72 $\pm$ 3,08
666	**	-	1,11 $\pm$ 1,28	0,05 $\pm$ 0,24	0,12 $\pm$ 0,43	0,00 $\pm$ 0,00	0,86 $\pm$ 4,06
672	κ -CN f(75–79)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,71 $\pm$ 3,19	2,58 $\pm$ 4,00	0,58 $\pm$ 1,93	1,53 $\pm$ 3,09
682	**	-	1,67 $\pm$ 1,68	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,05 $\pm$ 5,33
*748	α s1-CN f(194–199)	Pihlanto-Leppälä et al. (1998)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 1,38	2,31 $\pm$ 2,85	0,55 $\pm$ 1,38
791	α s1-CN f(18–23)	Yan Jin et al. (2016)	3,06 $\pm$ 4,15	1,41 $\pm$ 2,44	0,74 $\pm$ 1,44	0,57 $\pm$ 1,50	0,00 $\pm$ 0,00
792	**	-	1,89 $\pm$ 2,63	1,21 $\pm$ 1,85	1,92 $\pm$ 2,61	2,77 $\pm$ 2,81	0,24 $\pm$ 0,86
893	**	-	1,59 $\pm$ 1,70	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
905	α s1-CN f(17–23)	Alli (1998)	13,07 $\pm$ 17,21	0,28 $\pm$ 0,98	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
910	α s2-CN f(118–125)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 1,11	0,00 $\pm$ 0,00	3,09 $\pm$ 2,99	0,27 $\pm$ 0,95
927	α s2-CN f(83–89)	Yan Jin et al. (2016)	0,74 $\pm$ 0,92	1,49 $\pm$ 2,43	0,35 $\pm$ 1,18	0,56 $\pm$ 1,39	0,00 $\pm$ 0,00
928	β -CN f(134–141)	Yan Jin et al. (2016)	0,68 $\pm$ 1,25	1,36 $\pm$ 2,18	2,25 $\pm$ 2,88	2,39 $\pm$ 2,44	1,28 $\pm$ 2,21
943	α s1-CN f(14–21)	Yan Jin et al. (2016)	1,86 $\pm$ 2,05	1,63 $\pm$ 2,71	0,90 $\pm$ 1,73	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
944	α s2-CN f(196–203)	Yan Jin et al. (2016)	1,80 $\pm$ 3,03	0,69 $\pm$ 1,37	1,42 $\pm$ 2,28	1,30 $\pm$ 2,07	0,00 $\pm$ 0,00
1023	k-CN f(18–29)	Exposito et al. (2006)	0,00 $\pm$ 0,00	0,60 $\pm$ 1,48	0,14 $\pm$ 0,70	2,20 $\pm$ 2,34	0,39 $\pm$ 1,22
1075	α s2-CN f(80–88)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	1,64 $\pm$ 2,00	3,15 $\pm$ 3,58	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1090	α s1-CN f(25–34)	Yan Jin et al. (2016)	0,57 $\pm$ 0,75	1,33 $\pm$ 2,07	1,08 $\pm$ 2,13	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1091	α s1-CN f(191–199)	Yan Jin et al. (2016)	0,68 $\pm$ 0,98	0,29 $\pm$ 0,85	2,97 $\pm$ 3,20	0,17 $\pm$ 0,88	0,00 $\pm$ 0,00
1118	α s1-CN f(15–23)	Soeryapranata (2008)	2,46 $\pm$ 1,74	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1122	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 1,02
1123	α s2-CN f(176–184)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,12 $\pm$ 2,46	4,27 $\pm$ 4,94
1139	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,38 $\pm$ 2,37	2,84 $\pm$ 4,11
*1141	α s1-CN f(1–9)	Broadbent (1998)	2,28 $\pm$ 1,89	0,00 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 1,82	0,85 $\pm$ 2,13	0,57 $\pm$ 1,66
*1151	β -CN f(199–209)	Addeo (1992)	1,83 $\pm$ 1,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1152	β -CN f(197–207)	Soeryapranata (2004)	0,47 $\pm$ 0,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,29	1,83 $\pm$ 2,14	1,36 $\pm$ 1,74

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1199	α s1-CN f(23–32)	Yan Jin et al. (2016)	3,32 $\pm$ 3,66	0,32 $\pm$ 0,92	0,19 $\pm$ 0,95	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1204	α s1-CN f(143–151)	Yan Jin et al. (2016)	2,58 $\pm$ 1,64	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1221	κ -CN f(42–51)	Yan Jin et al. (2016)	0,70 $\pm$ 1,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1237	α s1-CN f(24–34)	Yan Jin et al. (2016)	1,15 $\pm$ 1,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
*1247	α s1-CN f(14–23)	Soeryapranata (2008)	1,29 $\pm$ 1,09	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1265	α s1-CN f(115–124)	Soeryapranata (2008)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,31 $\pm$ 2,81	0,00 $\pm$ 0,00
1312	β -CN f(152–163)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	5,44 $\pm$ 3,87	4,05 $\pm$ 3,19	13,15 $\pm$ 7,19	5,58 $\pm$ 5,97
1323	α s2-CN f(115–126)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,70 $\pm$ 4,04
1334	β -CN f(134–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,71	0,00 $\pm$ 0,00	1,01 $\pm$ 2,50	1,33 $\pm$ 2,66
1339	α s1-CN f(147–156)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,59 $\pm$ 3,52
1345	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,26 $\pm$ 3,90
*1364	β -CN f(122–132)	Ahtesh (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	3,86 $\pm$ 1,83	2,65 $\pm$ 1,58	8,10 $\pm$ 2,41	5,76 $\pm$ 2,72
1376	α s1-CN f(8–19)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 1,61	0,00 $\pm$ 0,00
1378	β -CN f(172–183)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,65 $\pm$ 2,69	0,00 $\pm$ 0,00
1386	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 1,16
*1393	β -CN f(194–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,89 $\pm$ 3,12	0,00 $\pm$ 0,00
1405	κ -CN f(127–140)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,91	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1506	β -CN f(194–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	3,87 $\pm$ 2,34	0,26 $\pm$ 0,73	15,14 $\pm$ 4,98	1,07 $\pm$ 1,72
1517	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	2,90 $\pm$ 3,25	0,49 $\pm$ 1,71	4,35 $\pm$ 4,38	0,75 $\pm$ 2,14
1528	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,77 $\pm$ 4,01	0,00 $\pm$ 0,00
1533	α s1-CN f(150–161)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	2,37 $\pm$ 3,35	1,26 $\pm$ 2,37	5,25 $\pm$ 4,28	0,00 $\pm$ 0,00
1536	α s1-CN f(1–13)	Gouldsworthy (1996)	2,62 $\pm$ 2,24	5,38 $\pm$ 5,12	3,51 $\pm$ 4,06	16,49 $\pm$ 11,46	2,12 $\pm$ 3,81
*1556	β -CN f(193–206)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,85	0,00 $\pm$ 0,00
*1590	beta-cn f(195–209)	Soeryapranata (2004)	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,30	0,07 $\pm$ 0,34	0,41 $\pm$ 1,17	0,33 $\pm$ 0,79
1619	α s1-CN f(131–144)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	11,93 $\pm$ 3,24	0,00 $\pm$ 0,00
*1665	α s1-CN f(1–14)	Soeryapranata (2004)	2,22 $\pm$ 2,09	3,59 $\pm$ 4,18	2,67 $\pm$ 3,74	25,94 $\pm$ 17,93	0,74 $\pm$ 2,17
*1669	β -CN f(193–207)	YuFangLiu (2017)	0,00 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 1,79	0,16 $\pm$ 0,55	15,98 $\pm$ 4,31	1,36 $\pm$ 1,85
1682	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	2,70 $\pm$ 2,83	0,28 $\pm$ 0,82	0,22 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1687	β -CN f(125–139)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 2,59	7,50 $\pm$ 8,63	0,00 $\pm$ 0,00
1691	κ -CN f(41–54)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,25 $\pm$ 3,82	0,00 $\pm$ 0,00
1701	β -CN f(12–24)	Soeryapranata (2004)	0,12 $\pm$ 0,42	0,44 $\pm$ 1,07	0,70 $\pm$ 1,05	1,89 $\pm$ 2,52	1,43 $\pm$ 1,77
1703	**	-	0,34 $\pm$ 0,82	0,38 $\pm$ 1,95	0,27 $\pm$ 1,35	6,21 $\pm$ 6,56	0,00 $\pm$ 0,00
*1718	β -CN f(194–209)	Soeryapranata (2004)	11,47 $\pm$ 3,65	27,78 $\pm$ 3,92	18,80 $\pm$ 2,72	37,91 $\pm$ 5,61	23,28 $\pm$ 4,64
*1740	β -CN f(57–72)	Padghan (2012)	1,24 $\pm$ 1,26	10,11 $\pm$ 4,94	8,73 $\pm$ 4,84	10,95 $\pm$ 5,25	10,52 $\pm$ 5,35
1756	**	-	3,49 $\pm$ 1,60	6,43 $\pm$ 3,53	5,76 $\pm$ 3,13	7,48 $\pm$ 4,79	4,80 $\pm$ 4,19
1782	β -CN f(193–208)	Gouldsworthy (1996)	2,48 $\pm$ 1,02	4,47 $\pm$ 2,49	1,65 $\pm$ 1,63	21,89 $\pm$ 3,82	1,76 $\pm$ 2,19
1804	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 1,36	0,41 $\pm$ 1,41	8,21 $\pm$ 3,81	7,17 $\pm$ 4,50
1820	α s1-CN f(180–196)	Yan Jin et al. (2016)	0,07 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,26 $\pm$ 4,52	4,40 $\pm$ 3,90
1863	α s1-CN f(151–165)	Yan Jin et al. (2016)	2,73 $\pm$ 1,82	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1877	α s1-CN f(1–16)	Gagnaire (2001)	55,33 $\pm$ 21,79	21,68 $\pm$ 14,25	5,85 $\pm$ 5,92	6,53 $\pm$ 6,46	0,00 $\pm$ 0,00
*1881	β -CN f(193–209)	Ong (2008); Lund (2004)	99,59 $\pm$ 2,10	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
1899	α s1-CN f(183–199)	Yan Jin et al. (2016)	11,07 $\pm$ 5,91	10,89 $\pm$ 9,56	4,17 $\pm$ 5,52	1,92 $\pm$ 3,72	0,00 $\pm$ 0,00
1903	β -CN f(126–142)	Yan Jin et al. (2016)	13,84 $\pm$ 5,83	31,31 $\pm$ 14,79	37,94 $\pm$ 18,11	24,29 $\pm$ 9,04	37,30 $\pm$ 17,43
1905	α s1-CN f(8–23)	Yan Jin et al. (2016)	1,96 $\pm$ 2,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1915	α s1-CN f(180–196)	Yan Jin et al. (2016)	25,66 $\pm$ 13,77	6,79 $\pm$ 7,61	1,91 $\pm$ 3,08	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1919	**	-	33,32 $\pm$ 13,27	19,38 $\pm$ 8,44	24,02 $\pm$ 11,77	18,17 $\pm$ 7,82	20,01 $\pm$ 11,29
1921	**	-	1,90 $\pm$ 4,27	5,09 $\pm$ 6,34	3,35 $\pm$ 4,96	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1925	α s2-CN f(99–114)	Yan Jin et al. (2016)	2,60 $\pm$ 1,86	9,17 $\pm$ 5,73	11,20 $\pm$ 7,20	5,95 $\pm$ 3,17	10,29 $\pm$ 6,45
1937	**	-	5,13 $\pm$ 3,62	1,03 $\pm$ 3,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1941	**	-	6,51 $\pm$ 3,35	7,35 $\pm$ 4,03	8,00 $\pm$ 5,08	5,46 $\pm$ 3,76	6,46 $\pm$ 4,31
1947	α s2-CN f(107–123)	Yan Jin et al. (2016)	2,10 $\pm$ 1,34	3,88 $\pm$ 5,02	6,31 $\pm$ 5,89	0,00 $\pm$ 0,00	4,91 $\pm$ 4,56
1953	**	-	3,95 $\pm$ 2,94	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1957	α s1-CN f(136–151)	Yan Jin et al. (2016)	4,95 $\pm$ 2,81	0,39 $\pm$ 1,42	0,86 $\pm$ 2,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1959	**	-	2,61 $\pm$ 2,35	0,56 $\pm$ 2,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1963	β -CN f(172–188)	Yan Jin et al. (2016)	2,83 $\pm$ 2,21	4,93 $\pm$ 3,45	5,56 $\pm$ 4,10	0,00 $\pm$ 0,00	3,06 $\pm$ 3,70
1979	**	-	3,06 $\pm$ 2,69	0,40 $\pm$ 1,14	1,63 $\pm$ 2,34	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

(continuação)

<i>m/z</i>	Peptídeo sugerido	Referência	Dia1	Dia10	Dia20	Dia30	Dia50
1991	α s1-CN f(1-17)	Broadbent (1998)	9,01 $\pm$ 6,42	9,70 $\pm$ 6,89	5,17 $\pm$ 4,39	14,10 $\pm$ 9,88	1,25 $\pm$ 2,45
1995	**	-	1,45 $\pm$ 1,32	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2013	**	-	0,60 $\pm$ 0,97	3,70 $\pm$ 4,07	1,99 $\pm$ 3,05	3,02 $\pm$ 4,19	0,00 $\pm$ 0,00
2029	α s1-CN f(182-199)	Yan Jin et al. (2016)	3,26 $\pm$ 1,84	1,52 $\pm$ 3,21	0,91 $\pm$ 2,19	1,92 $\pm$ 3,34	0,00 $\pm$ 0,00
2107	β -CN f(191-209)	Yan Jin et al. (2016)	0,04 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 1,32	0,40 $\pm$ 0,76	0,41 $\pm$ 1,27	0,44 $\pm$ 1,19
2254	α s1-CN f(125-144)	Yan Jin et al. (2016)	1,07 $\pm$ 1,78	0,07 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,58
2338	β -CN f(108-127)	Yan Jin et al. (2016)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 1,18
2347	**	-	1,56 $\pm$ 1,77	2,15 $\pm$ 2,02	0,10 $\pm$ 0,34	0,67 $\pm$ 1,48	0,00 $\pm$ 0,00
2385	**	-	0,39 $\pm$ 0,53	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2462	**	-	0,58 $\pm$ 0,75	1,66 $\pm$ 1,60	1,17 $\pm$ 1,26	1,03 $\pm$ 1,64	0,00 $\pm$ 0,00
2463	**	-	0,18 $\pm$ 0,40	0,80 $\pm$ 1,40	0,53 $\pm$ 1,03	0,86 $\pm$ 1,53	0,00 $\pm$ 0,00
2677	β -CN f(166-189)	Yan Jin et al. (2016)	0,66 $\pm$ 0,75	2,27 $\pm$ 2,08	1,47 $\pm$ 1,30	1,09 $\pm$ 1,76	0,00 $\pm$ 0,00
2678	**	-	0,21 $\pm$ 0,41	1,35 $\pm$ 1,86	0,80 $\pm$ 1,24	2,24 $\pm$ 1,96	0,00 $\pm$ 0,00
*2764	α s1-CN f(1-23)	Gagnaire (2001)	2,20 $\pm$ 0,92	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,06
2801	**	-	0,25 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2825	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 1,14	0,00 $\pm$ 0,00
2835	**	-	0,59 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2836	**	-	0,25 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,20
2878	**	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,50	0,02 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 1,15	0,00 $\pm$ 0,00
3050	α s1-CN f(125-150)	Yan Jin et al. (2016)	0,58 $\pm$ 0,67	0,03 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,28	0,03 $\pm$ 0,13	0,02 $\pm$ 0,11
3051	**	-	0,52 $\pm$ 0,77	0,06 $\pm$ 0,23	0,02 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,23

*Peptídeos com potencial bioativo descrito na literatura; **Peptídeos não identificados.

Dos 70 peptídeos identificados na literatura, 15 podem ser considerados peptídeos com potencial bioativo com base em estudos anteriores (Tabela 7). Vale ressaltar que todos os peptídeos com potencial bioativo foram encontrados em todos os queijos em algum momento da maturação e que nenhum dos peptídeos identificados e descritos como bioativos foi exclusivo de algum dos tratamentos. O peptídeo β -CN f193-209 (m/z 1881), presente em maior intensidade em todos os queijos durante os 50 dias de maturação, é também um peptídeo reconhecido por seu potencial bioativo, tanto como inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), como também como anti-microbiano (BIRKEMO et al. 2009; JIN et al. 2016). A maior intensidade do peptídeo β -CN f193-209 (m/z 1881) para todos os queijos durante os 50 dias de maturação revela que ele foi resistente à degradação enzimática frente aos diferentes tratamentos avaliados neste trabalho, ou seja, o tratamento térmico do leite, o uso de cultura adjunta e o tempo de maturação. O peptídeo β -CN f193-209 (m/z 1881) é também reconhecido como um peptídeo amargo, cujo acúmulo em queijos pode levar a defeito de sabor (SOERYAPRANATA et al., 2002). Considerando-se que o amargor é um atributo desejado em certo grau de intensidade para o queijo Camembert, a resistência à degradação enzimática, aliada ao seu potencial bioativo, podem ser interessantes, tanto do ponto de vista sensorial como do ponto de vista tecnológico funcional.

Tabela 7 – Relação dos peptídeos com potencial bioativo descritos na literatura e encontrados nos queijos tipo Camembert fabricados.

<i>m/z</i>	Peptídeo	Bioatividade reportada	Referência da bioatividade
656	β -CN f(25–29)	iECA e anti-carcinogénico	Donkor et al., 2007; Exposito et al., 2007
748	α_{s1} -CN f(194-199)	Imunomodulador e iECA	Shahidi & Alasalvar, 2016
1141	α_{s1} -CN f(1-9)	iECA	Saito et al., 2000
1151	β -CN f(199-209)	iECA	Ha et al., 2015
1247	α_{s1} -CN f(14-23)	iECA	Anusha & Bindhu, 2016
1364	β -CN f(122–132)	iECA	Frias et al., 2016
1393	β -CN f(194-206)	iECA	Villegas et al., 2014
1556	β -CN f(193-206)	iECA	Meisel et al., 1994; Liu et al., 2017
1590	β -CN f(195-209)	iECA	Miguel et al., 2006; Quiro's et al., 2007
1665	α_{s1} -CN f(1-14)	Anti-microbiano	Birkemo et al., 2009
1669	β -CN f(193-207)	Imunomodulador e iECA	Nongonierma, 2016
1718	β -CN f(194-209)	iECA	Stepaniak et al., 2001
1740	β -CN f(57-72)	Opióide e iECA	Jarmolowska et al., 1999; Quiro's et al., 2007
1881	β -CN f(193-209)	Anti-microbiano e iECA	Birkemo et al., 2009; Jin et al., 2016
2764	α_{s1} -CN f(1-23)	imunomodulador e Anti-microbiano	Hayes et al., 2006; Martinez_maqueda, 2013

iECA = inibidor da enzima conversora de angiotensina

A complexidade da proteólise do queijo tipo Camembert é claramente evidenciada pelos espectros de massas (Figura 7, 8, 9 e 10) e pelo perfil de peptídeos obtidos (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Além das enzimas presentes nos queijos, que podem hidrolisar as diferentes frações caseica gerando uma enorme variedade de peptídeos, o gradiente de pH desenvolvido durante a maturação dos queijos Camembert corrobora para com essa complexidade. Nos diferentes queijos fabricados neste trabalho, as enzimas são originárias do leite cru ou pasteurizado, da cultura láctica iniciadora, constituída de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, da cultura secundária do fungo *Penicillium candidum*, da adição da cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG e das NSLAB. Assim, o pH variável na superfície e no centro dos queijos (Figura 4) pode proporcionar ambientes favoráveis e/ou desfavoráveis para a atividade das enzimas envolvidas na maturação em diferentes momentos,

Apesar dessa complexidade, alguns comportamentos podem ser destacados. Observa-se que o peptídeo α s1-CN f1-23 (m/z 2764) está presente no primeiro dia de maturação dos quatro diferentes queijos produzidos. Este peptídeo é originário da clássica hidrólise da α s1-caseína pela quimosina residual na ligação peptídica Phe₂₃-Phe₂₄. Considerando-se que a quantidade de quimosina retida nos queijos é diretamente proporcional ao seu conteúdo de umidade, que a quimosina é altamente específica e que seu pH de atividade ótima é ao redor de 5,5 (FOX et al. 2004), é razoável esperar o aparecimento do peptídeo α s1-CN f1-23 (m/z 2764) mais pronunciado nos primeiros dias de maturação. A clivagem inicial da α s1-CN na ligação Phe₂₃-Phe₂₄ possibilita a ação de outras enzimas sob as duas frações da α s1-CN formadas, originando, posteriormente, os peptídeos de baixo peso molecular como α s1-CN f 18–23 (m/z 791), α s1-CN f 17-23 (m/z 905), e α s1-CN f15-23 (m/z 1118), bem como os pequenos peptídeos com potencial bioativo como o α s1-CN f 14-23 (m/z 1247) e α s1-CN f 194-199 (m/z 748) (SHAHIDI & ALASALVAR, 2016; ANUSHA & BINDHU, 2016).

Outros sítios de hidrólise que podem ser pressupostos referem-se à ação do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que produz enzimas capazes de clivar as ligações His₈-Gln₉; Gln₉-Gly₁₀; Gln₁₃-Glu₁₄; Leu₁₆-Asn₁₇ e Leu₂₁-Arg₂₂ da fração α s1-caseína (MCSWEENEY, 2004; FOX, 2000), mais especificamente, utilizando como substrato o peptídeo α s1-CN f1-23 previamente produzido pela ação da quimosina. Essa hidrólise pode ser responsável pelo aparecimento, para todos os queijos, dos peptídeos α s1-CN f 14–21 (m/z 943), α s1-CN f 1-16 (m/z 1877), α s1-CN f(1-13) (m/z 1536) e ainda do peptídeo com potencial bioativo α s1-CN f(1-9) (m/z 1141) (SAITO et al., 2000). Embora diversos sítios de clivagem sejam relacionados na literatura à ação de enzimas produzidos por diferentes cepas de *Lb. rhamnosus* (GUO et al., 2016), não foi possível relacionar peptídeos exclusivos nos queijos em que essa cultura adjunta foi adicionada.

A Análise Discriminante pelo método de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) para cada tratamento ao longo do período de maturação foi realizada com o intuito de melhor avaliar a separação entre os queijos com base no perfil de peptídeos. Além disso, o método evidencia os peptídeos mais importantes para a separação dos queijos através dos gráficos de VIP scores. A análise entre os diferentes tratamentos de queijo tipo Camembert foi baseada nas duas primeiras componentes principais, que juntas, explicavam mais de 50% dos dados, explicadas por uma variância total de dados de 52,9 %, 50,1 %, 50,6 % e 50,5 %, como se observa na Figura 11.

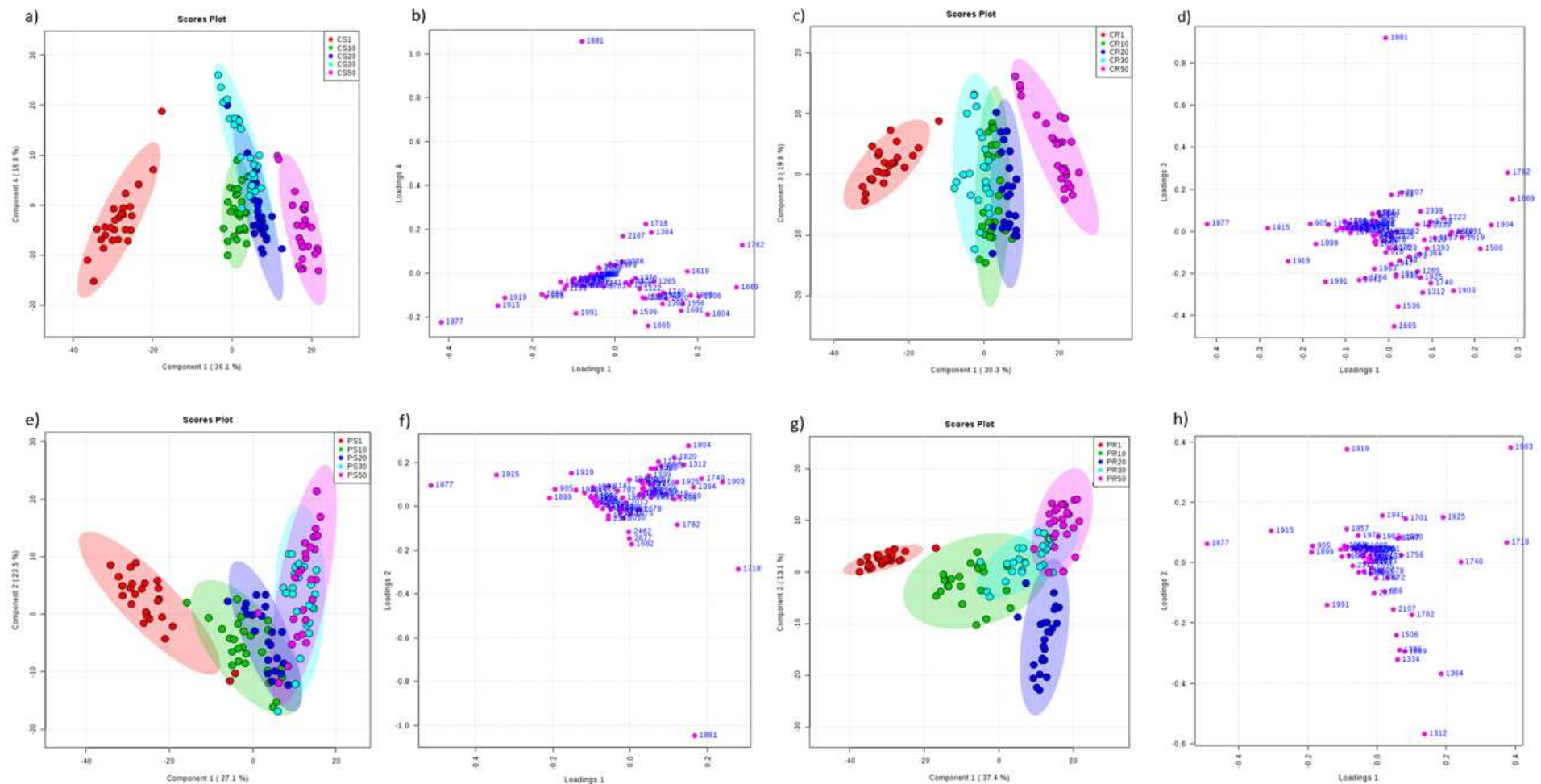


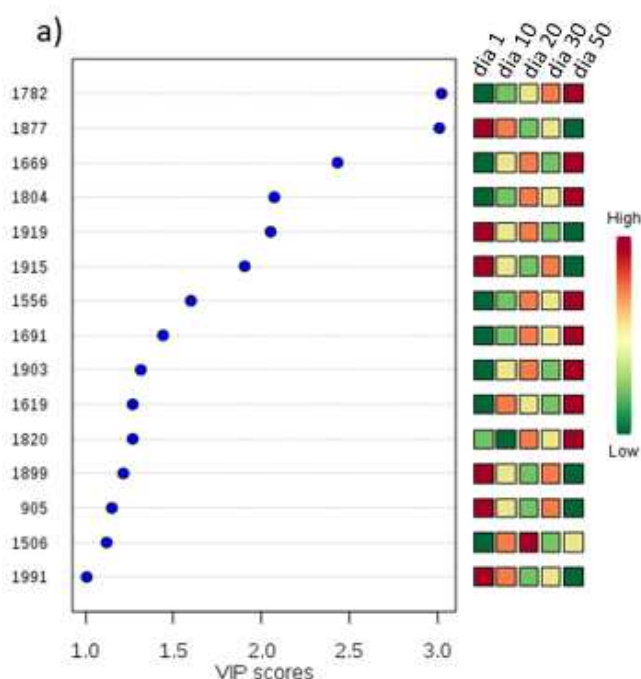
Figura 11 - Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Gráficos de escores e de pesos, respectivamente, para o queijo tipo Camembert (leite cru) (a e b), queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) (c e d), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (e e f) e queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (g e h). Após (●) 1, (●) 10, (●) 20, (●) 30 e (●) 50 dias de maturação. CS: queijo obtido de leite cru; CR: queijo obtido de leite cru e cultura adjunta; PS: queijo obtido de leite pasteurizado; PR: queijo obtido de leite pasteurizado e cultura adjunta.

Observa-se nos gráficos de escores (Figura 11 a, c, e, g) que em todos os casos é possível verificar clara separação do perfil de peptídeos durante a maturação. Para ambos os tratamentos em que se utilizou leite cru, independentemente do tipo de cultura (Figura 11 a, c), foi possível observar evidente separação entre o perfil de peptídeos dos queijos em três grupos distintos. Um primeiro grupo contendo os queijos com um dia de maturação. Um segundo grupo contendo os queijos após 10, 20 e 30 dias de maturação e, por fim, um terceiro grupo de peptídeos referentes aos queijos com 50 dias de maturação. Para os queijos obtidos a partir de leite pasteurizado sem adição de cultura adjunta (Figura 11 e) foi possível evidenciar a separação do perfil de peptídeos do primeiro dia de maturação dos perfis dos demais dias, sendo que todos os perfis de peptídeos, com exceção do perfil do primeiro dia de maturação, possuem áreas de intersecção. Os queijos obtidos a partir de leite pasteurizado com adição de cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* (Figura 11 f) apresentaram dois grupos distintos de peptídeos. O primeiro grupo contendo o perfil de peptídeos do primeiro dia de maturação e o segundo grupo contendo os demais perfis de peptídeos. Esses resultados sugerem que os queijos fabricados com leite cru, que possuem maior diversidade de proteases, apresentam diferenciação do perfil de peptídeos melhor definida ao longo da maturação, quando comparado aos queijos obtidos a partir de leite pasteurizado.

Observa-se que as variáveis de maior peso para discriminação dos queijos ao longo da maturação (Figura 11 b, d, f, h) foram iguais para os queijos obtidos a partir de leite cru, adicionado ou não de cultura adjunta de *Lb. rhamnosus*, diferindo-se apenas por um peptídeo de peso positivo máximo na componente 1. Nos queijos produzidos com leite pasteurizado, adicionado ou não de cultura adjunta, os peptídeos de maior peso diferiram em ambas as componentes. Esses resultados sugerem que a adição da cultura adjunta é mais importante para a modificação do perfil de peptídeos em um meio de microbiota mais controlada. Os peptídeos de maior peso para o queijo tipo Camembert (leite cru) foram os β -CN f193-209 (m/z 1881) e α_{s1} -CN f1-14 (m/z 1665) para a componente 1, ambos com potencial bioativo, e α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877) e β -CN f193-208 (m/z 1782) para a componente 2 (Figura 11 b). Para os queijos tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) os peptídeos de maior peso foram também os peptídeos β -CN f193-209 (m/z 1881) e α_{s1} -CN f1-14 (m/z 1665) para a componente 1 e α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877) e β -CN f193-207 (m/z 1669) (Figura 11 d), este último com potencial bioativo (NONGONIERMA, 2016). Para o queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) os peptídeos de maior peso foram um peptídeo não identificado (m/z 1804) e β -CN f193-209 (m/z 1881) para a componente 1 e os peptídeos α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877) e β -CN f94-209 (m/z 1718) para a componente 2, este último com potencial bioativo (STEPANIAK et al., 2001). Para os queijos

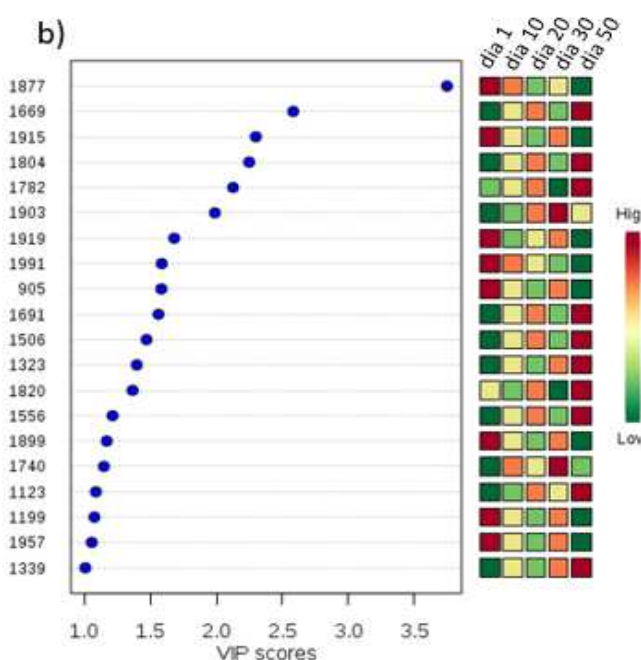
tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) os peptídeos de maior peso foram os peptídeos β -CN f126–142 (m/z 1903) e β -CN f152–163 (m/z 1312) para a componente 1, e α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877) e β -CN f126–142 (m/z 1903) para a componente 2.

As frações peptídicas mais importantes para a separação dos diferentes tratamentos foram selecionadas de acordo com o critério de seleção dos valores de VIP escore (VIP>1) e são apresentadas na Figura 12.



m/z	Peptídeo	Escore VIP
1782	β -CN (f193-208)	3,02
1877	α_{s1} -CN f(1-16)	3,01
*1669	β -CN f(193-207)	2,43
1919	não identificado	2,05
1804	não identificado	2,07
*1556	β -CN f(193-206)	1,59
1691	κ -CN f(41-54)	1,44
1903	β -CN f(126-142)	1,31
1619	α_{s1} -CN f(131-144)	1,26
1820	α_{s1} -CN f(180-196)	1,26
1899	α_{s1} -CN f(183-199)	1,21
905	α_{s1} -CN f(17-23)	1,14
1506	β -CN f(194-207)	1,11
1991	α_{s1} -CN f(1-17)	1,00

*peptídeos com potencial bioativo



m/z	Peptídeo	Escore VIP
1877	α_{s1} -CN f(1-16)	3,74
*1669	β -CN f(193-207)	2,58
1915	α_{s1} -CN f(180-196)	2,29
1804	não identificado	2,24
1782	β -CN f(193-208)	2,12
1903	β -CN f(126-142)	1,98
1919	não identificado	1,68
1991	α_{s1} -CN f(1-17)	1,58
905	α_{s1} -CN f(17-23)	1,58
1691	κ -CN f(41-54)	1,56
1506	β -CN f(194-207)	1,47
1323	α_{s2} -CN f(115-126)	1,39
1820	α_{s1} -CN f(180-196)	1,36
*1556	β -CN f(193-206)	1,21
1899	α_{s1} -CN f(183-199)	1,17
*1740	β -CN f(57-72)	1,14
1123	α_{s2} -CN f(176-184)	1,08
1199	α_{s1} -CN f(23-32)	1,07
1957	α_{s1} -CN f(136-151)	1,05
1339	α_{s1} -CN f(147-156)	1,00

*peptídeos com potencial bioativo

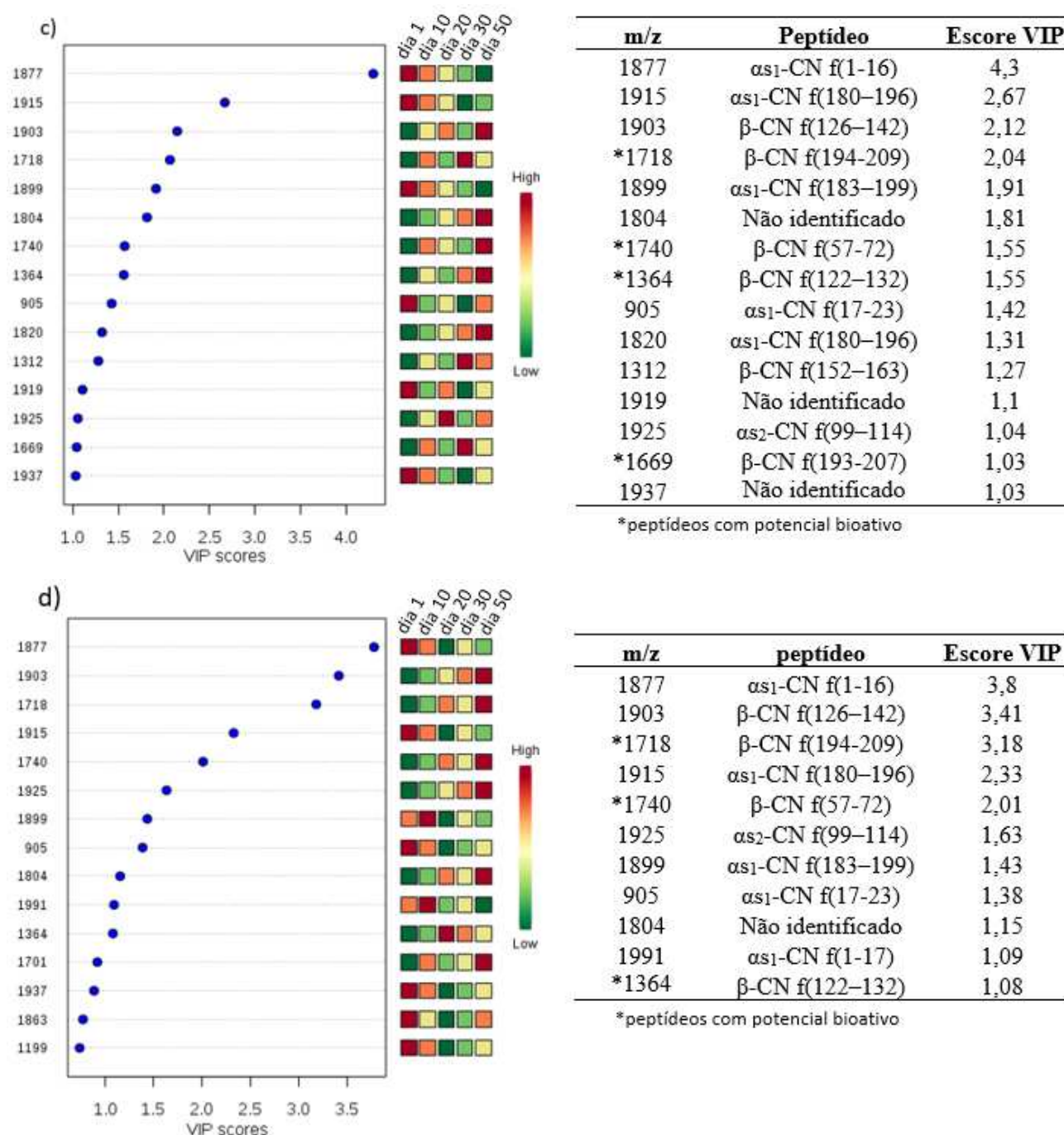


Figura 12 – Peptídeos importantes para a discriminação dos queijos identificados por PLS-DA para o queijo tipo Camembert (leite cru) (a), queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*) (b), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) (c), queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (d). As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos correspondentes metabólitos em cada grupo em estudo. VIP score > 1 é considerado estatisticamente significativo.

Observa-se na Figura 12 que um grande número de peptídeos foram importantes para a discriminação dos queijos identificados por PLS-DA, o que mais uma vez caracteriza a

complexidade da da proteólise do queijo tipo Camembert. Para se ter uma ideia dessa complexidade, a avaliação do perfil de peptídeos de dez amostras de queijo Prato comerciais, sem qualquer controle das condições de processamento e maturação, resultou em apenas nove peptídeos significativos para a discriminação dos queijos (BAPTISTA et al. 2017).

A despeito da complexidade de peptídeos, observa-se na Figura 12 o seguinte comportamento: cinco peptídeos foram importantes para todos os queijos [α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877), β -CN f126–142 (m/z 1903), α_{s1} -CN f180–196 (m/z 1820), α_{s1} -CN f183–199 (m/z 1899) e o peptídeo (m/z 1803) não identificado]; apenas um peptídeo bioativo está presente somente nos queijos fabricados com leite cru [β -CN f193-206 (m/z 1556)], enquanto dois peptídeos são significativos exclusivamente para os queijos fabricados com leite pasteurizado [β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f122–132 (1364)] e nenhum peptídeo significativo foi exclusivo para os queijos adicionados de cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* GG.

Observa-se na Figura 12 que o peptídeo α_{s1} -CN f1-16 (m/z 1877) teve grande importância na diferenciação dos queijos e que sua concentração diminuiu com o avanço da maturação. Este peptídeo é obtido, possivelmente, pela hidrólise da fração α_{s1} -CN f1-23 (m/z 2764) por ação de enzimas produzidas pela cultura acidificante. O peptídeo potencialmente bioativo β -CN f194-209 (m/z 1718), apesar de ter importância apenas para a diferenciação dos queijos em que se utilizou leite pasteurizado, apareceu com grande intensidade em todos os tratamentos. Já os peptídeos potencialmente bioativos β -CN f193-206 (m/z 1556) e β -CN f193-207 (m/z 1669), importantes para a separação dos queijos obtidos de leite cru, aumentaram de intensidade ao longo do tempo e apresentaram maior intensidade, de forma geral, quando comparado com os queijos obtidos de leite pasteurizado, verificado tanto pelos seus valores brutos (Tabela 3, 4, 5 e 6) como pelo seus altos escores VIP (Figura 12). Tal fato pode decorrer da importância de culturas contaminantes naturais do leite cru em hidrolisar peptídeos diversos de forma menos específica e, portanto, mais eficiente, uma vez que proteases de alta especificidade (e.g. quimosina e renina) clivam apenas grandes frações proteicas e tem ação restrita após essa proteólise inicial (FOX, 2004).

Os peptídeos bioativos importantes para a diferenciação dos queijos foram todos derivados da β -CN: peptídeos β -CN f122–132 (m/z 1364); β -CN f193-206 (m/z 1556); β -CN f193-207 (m/z 1669); β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f57-72 (m/z 1740). Conforme demonstrado por eletrofórese capilar, a β -CN foi a fração caseica apresentou maior hidrólise quando comparada às frações α_{s1} -caseína e para- κ -caseína. No entanto, esses peptídeos não foram significativos para todos os tratamentos, como se pode observar na Figura 13, que

apresenta a intensidade relativa dos peptídeos bioativos, significativos ou não, para os queijos tipo Camembert avaliados durante 50 dias de maturação.

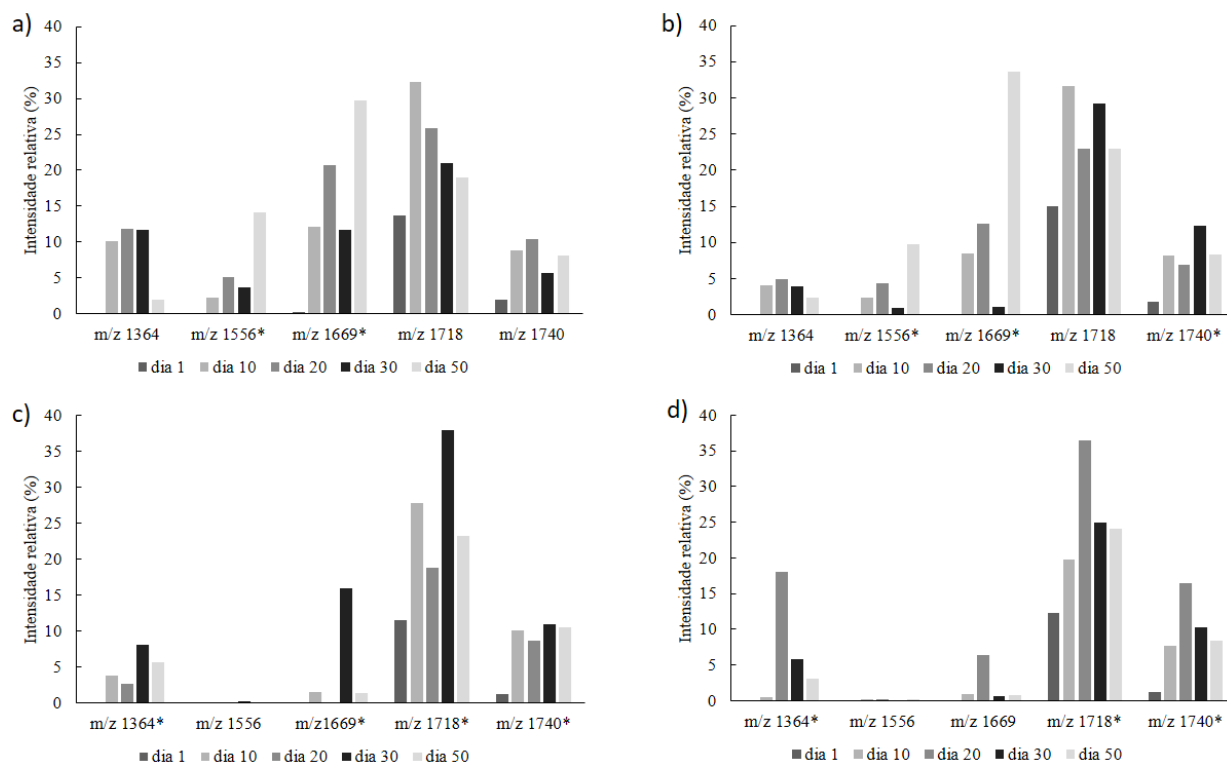


Figura 13 – Intensidades relativas (%) dos peptídeos β -CN f122–132 (m/z 1364); β -CN f193-206 (m/z 1556); β -CN f193-207 (m/z 1669); β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f57-72 (m/z 1740) ao longo dos 50 dias de maturação. (a) queijo tipo Camembert (leite cru); (b) queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (c) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (d) queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) (*) peptídeo com $VIP > 1$.

Diversos outros peptídeos bioativos não significativos para a diferenciação dos queijos foram identificados (Tabela 3, 4, 5, 6). No entanto, embora não significativos para a diferenciação dos queijos, não se pode afirmar se teriam ou não um potencial bioativo em estudos conduzidos *in vivo* com modelo animal ou humano.

Outra forma de analisar o perfil de peptídeos buscando diferenciar o efeito entre tratamentos foi através da análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) durante o período de maturação. A análise entre os diferentes queijos tipo Camembert foi baseada nas duas primeiras PCs, que juntas explicaram mais de 50% dos dados, com exceção dos tempos onde não houve separação, explicadas por uma variância total de dados conforme apresentado na (Figura 14).

Observa-se nos gráficos de escore da Figura 14 (a, c, e, g, i) que não houve separação dos grupos de peptídeos analisados no primeiro dia de maturação. No entanto, após 10 dias observa-se uma tendência à separação entre os queijos tipo Camembert obtidos a partir de leite cru e leite pasteurizado, independentemente do tipo de cultura.

Vale destacar ainda um aumento gradativo da porcentagem de explicação das componentes e separação destes dois grupos até o último dia de maturação analisado, passando de 41,1 % para 65,2%. A falta de separação dos grupos no primeiro dia de maturação indica que os queijos possuíam perfis de peptídicos muito semelhantes imediatamente após a fabricação. No entanto, com o avanço da maturação, observou-se clara diferenciação do perfil peptídico, o qual foi separado em dois grandes grupos: queijos obtidos a partir de leite cru e obtidos a partir de leite pasteurizado. Os gráficos de *VIP scores*, representados na Figura 15 apresentam os peptídeos mais importantes para a discriminação dos queijos obtidos a partir de leite cru ou pasteurizado, após 10, 20, 30 e 50 dias de maturação.

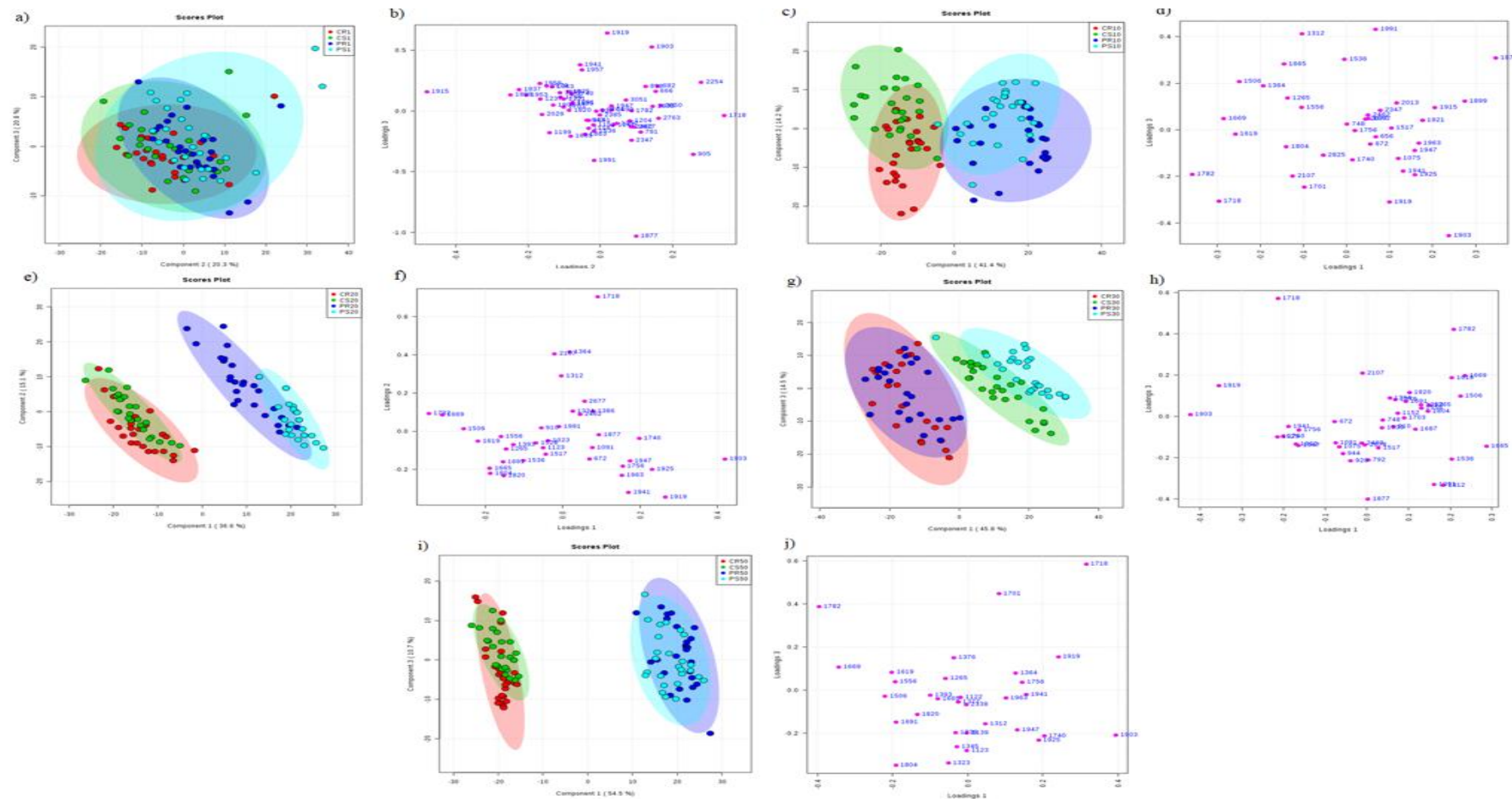
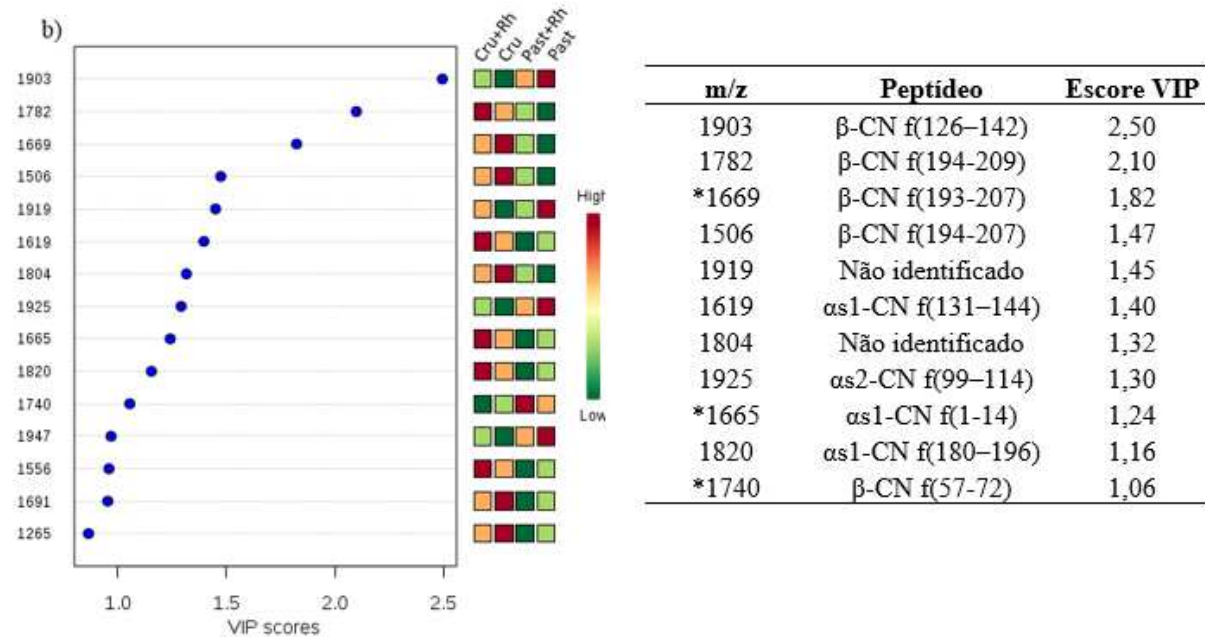
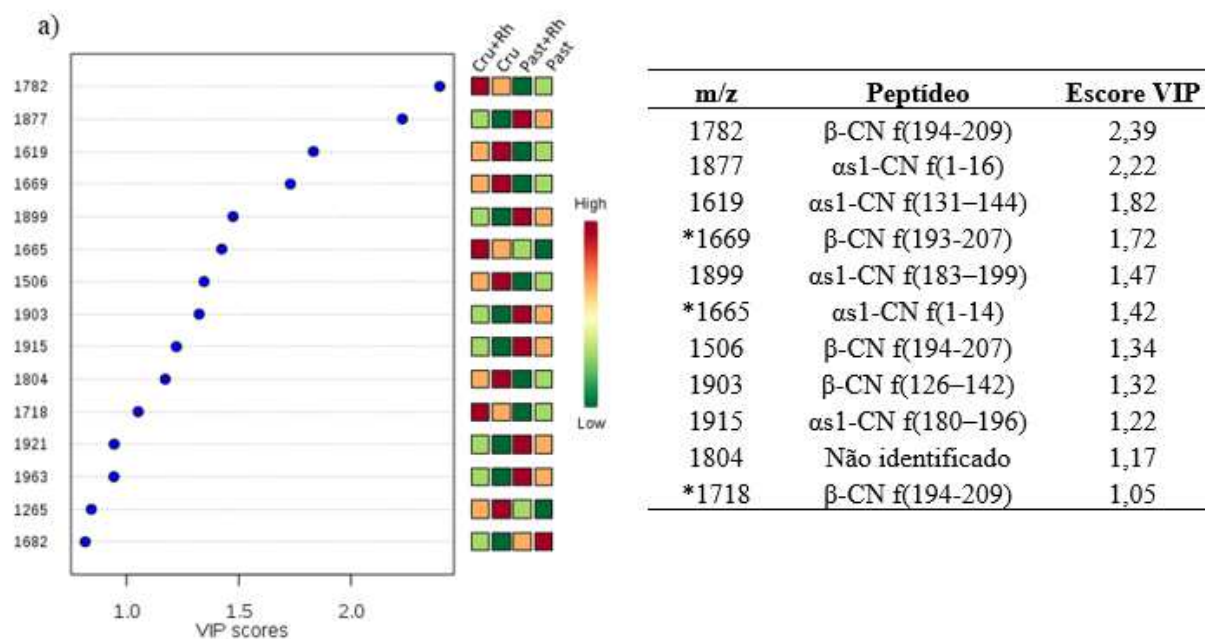


Figura 14- Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Gráficos de escores dos queijos tipo Camembert ao 1º dia de maturação (a), ao 10º dia de maturação (c), ao 20º dia de maturação(e), ao 30º dia de maturação(g) e ao 50º dia de maturação (j); gráficos de pesos dos queijos tipo Camembert ao 1º dia de maturação(b), ao 10º dia de maturação(d), ao 20º dia de maturação(f), ao 30º dia de maturação(h) e ao 50º dia de maturação. (•) CS-Queijo tipo Camembert (leite cru) (•) CR-Queijo tipo Camembert (leite cru e *Lb. rhamnosus*); (•) PS-Queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); (•) PR -Queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*).



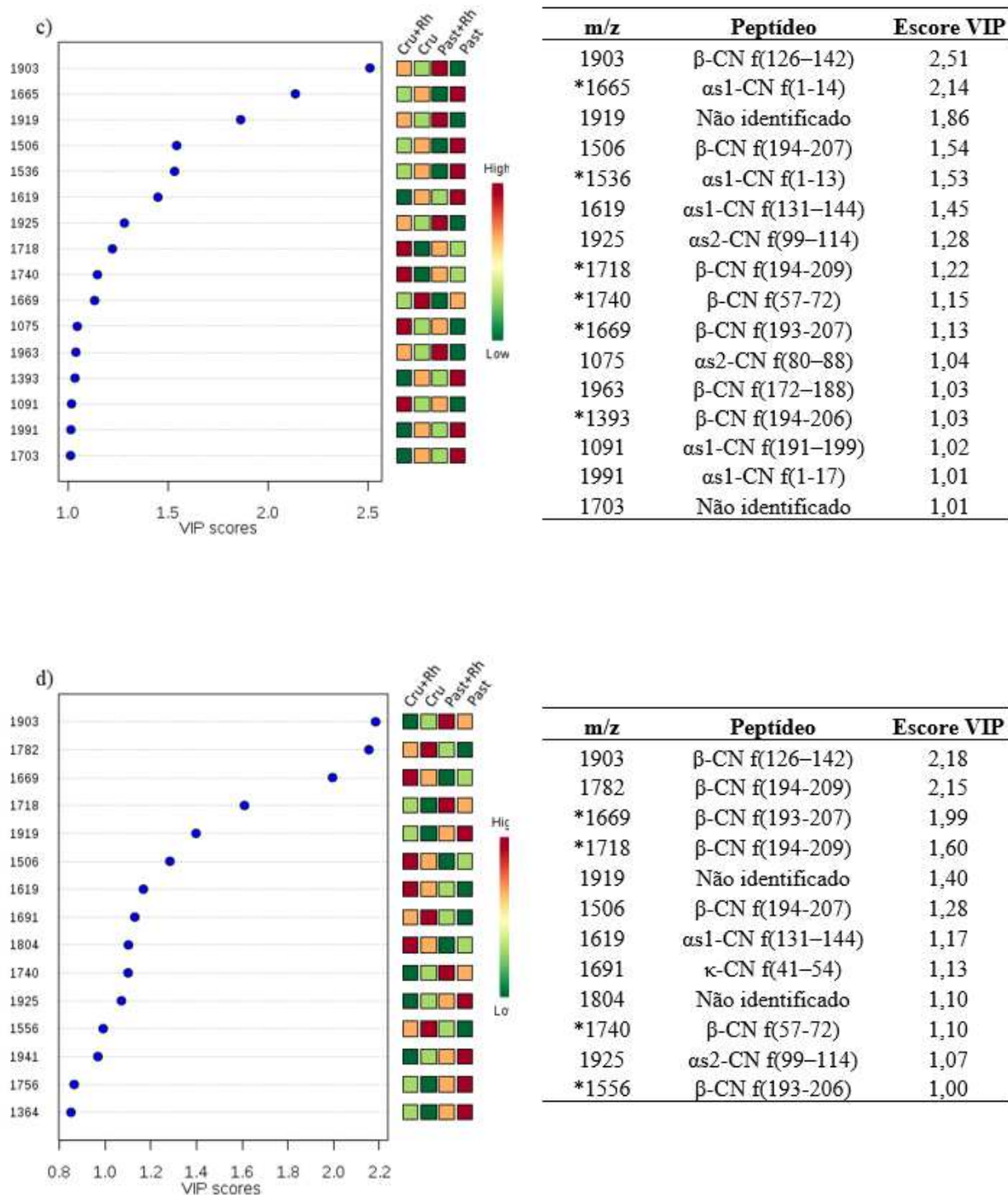


Figura 15 – Peptídeos importantes para discriminação dos queijos identificados por PLS-DA para os queijos tipo Camembert no 10º (a), 20º (b), 30º (c) e 50º dia de maturação (d). As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos correspondentes metabólitos em cada grupo em estudo. VIP score > 1 é considerado estatisticamente significativo. (*) Peptídeos potencialmente bioativos identificados na literatura; queijo obtidos de leite cru sem cultura adjunta (Cru), obtido de leite cru e cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG (Cru+Rh), obtido de leite pasteurizado sem cultura adjunta (Past), e obtido de leite pasteurizado e cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG (Past+Rh).

Observa-se que houve separação expressiva dos queijos através dos seguintes peptídeos potencialmente bioativos: β -CN f194-206 (m/z 1393), α_{s1} -CN f1-13 (m/z 1536), β -CN f193-206 (m/z 1556), α_{s1} -CN f1-14 (m/z 1665), β -CN f193-207 (m/z 1669), β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f57-72 (m/z 1740). Nota-se que após 10, 20 e 50 dias de maturação, tais peptídeos foram separados de forma mais relevante, definida e afastada entre os tratamentos, com separação evidente do perfil de peptídeos através de suas intensidades relativas nos queijos obtidos de leite cru e pasteurizado.

Dos seis peptídeos potencialmente bioativos identificados após 30 dias de maturação, quatro apresentaram intensidade relativa maior para os queijos não adicionados de cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* GG. Os outros dois apresentaram intensidade relativa maior nos queijos com cultura adjunta, como pode se observar pela distinção de cores de intensidade dos peptídeos. Esses resultados sugerem que o grande potencial proteolítico da cepa utilizada neste trabalho, descrito por Savijoki et al. (2006), possui tanto capacidade de hidrolisar sequências internas de pequenas frações caseicas, originando peptídeos potencialmente bioativos de maneira mais efetiva e inespecífica, como também a capacidade de hidrolisar peptídeos potencialmente bioativos anteriormente formados.

Peptídeos potencialmente bioativos discriminantes para a separação no 30º dia de maturação foram separados também entre os queijos adicionados ou não de cultura de *Lb. rhamnosus* GG, o que sugere a necessidade de análise quimiométrica isolada deste fator. Na Figura 16 podemos corroborar através do PLS-DA isolado dos tratamentos com e sem adição da cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* GG aos 20 e 30 dias de maturação, que realmente há diferenciação do perfil de peptídeos decorrentes da adição desta cepa. Confirmando que, apesar de tênue, frente à comparação da influência do tratamento térmico e da mudança ao longo da maturação, a alteração e diferenciação do perfil de peptídeos pela cultura adjunta é também significativa em algum momento.

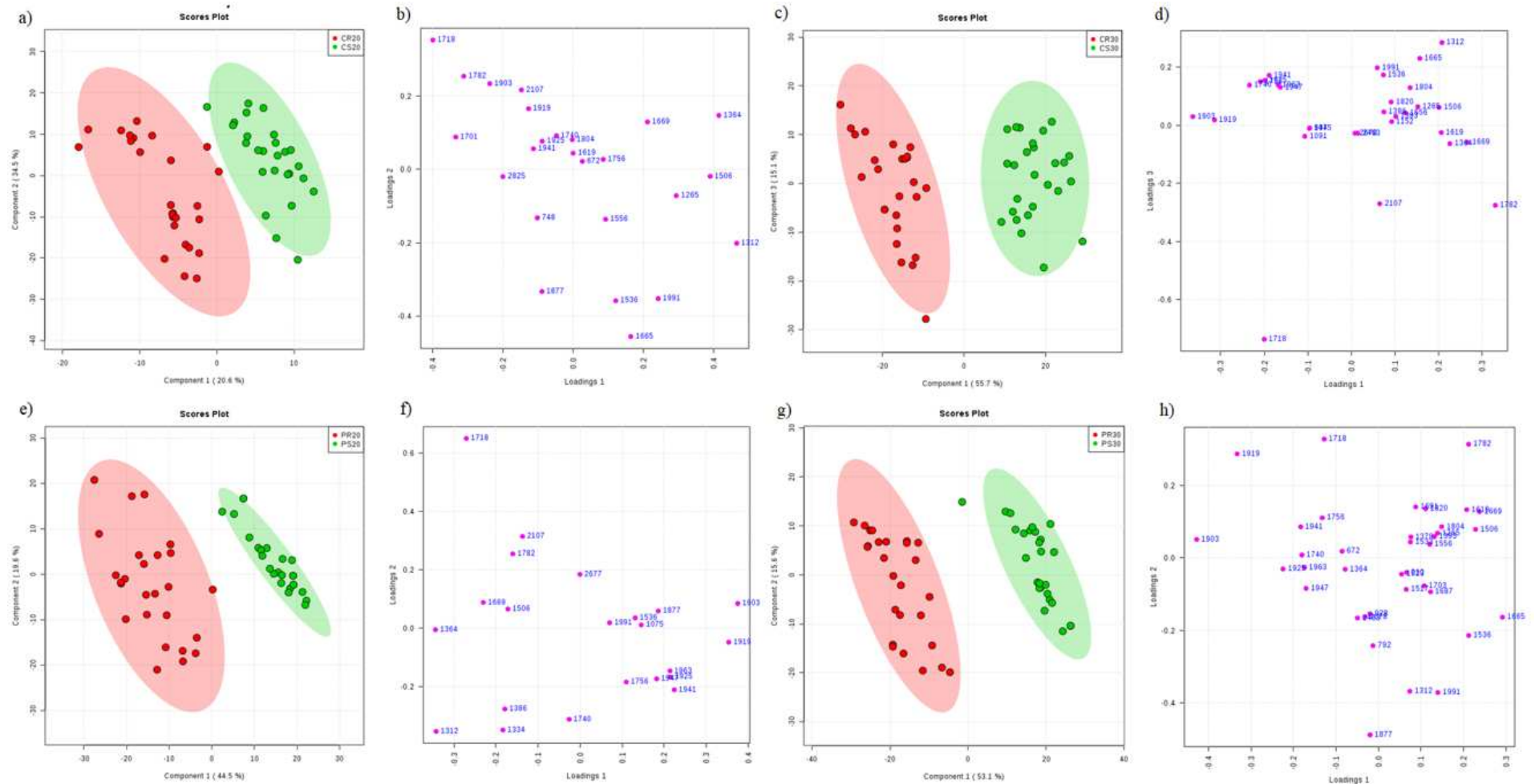


Figura 16 – Peptídeos importantes identificados por PLS-DA para os queijos tipo Camembert obtidos de leite cru com e sem cultura adjunta aos 20 dias de maturação (a), queijos tipo Camembert obtidos de leite cru com e sem cultura adjunta aos 30 dias de maturação (c), queijos tipo Camembert obtidos de leite pasteurizado com e sem cultura adjunta aos 20 dias de maturação (e) e queijos tipo Camembert obtidos de leite pasteurizado com e sem cultura adjunta aos 30 dias de maturação (g). (•) queijo com cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* GG; (•) queijo sem cultura adjunta.

4.6. Análise sensorial

4.6.1 Perfil Flash

Os provadores utilizaram diferentes termos para a caracterização dos queijos segundo aparência, textura, aroma e sabor. O número de atributos variou entre 5 e 9, com uma média de 7 atributos para cada participante e um total de 51 termos de diferenciação (Figura 17).

Os dados obtidos geraram um total de 2 dimensões, das quais as duas explicavam 100% do total de dados (Tabela 8).

Tabela 8 - Explicação (%) da solução multidimensional para o Perfil *Flash*

	PC1	PC2
Autovalor	3,503	0,750
Variabilidade (%)	82,367	17,633
% acumulada	82,367	100,000

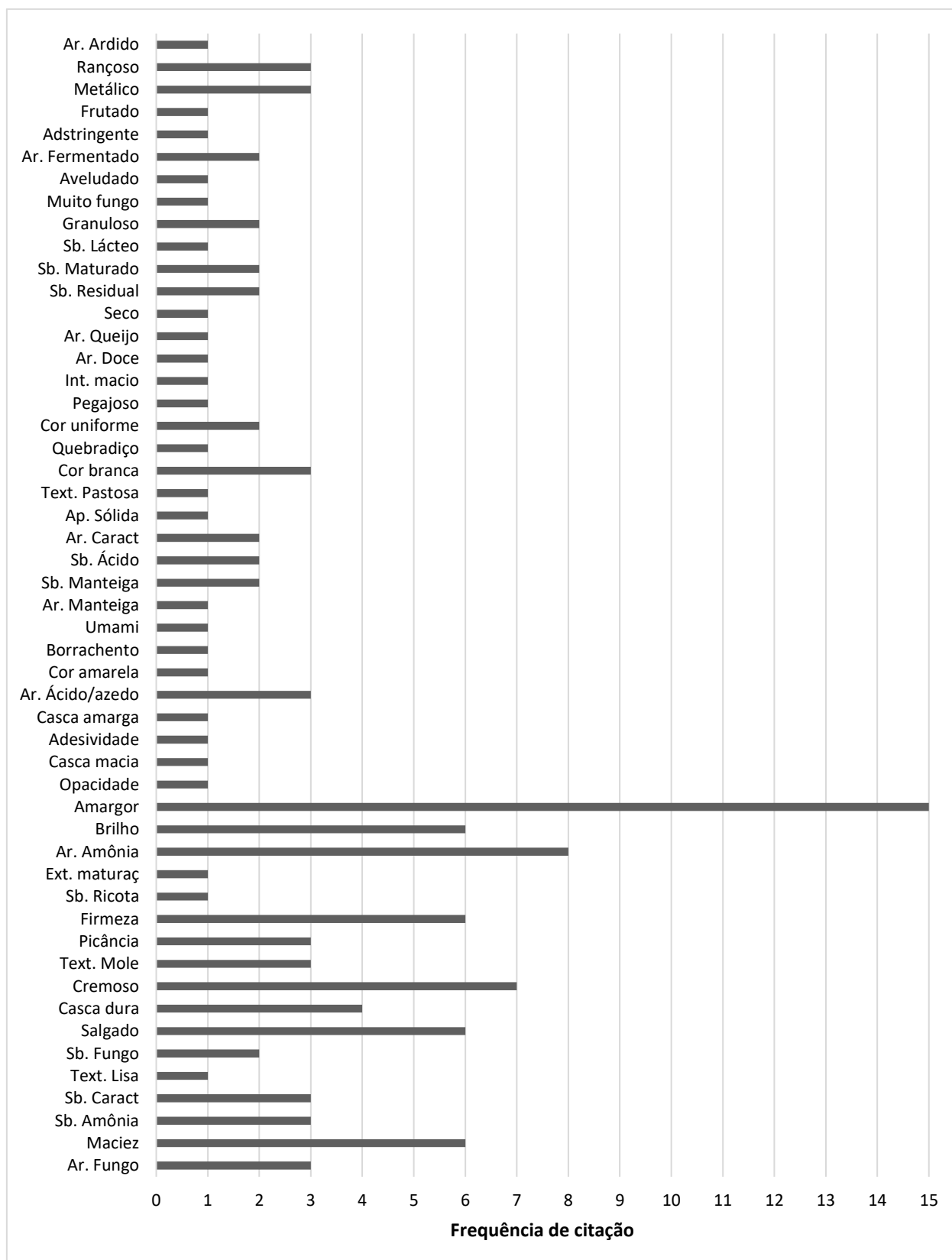


Figura 17 - Frequência de citação de cada atributo entre os 15 provadores.

A Figura 18 representa a diferenciação dos diferentes tratamentos no espaço bidimensional. Observa-se uma clara separação entre as amostras, tendo em vista a diferenciação consistente entre elas. O consenso entre a equipe é confirmado pela baixa variância residual dos julgadores na solução bidimensional (Figura 19), variando de 14% a 27%. O bom consenso entre os avaliadores demonstrado no teste pode ser devido a facilidade de ordenação para o produto em questão. Resultados parecidos foram apresentados na descrição de bebidas comerciais de soja por Perfil Flash, na qual houve um intervalo de variância residual de 27 a 60% por provador para uma solução tridimensional (TERHAAG & BENASSI, 2011).

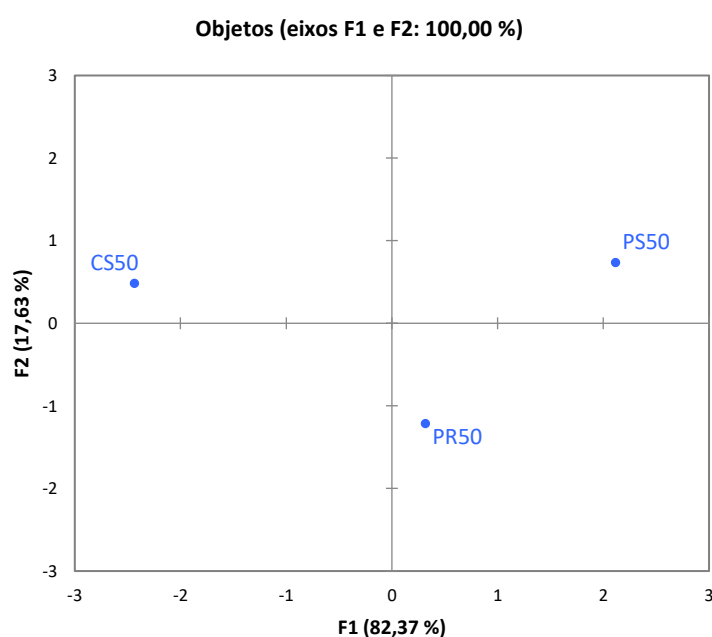


Figura 18 - Configuração do consenso das amostras dimensões D1 e D2. CS= queijo tipo Camembert (leite cru); PS= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado); PR= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*).

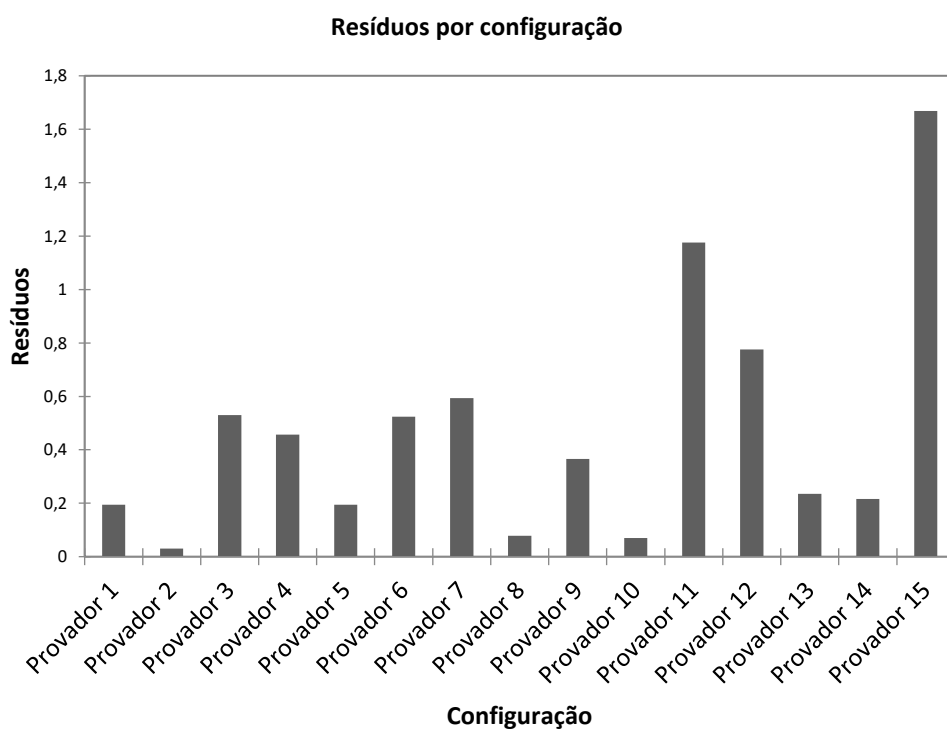


Figura 19 - Distribuição da variância residual dos provadores na solução bidimensional.

Na Tabela 9 estão listados os atributos levantados pelos provadores, os quais se aproximaram da linguagem do consumidor, e suas respectivas correlações com as dimensões 1 e 2. Como critério de escolha dos termos mais relevantes para descrição da amostra, optou-se por utilizar atributos coincidentes entre vários provadores e com correlação, em módulo, para cada provador superior ou igual a 0,5 (TERHAAG & BENASSI, 2011). Os termos mais citados foram gosto doce (correlação negativa em D1), gosto ácido/azedo (correlação positiva em D1), textura arenosa (correlação negativa em D1 e correlação positiva em D2) e aroma característico (correlação negativa em D1 e correlação positiva em D2).

Tabela 9 - Atributos melhor correlacionados ($|r|$) com as duas primeiras dimensões (D1, D2) para cada um dos 15 provadores no Perfil *Flash*.

Provador	D1	D2
1	Aroma. Fungo (-0,60); Maciez (0,60); Sb. Caract (0,99); Text. Lisa (0,99); Sabor de fungo (-0,99); Salgado (-0,99); Casca dura (-0,99)	Aroma de Fungo (0,80); Maciez (-0,80); Sb. Amôniacal (-0,92)
2	Cremoso (-0,99); Sb. Amôniacal (0,99); Text. Mole (-0,99); Sb. Caract. (0,60); Picância (0,60); Firmeza (-0,99); Sb. Ricota (-0,99); Sb. Fungo (-0,99)	Sabor. Característico. (-0,79); Picância (-0,79)
3	Extensão de maturação (0,99); Ar. Amônia (-0,92); Brilho (0,92); Amargor (-0,99); Maciez (0,99); Picância (0,92); Sb. Amônia (0,92)	Picância (0,92); Sabor. Amônia (0,92)
4	Brilho (0,99); Opacidade (-0,99); Amargor (0,99); Adesividade (-0,99); Salgado (-0,99); Firmeza (-0,99)	Casca macia (-0,92); Casca amarga (-0,92)
5	Maciez (-0,99); Salgado (-0,99); Amargor (0,60); Ar. Ácido (0,99); Cor amarela (-0,99); Borrachento (-0,99); Umami (-0,60)	Amargor (-0,79); Casca dura (0,92); Umami (0,79)
6	Brilho (0,99); Text. Mole (-0,99); Ar. Manteiga (0,99); Sb. Manteiga (0,99); Amargor (-0,79); Sb. Ácido (-0,99); Ar. Ácido (-0,99)	Maciez (-0,92); Amargor (-0,60)
7	Text. Mole (-0,92); Brilho (0,99); Amargor (-0,99); Cremoso (-0,99)	Gosto Amargo (0,92); Aroma Caract. (0,92)
8	Ap. Sólida (-0,99); Brilho (0,99); Text. Pastosa (0,99); Amargor (-0,92); Salgado (0,60); Cor branca (-0,99)	Salgado (-0,79)
9	Cremoso (-0,79); Maciez (0,60); Amargor (0,92); Quebradiço (-0,99); Sb. Amoniacal (-0,92)	Cremoso (-0,60); Maciez (-0,79);
10	Cor uniforme (-0,99); Firmeza (-0,99); Amargor (-0,60); Pegajoso (0,99); Cor branca (-0,99); Ar. Ácido (0,79)	Amargor (0,79); Aroma Ácido (0,60)
11	Cremoso (-0,79); Amargor (-0,99); Interior macio (0,99); Ar. Doce (0,93); Ar. Queijo (-0,99); Sb. Caract (0,99); Casca dura (0,99)	Cremoso (-0,60)
12	Salgado (0,60); Amargor (0,60); Seco (-0,99); Cremoso (-0,92); Brilho (0,99)	Salgado (-0,79); Amargor (-0,79)
13	Firmeza (-0,99); Cremoso (-0,92); Sb. Ácido (-0,99); Amargor (-0,60); Salgado (-0,99)	Sabor Residual (-0,92); Amargor (-0,79)
14	Maturado (-0,99); Sb. Lácteo (0,99); Firmeza (0,99); Ar. Caract. (-0,92); Maciez (-0,99); Uniforme (-0,99)	Amargor (-0,92)
15	Cor branca (0,92); Cremoso (-0,92); Ar. Amônia (-0,92); Amargor (-0,92); Picância (-0,92); Sb. Residual (-0,92)	Sabor Maturado (0,92); Sabor Manteiga (0,92); Casca dura (0,99)

Observa-se na Figura 20 o agrupamento dos dados coletados na análise sensorial de Perfil *Flash*. Como relatado anteriormente, observa-se pouca dispersão dos resultados e boa repetibilidade dos provadores e uma clara diferenciação entre as 3 amostras.

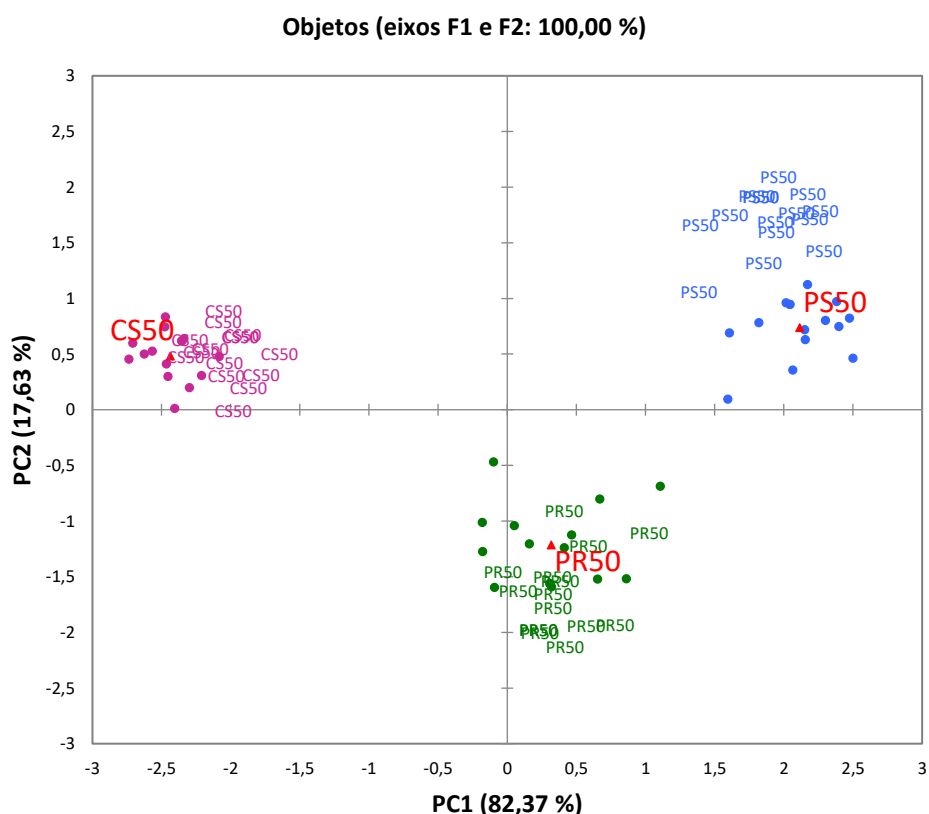


Figura 20 - Agrupamento e dispersão dos dados obtidos através da técnica de perfil Flash para os 3 queijos analisados (●) CS= queijo tipo Camembert (leite cru); (●) PS= queijo tipo Camembert (leite pasteurizado) ; (●) PR= queijo tipo Camembert (pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) ; (▲) consenso de cada grupo de amostras.

4.6.2 CATA (Check-all-that-apply)

Diferenças significativas nas frequências dos termos descritos pelos provadores foram encontradas para 21 termos dos 50 avaliados na análise, sugerindo que o método CATA foi capaz de detectar diferenças nas percepções dos participantes, como demonstrado na Tabela 10. O queijo tipo Camembert ideal foi descrito como apresentando sabor e aroma característicos, cremosidade, aroma amoniacal e sabor amargo, cor branca, brilhante e textura lisa e uniforme em concordância com as características do queijo descritas por McSweeney (2004) e Engel et al. (2001).

Tabela 10 – Frequência dos provadores que selecionaram cada um dos termos na análise CATA. (continua)

Atributos	IDEAL	Queijo tipo		
		Camembert (leite cru)	Camembert (leite pasteurizado)	Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>)
1-Cor Amarela*	28	27	23	37
1-Cor Branco	60	56	58	53
1-Brilhante*	44	54	11	44
1-Casca Mole	8	13	6	7
1-Centro Firme*	9	11	50	25
1-Mole/cremoso*	51	63	34	48
1-Firme/sólida*	11	3	23	14
1Granulosa	3	3	9	8
1-Lisa/Uniforme*	35	41	27	32
1-Maturado*	32	23	21	36
1-Muito fungo	10	12	9	9
1-Não Maturado	1	1	2	0
1-Olhaduras	0	8	6	5
1-Opaco*	13	5	20	18
1-Pouco Fungo	8	4	10	7
1-Característica	26	17	14	22
2-Lisa/Uniforme	44	39	33	36
2-Arenoso	2	3	10	9
2-Borrachento*	9	10	21	9
2-Firme*	10	7	39	22
2-Mole/cremoso*	60	72	35	52
2-Dura/rígida	1	2	6	4
2-Muito firme	1	1	5	4
2-Casca dura	31	30	33	36
2-Casca crocante	9	18	23	16
2-Pegajoso	0	1	0	0
2-Characterística	23	17	10	15
3-Amoniacal*	40	20	17	40
3-Azedo/ácido	7	22	24	17
3-Queijo	46	40	38	40
3-Amanteigado	28	29	26	24
3-Maturado	27	16	23	24
3-Ardido	3	5	8	9
3-Sem aroma	0	2	2	0
3-Characterístico	35	23	21	29
4-Amoniacal*	58	10	12	56
4-Amanteigado	37	42	36	29

(continuação)

Atributos	IDEAL	Queijo tipo		
		Camembert (leite cru)	Camembert (leite pasteurizado)	Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>)
4-Amargo*	55	40	36	64
4-Am. residual	24	43	41	34
4-Azedo/ácido*	6	17	28	4
4-Complexo	19	17	17	18
4-Salgado	46	46	38	34
4-Doce*	8	7	1	11
4-Frutado*	8	1	3	9
4-Lácteo/leite	44	33	36	40
4-Metálico	4	11	7	10
4-Rançoso	5	8	4	7
4-Ricota	3	0	1	2
4-Terroso*	27	16	16	30
4-Picante*	20	9	7	25
4-Fungo	12	15	16	12
4-Umami*	2	8	0	3
4-Sem sabor	0	0	1	0
4-Característico*	29	21	14	29

* Diferença significativa a $p < 0,05$) de acordo com o Teste Q de Cochran

1: atributo relacionado à aparência; 2: atributo relacionado à textura; 3: atributo relacionado à aroma; 4: atributo relacionado à sabor.

As primeiras duas dimensões explicam 90,59% da variância total dos dados. A terceira dimensão fornece apenas 9,41% de explicação dos dados, e não apresentaram informações relevantes na caracterização das amostras. Os queijos obtiveram boa separação de atributos, tendo o queijo tipo Camembert (leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus*) se aproximado da amostra ideal (Figura 21), sendo correlacionada com atributos como sabor e aroma amoniacal e característico, sabor picante, terroso e amargo. O queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado sem cultura adjunta foi o que mais se distanciou do produto ideal, sendo relacionado com atributos como de textura borrachenta, firme e aparência opaca. Em contrapartida, o queijo tipo Camembert (leite cru) posicionou-se na área com maior número de descritores, sugerindo que apesar do distanciamento da amostra ideal, este queijo possui características sensoriais complexas e bastante divergentes em relação às outras amostras.

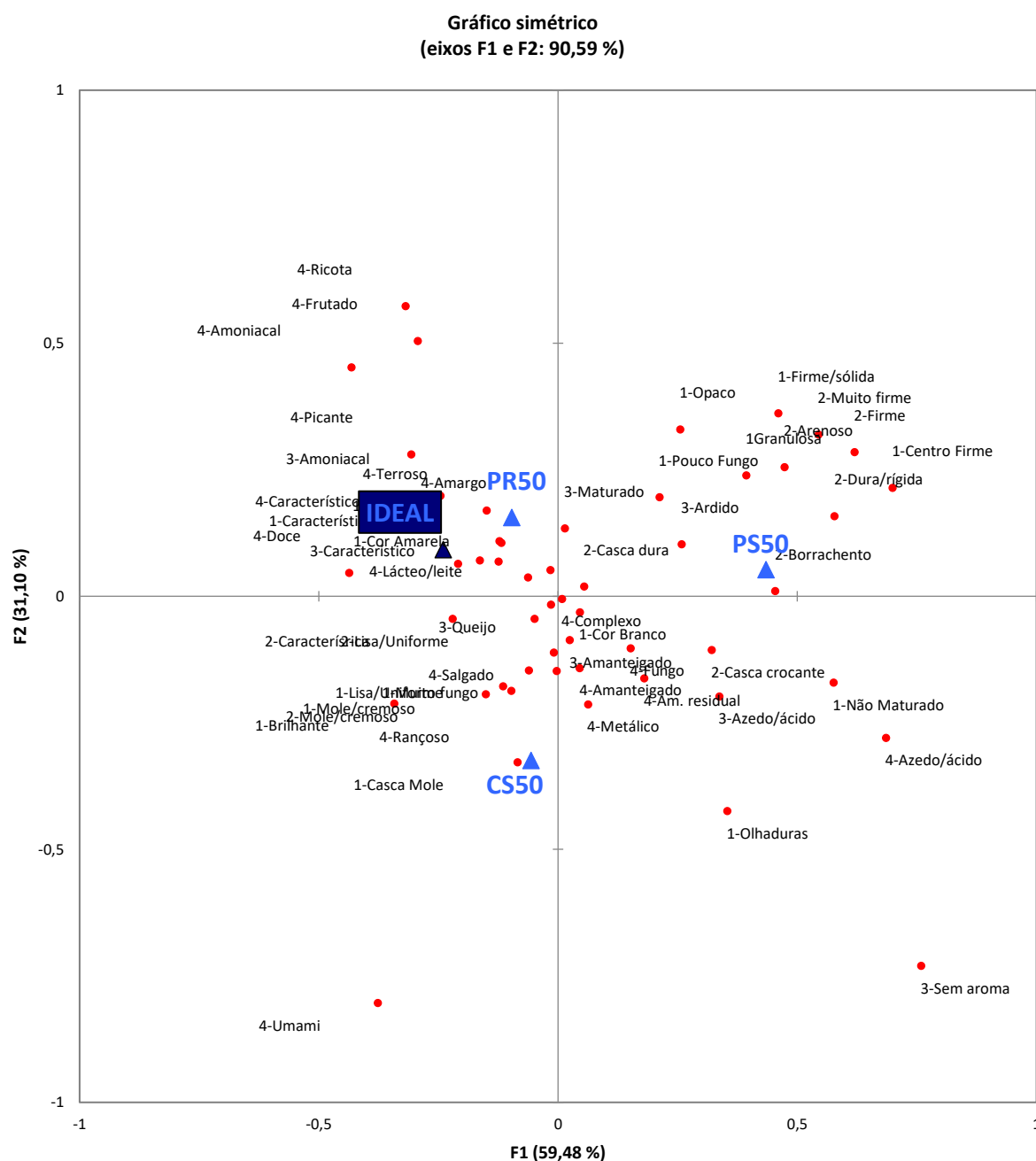


Figura 21 - Representação das amostras de queijo tipo Camembert, do produto ideal e dos termos na solução bidimensional na análise CATA. Legenda: CS= queijo tipo Camembert obtido de leite cru; PS= queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado; PR= queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado e *Lb. rhamnosus* GG. (▲) Amostras; (●) Atributos descritivos.

A análise CATA possibilitou ainda elencar os atributos essenciais ou interessantes para o queijo tipo Camembert, bem como os atributos que não influenciam ou afetam negativamente a avaliação sensorial do produto. Os atributos de aparência “brilhante” e de sabor “amoniactal” foram classificados como atributos necessários para este tipo de queijo.

Os atributos de textura “mole” e sabor “amargo” foram classificados como interessantes. Atributos como textura “lisa/uniforme” e sabor “salgado” não influenciaram avaliação sensorial do produto. Adicionalmente, o atributo de aroma “azedo/ácido” foi classificado como negativo para o queijo Camembert.

Por fim, a análise de aceitação global aplicada juntamente ao CATA revelou quais atributos tiveram maior correlação com a aceitação do produto (Figura 22), além de demonstrar a relação destes atributos com o produto ideal descrito pelos provadores e o valor médio na escala hedônica de nove pontos para os tratamentos (Tabela 11).

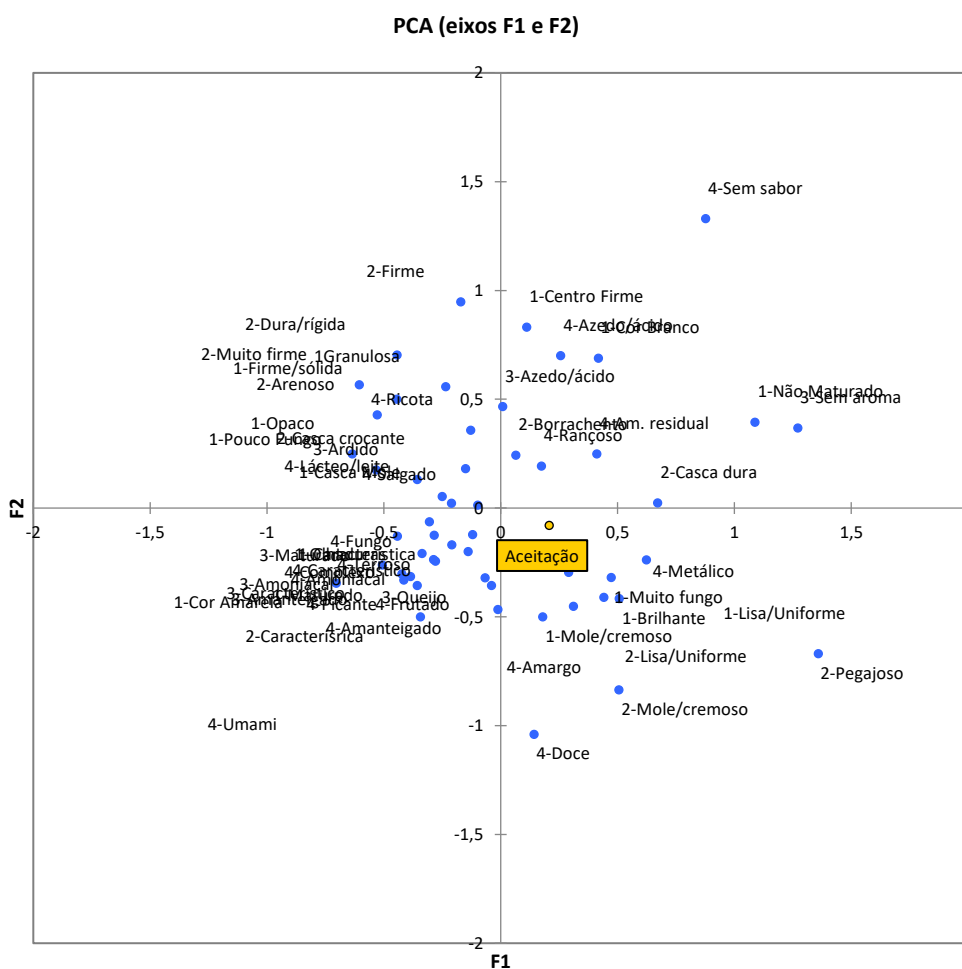


Figura 22 - Representação dos atributos que melhor se correlacionaram com notas altas de aceitação global na solução bidimensional na análise CATA.

Tabela 11 – Aceitação global dos queijos tipo Camembert (Média $\pm$ Desvio Padrão) (n=80).

	Queijo tipo		
	Camembert (leite cru)	Camembert (leite pasteurizado)	Camembert (leite pasteurizado e <i>Lb. rhamnosus</i>)
Aceitação global	6,2 $\pm$ 1,05b	6,1 $\pm$ 1,65b	7,5 $\pm$ 1,11a

Apesar do bom resultado na aceitação global de todos os queijos no qual o valor 6 e 7 na escala de 9 pontos correspondem à gostei ligeiramente e gostei moderadamente respectivamente, o resultado de aceitação global mostrou que é possível melhorar as características sensoriais do queijo tipo Camembert de maneira significativa através da adição da cultura adjunta de *Lb. rhamnosus* GG, intensificando atributos de interesse para esse queijo como a cremosidade, a aparência uniforme e o amargor moderado.

5.CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento térmico do leite, a adição de cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG e o tempo de maturação afetaram o perfil de peptídeos dos queijos tipo Camembert. Todos os queijos apresentaram uma evolução complexa no perfil de peptídeos ao longo da maturação;
- ✓ No início da maturação todos os queijos apresentaram praticamente o mesmo perfil de peptídeos. No entanto, com o avanço da maturação observou-se uma progressiva diferenciação do perfil de peptídeos, sendo essa diferenciação mais clara para os queijos obtidos a partir de leite cru;
- ✓ Não se pode afirmar que o tratamento térmico do leite e a adição de cultura adjunta de *Lactobacillus rhamnosus* GG favoreceram a formação de peptídeos exclusivos em nenhum dos queijos;
- ✓ Todos os queijos, independente dos tratamentos, apresentaram peptídeos potencialmente bioativos. Os peptídeos bioativos importantes para a separação dos queijos foram derivados da β -caseína [β -CN f122–132 (m/z 1364); β -CN f193-206 (m/z

1556); β -CN f193-207 (m/z 1669); β -CN f194-209 (m/z 1718) e β -CN f57-72 (m/z 1740)];

- ✓ Todos os queijos tiveram boa aceitação sensorial e amplo levantamento de atributos em consenso que resultou na separação dos queijos em relação aos atributos que os descreveram. O uso de cultura adjunta *Lb. rhamnosus* GG mostrou-se uma opção não apenas para aproximar o queijo tipo Camembert obtido de leite pasteurizado do produto ideal, como também uma estratégia tecnológica para melhorar significativamente sua aceitação sobre os demais queijos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.; CACHON, R.; COLAS, B.; FERON, G.; DE CONINCK, J.; Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 954–960, 2007.

ADDEO, F., CHIANESE, L., SACCHI, R., MUSSO, S. S., FERRANTI, P., & MALORNI, A. Characterization of the oligopeptides of Parmegiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/l. **Journal of Dairy Research**, 61, 365-374. 1994.

ADDEO, F., CHIANESE, L., SALZANO, A., SACCHI, R., CAPPUCIO, U., FERRANTI, P., MALORNI, A. Characterization of the 12 % trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmegiano-Reggiano cheese. **Journal of Dairy Research**, 59, 401-411. 1992.

AHTESH, F. Anti-hypertensive (Angiotensin converting enzyme-inhibitory) peptides released from milk proteins by proteolytic microorganisms and enzyme. 306 f. Tese (Doutorado) - College of Health and Biomedicine, Victoria University, Melbourne, Australia. 2016.

ALJEWICZ, M.; NALEPA, B.; KOWALSKA, M. Influence of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Proteolysis Patterns of Edam Cheese**. v. 52, n. 4, p. 439–447, 2014.

ALLI, I., OKONIESKA, M., GIBBS, B. F., & KUNISH, Y. Identification of Peptides in Cheddar Cheese by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **International Dairy Journal**, 8, 643-649. 1998.

ALVES, L. S., MERHEB-DINI, C., GOMES, E., DA SILVA, R., & GIGANTE, M. L. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. **Journal of Dairy Science**, 96, 7490-7499. 2013.

ANDREWS, A.T.; VARLEY, J.R.; *Biochemistry of Milk Products*; 1ª ed.; Woodhead Publishing. 1994.

ANUSHA, R.; BINDHU O.S; **Bioactive Peptides from Milk**, Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects, Dr. Isabel Gigli (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62993. 2016.

AOAC. (2006a). Kjeldahl method, method no. 2001.14. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., pp. 72e73). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.

AOAC. (2006b). Gerber method, method no. 2000.18. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., pp. 21-23). Gaithersburg.

AOAC. (2006c). Gravimetric Method, method no. 935.42. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., pp. 72-73). Gaithersburg.

AOAC. (2006d). Gravimetric method, method no. 945.46. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., p. 10). Gaithersburg, MD.

AOAC. (2006e). Kjeldahl method, method no. 2001.14. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., pp. 72-73). Gaithersburg.

AOAC. (2006f). Method I, method no. 926.08. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., pp. 68-69). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.

AOAC. (2006h). Titrimetric method, method no. 920.124. In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., p. 73). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.

AOAC. (2006i). Titrimetric Method, method no. 947.05 In W. Horwitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed., p. 7). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International. ARDO et al. 2009

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

ARES, G.; GONÇALVEZ, D.; PÉREZ, C.; REOLÓN, G.; SEGURA, N.; LEMA, P.; GÁMBARO, A. Influence of gelatin and starch on the instrumental and sensory texture of stirred yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 60, n. 4, 2007.

Associação Brasileira das Indústrias de Queijos - ABIQ, Projeção de consumo e produção de queijos no Brasil, 2014. In: **MILKPOINT**, Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros, postado em 20 de Outubro de 2014, disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/mercado-de-queijos-cresce-no-pais-e-atrai-estrangeiros-91686n.aspx>; acesso em 19 de Julho de 2016.

AZARNIA, S. et al. Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 174–178, 2010.

BAPTISTA D.P.; ARAÚJO F.D.; EBERLIN M.N.; GIGANTE M.L.; A Survey of the Peptide Profile in Prato Cheese as Measured by MALDI-MS and Capillary Electrophoresis. **Journal of Food Science**, Feb;82(2):386-393. 2017.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: An update. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 5, p. 435–457, 1996.

BIRKEMO, G. A.; O’SULLIVAN, O.; R.P. ROSS, R. P.; HILL, C.; Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 233-240, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos** – ANEXO I. Publicado no Diário Oficial da União, 11 mar 1996.

BRASIL. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento* – MAPA. Instrução Normativa nº62, de 29 de setembro de 2011, que altera a IN 51 de 2002 e aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, em 29 de dezembro de 2011. Seção 1. (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA - Normative Ruling No. 62, 29 September 2011 amending IN 51, 2002 and approving the Technical Regulations for Production, Identity and Quality of Cooled Raw Milk, Pasteurized

Milk and the Technical Regulation of Cooled Raw Milk and Transport in Bulk tanks. Official Gazette: Brasilia, Federal District, December 29, 2011. Section 1. 2011.

BROADBENT, J. R.; STRICKLAND, M. WEIMER, B. C.; JOHNSON, M. E.; STEELE, J. L. Peptide Accumulation and Bitterness in Cheddar Cheese Made Using Single-Strain *Lactococcus lactis* Starters with Distinct Proteinase Specificities. *Journal of Dairy Science*, 81, 327-337. 1998.

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

BSI. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **BSI Methods**. (p. 12). London, UK: British Standard Institution, 1989

CARVALHO, M.P; VENTURINI C.E.P.; GALAN, V.B.; As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. In: **MILKPOINT**, postado em 05 de Fevereiro de 2015, disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>; acesso em 10 de Julho de 2016.

CHAMBA, J., & IRLINGER, F. Secondary and adjunct cultures. **Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology** (3rd Edition), in: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, 1, p.191–206; 2004.

CLARE, D. A., & SWAISGOOD, H. E. Bioactive milk peptides: A prospectus. **Journal of Dairy Science**, 83, p.1187–1195; 2000.

CODEX STAN C-33; Standard for Camembert. Milk and Milk Products (2^a Ed.) – **Codex Alimentarius Stan C-33** - 1973.

CODEX STAN 276; Codex Standard for Camembert. Milk and Milk Products (4^a Ed.) **Codex Alimentarius Stan 276**, 2011

CURRY, B.; CROW, V. *Lactobacillus casei* group. In: Roginski, H. – Fuquay, J. – Fox, P.: **Encyclopedia of Dairy Science**. San Diego : Academic Press, p. 1479–1484; 2004.

DAIROU, V. E SIEFFERMANN, J. M. A. Comparison of 14 Jams Characterized by Conventional Profile and a Quick Original Method, the Flash Profile. **Journal of Food Science**, 67, p.826-834. 2002.

DELCENSERIE V., MARTEL D., LAMOUREUX M., AMIOT J., BOUTIN Y., ROY D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Curr. Issues Mol. Biol.** 10, p.37–54; 2008.

DIONYSIUS, D A;MARSCHKE, R J;WOOD, A J; MILNE, J; Identification of physiologically functional peptides in dairy products. Australian **Journal of Dairy Technology**; n.55, 2; ProQuest Central p. 103; 2000.

DONKOR O. N., HENRIKSSON A., SINGH T. K., VASILJEVIC T., SHAH N. P.; ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. **Internacional Dairy Journal**;17:1321–1331. 2007.

DONNELLY, C.; KEHLER, M. **The Oxford Companion to Cheese**. Oxford University Press, Incorporated. p. 646. 2016.

DOS SANTOS, K. M. O. et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, v. 95, n. 2, p. 209–230, 2015.

ENGEL, E. et al. Evolution of the composition of a selected bitter Camembert cheese during ripening: release and migration of taste-active compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2940–2947, 2001.

EXPOSITO I.L.; , QUIRÓS, A.; AMIGO, L.; RECIO, I.; Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. **Lait** 87; 241–249. 2007.

EXPÓSITO L.I.; MINERVINI, F; AMIGO L.; RECIO I.; Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein. **Journal of Food Protein**. Dec;69(12):2992-7. 2006.

EXPOSITO, L., I.; AMIGO, L., RECIO, I.; A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. **Dairy Science & Technology**, EDP sciences/Springer, 92 (5), pp.419-438. <10.1007/s13594-012-0066-5>. <hal-00930630>; 2012

EXTERTAKE, F. A., LAGERWERF, F. M., HAVERKAMP, J., & SCHALKWIJK, S. V.; The Selectivity of Chymosin Action on α S1- and β -Caseins in Solution is Modulated in Cheese. *International Dairy Journal*, 7, 47-54. 1997.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg; Volume I: General aspects. AN Aspen Publication, 2004. 617 p.

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

FOX, P.F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY, J.A.; **Dairy Chemistry and Biochemistry**; Springer International Publishing. 2015.

GAGNAIRE, V., MOLLÉ, D., HERROUIN, M., & LÉONIL, J.; Peptides Identified during Emmental Cheese Ripening: Origin and Proteolytic Systems Involved. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4402-4413. 2001.

GOBBETTI, M., STEPANIAK, L., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., & DI CAGNO, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 42, 223–239. 2002.

GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G. . et al. Viability and Proteolytic Capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during Cheese Ripening. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 2, n. May, p. 7–12, 2014.

GOULDSWORTHY, A. M.; LEAVER, J.; & BANKS, J. M.; Application of a Mass Spectrometry Sequencing Technique for Identifying Peptides Present in Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 6, 781-790. 1996.

GRIFFITHS, M.W.; TELLEZ, A.M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. **Front Microbiol.** 2013; 4: 30. Published online 2013.

GRIPON, A.; Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, pp. 111–136 (Ed. PF Fox). London, United Kingdom: Chapman & Hal. 1993.

GUO, T.; OUYANG, X.; XIN, Y.; WANG, Y.; ZHANG, S.; KONG, J; Characterization of a New Cell Envelope Proteinase PrtP from *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC11055. *Journal of Agric Food Chem*; Sep 21;64(37):6985-92. 2016.

HA, G. E.; CHANG, O. K.; JO, S-M. Identification of antihypertensive peptides derived from low molecular weight casein hydrolysates generated during fermentation by *Bifidobacterium longum* KACC 91563. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, v. 35, p. 738-747, 2015.

HAANDRIKMAN A, KOK J, VENEMA G. Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein. *Journal Bacteriol* 173:4517–4525, 1991.

HARBUTT, J. **O livro do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 2011. 352 p.

HASSOUNA, M.; GUIZANI, N.; Evolution de la flore microbienne et des caracteristiques physico-chimiques au cours de la maturation du fromage Tunisien de type camembert fabrique avec du lait pasteurise. *Microbiol. Hyg. Alim.* 18, 14-23. 1995.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria : A Review. *Food and Nutrition Science*, v. 2013, n. November, p. 73–87, 2013.

HAYES, A; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C.; STANTON. C.; Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026; *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; pp. 2260-2264. 2006.

JARMOŁOWSKA, B.; KOSTYRA, E.; KRAWCZUK, S.; KOSTYRA, H.; β -Casomorphin-7 isolated from Brie cheese; *Science of Food and Agriculture*; Volume 79, Issue 13; p.1788–1792; 1999.

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

KASTIN, A.; **Handbook of Biologically Active Peptides**. Academic Press. Second edition., 2, 2nd ed. 2013.

KITTS, D. D., & WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, 9, 1309–1323; 2003.

KORHONEN H.; PIHLANTO A. Bioactive peptides and proteins. **Advances in Food and Nutrition Research** Volume 47, Pages 175–276; 2003.

KUCHROO, C. N., & FOX, P. F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. **Michwissenshaft**, 37, 331-335. 1982

KUNDA, P. B.; BENAVENTE, F.; CATALA-CLARIANA, S.; GIMENEZ, E.; BARBOSA, J.; SANZ-NEBOT, V.; Identification of bioactive peptides in a functional yogurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 121– 128, 2012.

KUNJI, E. R. S. et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 187–221, 1996.

LAHTINEN, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. **Age**, v. 34, n. 1, p. 133–143, 2012.

LAMBERET, G.; LENOIR, J.; Les caracteres du systeme lipolytique de l'espece *Penicillium caseicolum*: purification et propriete de la lipase majeure. **Le Lait** 56, 622-644., 1976.

LANARA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos analíticos oficiais para o controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos**. LANARA. Brasília, 1981.

LAW, B.A.; TAMIME, A.Y.; **Technology of Cheesemaking**, 2nd Edition; Wiley-Blackwell; ISBN: 978-1-405-18298-0; p.512; 2010.

LECLERCQ-PERLAT, M.-N. et al. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. **The Journal of dairy research**, v. 71, p. 346–354, 2004a.

LECLERCQ-PERLAT, M.-N. et al. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part II. Changes in the concentration of the more volatile compounds. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 3, p. 355–366, 2004b.

LEMIEUX, L.; SIMARD, R. E. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. **Le Lait**, v. 72, n. 4, p. 335–385, 1992.

LENOIR, J. The Surface Flora and its Role in the Ripening of Cheese. Bulletin 171, **International Dairy Federation**, Brussels. P 3-20. 1984.

LIU, M. et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited : a genomic comparison. **BMC Genomics**, v. 11, p. 36, 2010.

LIU, Y.; PISCHETSRIEDER, M. Identification and relative quantification of bioactive peptides sequentially released during simulated gastrointestinal digestion of commercial kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1865–1873, 2017.

MAHMOUD, S. F.; EL-HALMOUCH, Y.; MONTASER, M. M. Effect of probiotic bacteria on Karish Cheese production. **Life Science Journal**, v. 10, n. 2, p. 1279–1284, 2013.

MALIN, E.L.; TUNICK, M.H.; **Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese**; Springer US; ISBN978-1-4613-5782; p.397; 1995.

MARTÍNEZ-MAQUEDA D; B. MIRALLES, E. CRUZ-HUERTA, I. RECIO; Casein hydrolysate and derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in human intestinal cells, **Internacional Dairy Journal**: 32; 13–19. 2013.

MASUI, K.; YAMADA, T. **French Cheeses**. Ed. Dorling Kindersley. Londres. 2004.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2–3, p. 127–144, 2004.

MCSWEENEY, P. L. H. et al. Proteolysis of bovine α s2-casein by chymosin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 199, n. 6, p. 429–432, 1994.

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; OLSON, N. F. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 4, p. 321–336, 1995.

MCSWEENEY, P.; SOUSA, M. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le Lait**, INRA Editions, v. 80, n. 3, p. 293–324, 2000.

MEISEL, H., & FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, 9, 1289–1295; 2003.

MEISEL, H.; SCHLIMME, E.; Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins); V. Brantl, H. Teschemacher (Eds.), **b-Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments**, VCH, Germany, Weinheim , pp. 27-33; 1994.

MENDES, D.P.G.; SOUZA, M.R.; M. GALLETTI JÚNIOR; M.O. LEITE; C.F.A.M. PENNA. Quality of fermented milks produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus*

fermentum isolated from artisanal cheeses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.66 no.4 Belo Horizonte; 2014.

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

MIETTINEN S.M., TUORILA H, PIIRONEN V, VEHKALAHTI K, HYVÖNEN L. Effect of emulsion characteristics on the release of aroma as detected by sensory evaluation, static headspace gas chromatography, and electronic nose. **Journal Agric Food Chem.** ul 17;50(15), 2002.

MIGUEL M.; RECIO, I.; RAMOS, M; M.A. DELGADO; ALEIXANDRE, M.A.; Antihypertensive effect of peptides obtained from enterococcus faecalis-fermented milk in rats; **Journal of Dairy Science**; pp. 3352-3359; 2006.

MÖLLER N. P., SCHOLZ-AHRENS K. E., ROOS N., SCHREZENMEIR J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **Eur. J. Nutr.** 47; p. 171–182; 2008.

MUNK, A.V.; FERREIRA, D.G.S. **Produção de queijos finos: Morbier, Saint Paulin, Gorgonzola e Camembert.** Editora Viçosa: Centro de Produções Técnicas (CPT), 2008. 254 p.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J.; Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides; **Trends in Food Science & Technology**; Volume 50, Pages 26-43; 2016.

NONI I.D.; CATTANEO, S. Occurrence of b-casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry** 119; p.560–566; 2010.

O'DRISCOLL, B. M. et al. Protease activities in raw milk determined using a synthetic heptapeptide substrate. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 606–611, 1999.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P.; Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait*, 87(2), 149-165; 2007.

ORTEGA, N., ALBILLOS, S. M., & BUSTO, W. D. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*, 14, 307–315. 2003.

OTTE, J., ZAKORA, M., KRISTIANSEN, K. R., & QVIST, K. B. Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Le Lait*, 77, 241-57.; 1997.

PADGHAN, P.V.; Biofunctional Properties of Traditional Indian Lassi Prepared from Buffalo milk; **tese (Doutorado)**; Dairy Chemistry Division National Dairy Research Institute (I.C.A.R.) Karnal-132001 (Haryana), India; 2012,

PEDERSON J.A., MILESKE G.J., WEIMER B.C., STEELE J.L. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol* 181:4592–4597; 1999.

FRÍAS, J.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E.; **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**; 1ª Edition; Elsevier; p.762; 2016.

PEREIRA, D.; Qual o futuro para o queijo artesanal?; Seção Paladar; Jornal Estadão online. 2017. Disponível em: <http://paladar.estadao.com.br/blogs/so-queijo/qual-o-futuro-para-o-queijo-artesanal/> Acessado em: 24/12/2017.

PETYAEV I.M., BASHMAKOV Y.K.; Could cheese be the missing piece in the French paradox puzzle. *Med Hypotheses* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2012.08.018>; 2012.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H.; Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins; **Internacional Dairy Journal**; Volume 8, Issue 4, Pages 325-331;1998.

PIRAINO, P.; UPADHYAY, V. K.; ROSSANO, R.; RICCIO, P.; PARENTE, E.; KELLY, A. L.; & MCSWEENEY, P. L. H. Use of mass spectrometry to characterize proteolysis in cheese. **Food Chemistry**, 101, 964-972; 2006.

QUIRÓS A., RAMOS M., MUGUERZA B., DELGADO M.A., MIGUEL M., ALEIXANDRE A., RECIO I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. **Internacional Dairy Journal**; 17:33–41. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.12.011; 2007.

RATTRAY, F. P.; HANSEN, C. Secondary Cultures. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 1, n. 1996, p. 275–281, 1999Rehn et al. 2010.

RICHARDSON, G.H. Standard methods for examination of dairy products. Washington, DC, USA: **American Public Health Association**. 1985

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review. **Trends in Food Science and Technology**, 12, p. 276–284; 2001.

SAITO, T; NAKAMURA, T; KITAZAWA, H.; KAWAI, T.; ITOH T. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. **Journal Dairy Science** 83: p.1434–1440; 2000.

SÁNCHEZ-RIVERA L., RECIO I., RAMOS M. & GÓMEZ-RUIZ J.Á.; Peptide profiling in cheeses packed using different technologies. **Journal of Dairy Science**, 96, 3551-3557. 2013.

SÃO PAULO; Decreto Estadual Paulista N°12.486; Normas Técnicas Especiais (NTA) têm por objetivo normalizar e padronizar alimentos e bebidas. Foram obedecidas nas presentes Normas Técnicas Especiais as especificações ou normas próprias de Alimentos e Bebidas constantes da legislação federal vigente. Assembleia Legislativa de São Paulo; 1978.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 394–406, 2006.

SAXELIN, M.; KAJANDER, K. Chapter 6. Commercially Available Human Probiotic Microorganisms. in: **Handbook of Probiotics and Prebiotics**, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2008.

SFORZA S.; CAVATORTA V.; LAMBERTINI F, GALAVERNA G, DOSSENA A, MARCHELLI R.; Cheese peptidomics: a detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. **Journal of Dairy Science**.;95:3514–26. 10.3168/jds.2011-5046; 2012

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; **Handbook of Functional Beverages and Human Health**; CRC Press; ISBN 9781466596412; p.866; 2016.

SHAHIDI F., ZHONG Y.; Bioactive peptides. **Journal AOAC Internacional**. Jul-Aug;91(4):914-31; 2008.

SHARMA, S.; SINGH, R.; RANA, S. Review Article Bioactive Peptides : A Review. **Int.J.Bioautomation**, v. 15, n. 4, p. 223–250, 2011.

SHAW, M. B. The manufacture of soft, surface mould, ripened cheese in France with particular reference to Camembert. **International Journal of Dairy Technology**, v. 34, n. 4, p. 131–138, 1981.

SIENKIEWICZ-SZAPKA, E. et al. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal** 19, p.258–263; 2008.

SOERYAPRANATA, E.; POWERS, J. R.; WELLER, K. M.; HILL, H. H.; & SIEMS, W. F.; Differentiation of intracellular peptidases of starter and adjunct cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 37, 17-22. 2004.

SOERYAPRANATA, E., POWERS, J. R., HILL, H. H., SIEMS, W. F., AL-SAAD, K. A., & WELLER, K. M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for the Quantification of β -Casein Fragment (f193-209). *Food Chemistry and Toxicology*, 67, 534-538. 2002.

SOERYAPRANATA, E., POWERS, J. R., & ÜNLÜ, G.; Degradation of α s1-CN f1-23 by aminopeptidase N and endopeptidases E, O, O2, and O3 of *Lactobacillus helveticus* WSU19 under cheese ripening conditions. *International Dairy Journal*, 18, 178-186. 2008.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, 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.

SPINNLER, H.-E., GRIPON, J.-C. Surface Mould-ripened cheeses. In: Fox, P.F. (ed). **Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology**, vol. 2. London, Elsevier Academic Press. p. 157-174. 2004.

RAWLINGS, N.D.; **Handbook of Proteolytic Enzymes**; Vol. 1; Academic Press; DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00848-6; Elsevier, 2013.

STEPANIAK, L.; SORHAUG, T.; JEDRYCHOWSKI, L.; WROBLEWSKA, B. Immunoreactivity and inhibition of angiotensin converting enzyme and lactococcal oligopeptidase by peptides from cheese. *Italian Journal of Food Science*, v. 13, p. 373-381, 2001.

STONE, H.; BLEIBAUM, R.; THOMAS, H.; **Sensory Evaluation Practices**; 4^a ed.; Academic Press; ISBN: 9780123820877; p.446; 2012.

TAMIME, A. Y.; SKRIVER, A.; NILSSON, L. E. Cap Starter Culture TAMIME.pdf. In: **Fermented Milks**. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. p. 11–43. 2006.

TERHAAG, M. M.; BENASSI, M. T. Perfil *Flash*: uma opção para análise descritiva rápida. **Journal Food Technology**, p. 140-151, 2010.

TUOMOLA, E. M.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.: Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. **International Journal of Food Microbiology**, 60, , p. 75–81; 2000.

UPADHYAY, V.K.; MCSWEENEY, P.L.H.; MAGBOUL, A.A.A.; FOX, P.F. Proteolysis in cheese during ripening. In: Fox, P.F. (ed). **Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology**, vol. 1. London, Elsevier Academic Press, p. 391-434; 2004.

USDA, United States Department of Agriculture Agricultural Research Service; National **Nutrient Database for Standard Reference** - Basic Report: 01007, Cheese, camembert; Release 28. 2016.

VALÍK, L.; MEDVEĐOVÁ, A.; LIPTÁKOVÁ, D.; Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. **Journal of Food and Nutrition Research** Vol. 47, No. 2, p. 60-67; 2008.

VASSAL, L.; GRIPON, J.C.; L'amertume des fromages `a pate molle de type Camembert: role dela pr'esure et de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contr'oler. **Le Lait**, INRA Edition,64 (643 644), pp.397-417 , 1984.

VILLEGAS, J.M.; PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; TURBAY, M.B.E.; GIORI, G.S.; HEBERT, E.M.; Milk-derived angiotensin-I-converting enzymeinhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581; **Peptidomics**; Varsovia; vol. 1 p. 22 – 29; 2014.

WALSTRA, P., WOUTERS, J.T., GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2nd. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL; 2006.

WISCONSIN, M. M. B. Glossary of Cheese Terms - **Wisconsin Cheesecyclopedia**, Madison, WisconsinExcelsior Drive, , 1990.

XIA J., MANDAL R., SINELNIKOV I. V., BROADHURST D., & WISHART D. S. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomics data analyst. **Nucleic Acids Res**, 40, p.1-7; 2012.

XIONG, R.; MEULLENET, J. F; A PLS dummy variable approach to assess the impact of JAR attributes on liking. **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 188–198, 2006.

XLSTAT **Version 2014.1.01**, copyright Addinsoft 1995–2014.

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Perfil de peptídeos de queijo tipo Camembert: efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta

Pesquisador: Bruno Domingues Galli

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66734317.9.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Engenharia de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.054.029

Apresentação do Projeto:

Os produtos lácteos, em especial os queijos, são suscetíveis à quebra de suas cadeias de proteína, processo denominado de proteólise, decorrente da intensa fermentação bacteriana e da atividade enzimática endógena e exógena natural do processo de fabricação e maturação destes produtos (WALSTRA et al., 2006). O processo consiste na mais complexa e importante reação bioquímica envolvida na maturação de queijos, sendo responsável por diversas alterações de textura, tais como dureza, elasticidade e capacidade de derretimento, além de afetar também o desenvolvimento de sabor e aroma dos diferentes tipos de queijos (FOX et al., 2000). O Camembert é um queijo macio, de alta umidade, caracterizado por ser coberto por uma camada aveludada de fungo branco originada pelo crescimento do fungo *Penicilium camemberti* sobre sua superfície. Neste caso, a maturação é afetada pelas enzimas naturais do leite (especialmente quando se usa leite cru), pelas enzimas produzidas pela cultura láctica iniciadora, pelas enzimas produzidas por bactérias ácido lácticas não oriundas da cultura láctica e também pelas enzimas produzidas pela presença do fungo, que tem atividade proteolítica intensa e confere ao queijo Camembert suas características específicas de sabor e aroma durante o processo de maturação (SHAW, 1981; SPINLER; GRIPON, 2004). Além de conferir propriedades típicas dos diferentes queijos, nas últimas duas décadas tem sido identificado que a proteólise resulta na formação de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

peptídeos que podem ter impacto positivo nas funções ou condições corpóreas, resultando em benefícios à saúde (SHAHIDI; ZHONG, 2008). Peptídeos derivados da caseína durante a maturação dos queijos têm sido relacionados diversos efeitos sistêmicos no organismo, dentre os quais, anti-hipertensivo, antitrombótico, antimicrobianos, antioxidantes, imuno-modulador e opióide (SHARMA; SINGH; RANA, 2011). Adicionalmente, peptídeos obtidos durante a maturação de queijos têm sido identificados como potenciais agentes capazes de anular efeitos indesejados da ingestão de gorduras saturadas presentes nos derivados lácteos, especialmente queijos. Com base na relação entre proteólise e liberação de peptídeos bioativos, é possível considerar que queijos com intensa atividade proteolítica, como o queijo Camembert, possuam maior probabilidade de apresentarem peptídeos bioativos em sua composição (EXPÓSITO; AMIGO; RECIO, 2012). Embora nenhum trabalho disponível na literatura tenha acompanhado o perfil de peptídeos do queijo Camembert durante a maturação, peptídeos com função imunomodulatória (DIONYSUS et al., 2000), inibidores da enzima conversora de angiotensina (SAITO et al., 2000) e de caráter opióide (PIRAINO et al., 2006; SIENKIEWICZ-SZLAPKA et al., 2008; NONI; CATANNEO, 2010) têm sido relatados em queijo Camembert comercial e em queijo Brie, um queijo também maturado por fungos brancos. O reconhecimento do potencial para produção de peptídeos bioativos durante a maturação de queijos impulsionou as pesquisas voltadas para a identificação de cepas específicas de bactérias lácticas capazes de liberar peptídeos bioativos a partir da caseína. Assim, o *Lactobacillus helveticus*, uma cultura termofílica, tem sido utilizada na fabricação de queijos duros e semi-duros, enquanto *Lactobacillus rhamnosus*, uma cultura mesofílica, tem sido cada vez mais explorada para a fabricação de queijos moles e frescos, de forma a adequar os diferentes processos tecnológicos à viabilidade destas cepas para fermentação, acidificação e produção dos peptídeos bioativos durante a fabricação e maturação dos queijos (CHAMBA; IRLING, 2004). Baseado nessas premissas, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta no desenvolvimento do perfil sensorial do queijo Camembert durante a maturação. Os queijos serão fabricados a partir de leite cru e tratado termicamente, adicionado ou não *Lactobacillus rhamnosus* GG e maturados por período de 50 dias. A maturação é afetada pelas enzimas naturais do leite (especialmente quando se usa leite cru), pelas enzimas produzidas pela cultura láctica iniciadora, pelas enzimas produzidas por bactérias ácido lácticas não oriundas da cultura láctica e também pelas enzimas produzidas pela presença do fungo, que tem atividade proteolítica intensa e confere ao queijo Camembert suas características específicas de sabor e aroma durante o processo de maturação. Assim esperasse que haja grande diferença sensorial do produto em diferentes períodos de maturação e devido aos diferentes tratamentos. Análise

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

sensorial de perfil flash (FP) definida por Dairou e Sieffermann (2002) em conjunto com análise de aceitação com escala não estruturada. A análise de perfil flash é uma técnica descritiva rápida originada da metodologia de perfil livre. Consiste numa avaliação comparativa de um conjunto de produtos, em que o consumidor escolhe os atributos sensoriais livremente e o método de ordenação é baseado na apresentação simultânea das amostras que se pretendem estudar. No FP não é necessário treino individual, cada provador utiliza a sua própria lista de descritores avaliados numa escala ordinal e é instruído a ordenar as amostras em cada atributo separadamente. As análises sensoriais serão realizadas nos dias 15, 30, 45, de maturação. Serão recrutados para o teste de 10 a 15 provadores que não possuam restrições quanto as amostras oferecidas e que tenham familiaridade mínima com o queijo tipo Camembert. Os testes serão realizados em cabines individuais sob luz branca. As amostras (cunhas de 15g cortadas a partir do centro das peças) serão servidas a temperatura ambiente controlada (25 ± 2 °C), em pratos de porcelana preta codificados com três dígitos. Será servida água mineral a temperatura ambiente e bolacha água e sal, para que os provadores possam efetuar a limpeza do palato, entre as amostras. A análise de aceitação será realizada com as mesmas amostras com 120 provadores aleatórios que irão aferir aspectos sensoriais gerais das amostras em escala não estruturada em teste duplo cego em cabine branca isolada, com luz branca e amostras codificadas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta no desenvolvimento do perfil sensorial do queijo Camembert durante a maturação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pessoas com qualquer tipo de alergia à quaisquer dos componentes do leite ou às culturas iniciadoras (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) e adjuntas (*Lactobacillus rhamnosus* GG; *Penicillium Candidum*) utilizadas na fabricação do queijo bem como indivíduos com intolerância a lactose podem ter reações imunológicas e/ou gastrointestinais se expostas aos produtos. Portanto serão excluídas do recrutamento. Benefícios: A participação voluntário nessa análise contribuirá com o desenvolvimento do projeto de pesquisa que visa a formulação de queijo Camembert com características sensoriais mais próximas ao desejado pelo consumidor aliado à presença de peptídeos potencialmente bioativos que agreguem saudabilidade ao produto. A participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

A pesquisa "Perfil de peptídeos de queijo tipo Camembert: efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta Informações Preliminares" é o tema de Mestrado do pesquisador Bruno Domingues Galli, discente do Programa de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, orientado pela Profa. Mirna L. Gigante, com participação de Débora Parra Baptista e Flávia Giacometti Cavalheiro. Antes do início do teste para as análises sensoriais aplicadas no projeto, será dada uma explicação simplificada a cada provador sobre o método de Perfil Flash, descrevendo-se as etapas básicas do teste. Será apresentado também um protocolo para ser utilizado durante o levantamento de atributos e para as análises, com instruções para avaliar os atributos de aparência (observando cor e aspecto), aroma (cheirando a amostra duas vezes), sabor (degustando a amostra), textura (mastigando e avaliando a sensação conferida na boca) e, também, qualquer sensação na cavidade oral após engolir (residual). Para levantamento de atributos, as amostras serão apresentadas simultaneamente, solicitando-se que os provadores anotem as similaridades e diferenças. Após o levantamento, em entrevista individual com cada participante, será montada uma ficha de avaliação das amostras e uma lista de definições dos atributos, específicas para cada provador. Em seguida, as amostras serão novamente apresentadas, orientando-se os provadores para que ordenem as amostras em ordem crescente de intensidade para cada um dos atributos definidos anteriormente, utilizando a ficha modelo de escala não estruturada para análise descritiva quantitativa. Os provadores serão instruídos que, se necessário, poderão alterar a ficha durante o procedimento de ordenação, retirando ou incluindo atributos, ou mudando as definições no glossário. A análise de aceitação será realizada com as mesmas amostras com 120 provadores aleatórios que irão aferir aspectos sensoriais gerais das amostras em escala não estruturada em teste duplo cego em cabine branca isolada, com luz branca e amostras codificadas. O custeio do projeto é de R\$ 300,00 (financiamento próprio). Os testes serão aplicados no Depto de Tecnologia de Alimentos durante o período de um dia, nas dependências da FEA-Unicamp, com início datado para 01/08/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: FolharostoGalli.pdf_devidamente preenchida, datada e assinada.

Projeto: Detalhado / Brochura Investigador ProjetoDetalhadoGalli.pdf_Adequado.

Outros: Questionario_de_recrutamento_CAMEMBERT.pdf_Adequado.

Outros: Cartaz_de_recrutamento_CAMEMBERT.pdf.

TCLE: TCLE_versao3.pdf 04/05/2017 10:38:55

Outros: AtestadoMatricula_Bgalli.pdf_Adequado.

Outros: Carta_Resposta_sobre_PARECER.pdf 04/05/2017 10:37:40

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

Informações básicas do projeto: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_873067.pdf 04/05/2017 10:39:25

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Lista de pendências e inadequações emitidas no parecer CEP Nº2.041.570:

1. O pesquisador deve sempre informar que haverá ressarcimento de despesas decorrentes da pesquisa, tais como transporte e alimentação, para o participante, e seu acompanhante quando for o caso, quando for necessária a sua presença junto ao pesquisador fora da rotina do participante. Nos casos em que o pesquisador se desloque até o participante dentro de sua rotina normal, não há necessidade de ressarcimento, porém é necessário, da mesma forma, informar no TCLE que não haverá ressarcimento por esse motivo. Solicita-se adequação.

Resposta: O TCLE contempla a seguinte informação: "A participação na pesquisa se dará de forma voluntária e dentro da rotina local dos participantes, logo não haverá ressarcimento de despesas decorrentes da pesquisa, tais como para transporte e alimentação."

Análise: Pendência Atendida.

2.O texto como foi descrito no TCLE não garante indenização por danos decorrentes da pesquisa. A Resolução 466/12 (item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas". Cabe enfatizar que a questão da indenização não é prerrogativa da Resolução 466/12, estando prevista no código civil. Portanto, solicitamos que seja assegurado, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa tem direito à indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa.

Resposta: O TCLE contempla a seguinte informação: "Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas"

Análise: Pendência Atendida.

3.No item "Responsabilidade do Pesquisador", substituir a palavra cópia por via.

Resposta: A palavra "copia" foi substituída por "via".

Análise: Pendência Atendida.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.054.029

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_873067.pdf	04/05/2017 10:39:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao3.pdf	04/05/2017 10:38:55	Bruno Domingues Galli	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_sobre_PARECER.pdf	04/05/2017 10:37:40	Bruno Domingues Galli	Aceito
Outros	AtestadoMatricula_Bgalli.pdf	31/03/2017 13:21:50	Bruno Domingues Galli	Aceito
Outros	Cartaz_de_recrutamento_CAMEMBERT.pdf	31/03/2017 13:16:20	Bruno Domingues Galli	Aceito
Outros	Questionario_de_recrutamento_CAMEMBERT.pdf	31/03/2017 13:15:48	Bruno Domingues Galli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoGalli.pdf	09/03/2017 19:56:12	Bruno Domingues Galli	Aceito
Folha de Rosto	FolharostoGalli.pdf	09/03/2017 19:51:57	Bruno Domingues Galli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

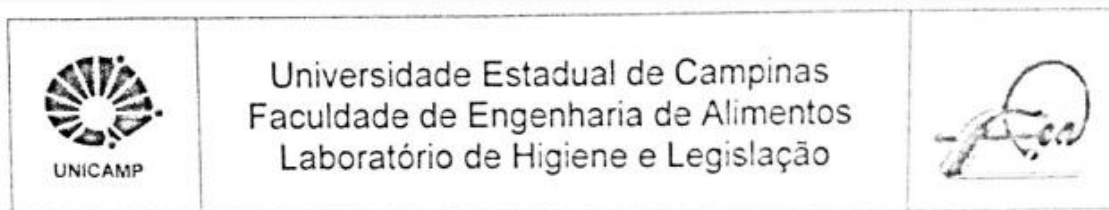
Não

CAMPINAS, 09 de Maio de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2 – Laudo das análises microbiológicas dos lotes submetidos á análises sensoriais.



Relatório de Ensaio Analítico – RE24.17- 2ª parte

p. 1/1

Interessado: Bruno Galli – Profª Drª Mirna L. Gigante
Laboratório de Leites e Derivados

Data de entrada: 11/09/2017

Material recebido: Queijo Camembert - Amarelo
Queijo Camembert - Azul
Queijo Camembert - Vermelho

Resultados:

Ensaio Analítico	Amostra		
	Amarelo	Azul	Vermelho
<i>Salmonella</i> (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria sp</i> (em 25g)	Ausente	Presente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g*)	<10 ²	<10 ²	<10 ²
Coliformes Totais (NMP/g**)	4,6x10 ²	2,3x10 ³	2,3x10 ¹
Coliformes Termotolerantes(NMP/g**)	4,3x10 ¹	2,3x10 ³	2,3x10 ¹

*UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra)

**NMP (Número Mais Provável por grama de amostra)

Métodos utilizados:

SALFINGER, Y. and TORTORELLO, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 2015, 995p.

Comentários:

O(s) resultado(s) apresentado(s) refere(m)-se à(s) amostra(s) recebida(s), sendo o interessado responsável pela amostragem e envio ao nosso laboratório.

Campinas, 22 de novembro de 2017.


Profª Drª Maristela S. do Nascimento
DTA - FEA - UNICAMP
Matrícula 30701-5

ANEXO 3 - Ficha de levantamento de atributos para análise sensorial de perfil-flash.

Data: _____ Ficha nº _____

NOME: _____

Perfil Flash de queijo tipo Camembert

1) Você está recebendo 3 amostras de queijo tipo Camembert. Observe, cheire, aperte e prove as amostras, uma a uma, anotando suas características isoladas.

Amostra ____	Amostra ____	Amostra ____

2) Compare-as e determine a lista dos atributos de aparência, aroma, sabor e textura que diferenciam ao menos 2 das amostras.

ANEXO 4 – ficha de ordenação dos atributos levantados na análise de perfil flash.

Avaliação sensorial descritiva de queijo Tipo Camembert – Perfil Flash Data: ____/____/2017
Nome _____

Com um risco identificado, ordene as 3 amostras de queijo tipo Camembert em cada atributo sensorial que você escolheu, em ordem crescente de intensidade:]

1	- +
2	- +
3	- +
4	- +
5	- +
6	- +
7	- +
8	- +
9	- +
10	- +

Comentários adicionais:

ANEXO 5 – ficha de avaliação para a análise sensorial CATA e avaliação global.

Avaliação sensorial de queijo Tipo Camembert – CATA (Check-all-that-apply)	
Data: __/__/2017	
Nome _____	Amostra.: ____

Você conhece e já consumiu o queijo Camembert ou Brie? ☐ Sim ☐ Não

Conhecendo **este tipo de queijo**. Por favor, marque todas as opções que você considera adequadas para descrever a amostra provada:

Aparência	Textura	Aroma	Sabor
☐ Amarelo	☐ Aveludada	☐ Amanteigado	☐ Adstringência
☐ Branco	☐ Característica	☐ Amoniacal	☐ Amanteigado
☐ Brilhante	☐ Casca dura	☐ Azedo	☐ Amargo
☐ Casca mole	☐ Cremoso	☐ Característica	☐ Amargor residual
☐ Centro firme	☐ Firme	☐ Fermentado	☐ Amargor leve
☐ Cremoso	☐ Macio	☐ Lácteo/Leite	☐ Amoniacal
☐ Firme/sólido	☐ Pegajoso	☐ Maturado	☐ Azedo/ácido
☐ Granuloso	☐ Quebradiça	☐ Sem aroma	☐ Característico
☐ Liso			☐ Doce
☐ Maturado			☐ Umami
☐ Muito fungo			☐ Lácteo/leite
☐ Não maturado			☐ Metálico
☐ Olhaduras			☐ Rançoso
☐ Opaco			☐ Ricota
☐ Pouco fungo			☐ Salgado
☐ Outro: _____	☐ Outro: _____	☐ Outro: _____	☐ Outro: _____

Avaliação global

Avalie cada amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto gostou ou desgostou do queijo provado, na qual 1 corresponde á “desgostei muitíssimo” e 9 corresponde á “Gostei muitíssimo”

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Comentários adicionais:

ANEXO 6 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Perfil de peptídeos de queijo tipo Camembert: efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta

Pesquisadores responsáveis: Bruno Domingues Galli e Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

Número do CAAE: 66734317.9.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

A maturação é afetada pelas enzimas naturais do leite (especialmente quando se usa leite cru), pelas enzimas produzidas pela cultura láctica iniciadora, pelas enzimas produzidas por bactérias ácido lácticas não oriundas da cultura láctica e também pelas enzimas produzidas pela presença do fungo, que tem atividade proteolítica intensa e confere ao queijo Camembert suas características específicas de sabor e aroma durante o processo de maturação. Assim espera-se que haja grande diferença sensorial do produto em diferentes períodos de maturação e devido aos diferentes tratamentos. Assim, o objetivo desta análise sensorial é avaliar o efeito do tratamento térmico e do uso de cultura adjunta no desenvolvimento do perfil sensorial do queijo Camembert durante a maturação.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: responder um questionário sobre hábitos de consumo de queijo Camembert, a provar amostras de queijo Camembert com comprovada segurança microbiológica (conforme preconizado pela resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001/Anvisa) e, utilizando uma escala não estruturada, avaliá-las em relação aos parâmetros de aceitação global, aparência, aroma, sabor e textura.

As análises serão realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em cabines individuais confortáveis, climatizadas e com iluminação adequada. A identificação do participante será mantida em sigilo pelos pesquisadores. Não haverá gravações e sua participação será durante apenas 1 dia.

Desconfortos e riscos:

Você não deve participar deste estudo se apresentar qualquer tipo de alergia à quaisquer dos componentes do leite ou às culturas iniciadoras (*Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) e adjuntas (*Lactobacillus rhamnosus* GG; *Penicillium Candidum*) utilizadas na fabricação do queijo bem como indivíduos com intolerância a lactose podendo ter reações imunológicas e/ou gastrointestinais se exposto aos produtos.

Benefícios:

A participação voluntária nessa análise contribuirá com o desenvolvimento do projeto de pesquisa que visa a formulação de queijo Camembert com características sensoriais mais próximas ao desejado pelo consumidor aliado à presença de peptídeos potencialmente bioativos que agreguem saudabilidade ao

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

produto. A participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira.

Acompanhamento e assistência:

Em caso de necessidade, os pesquisadores se comprometem a providenciar intervenção médica ou nutricional por eventuais problemas que venham a apresentar resultante da ingestão das amostras da pesquisa.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento:

A participação na pesquisa se dará de forma voluntária e dentro da rotina local dos participantes, logo não haverá ressarcimento de despesas decorrentes da pesquisa, tais como para transporte e alimentação. Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Bruno Domingues Galli, Faculdade de Engenharia de Alimentos/Departamento de Tecnologia de Alimentos/Laboratório de Leite e Derivados; telefone (19) 98872-7555, e-mail: galli.bd@gmail.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____ Data: ____/____/____

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____